

jeżeli dana placówka ograniczy się do badań diagnostycznych. Ważna jest sprawa posiadania kilku oddzielnych pomieszczeń do badań, wiadomo bowiem, że operując kilkoma wirusami, a nawet kilkoma szczepami tego samego wirusa, bardzo łatwo o ich wzajemne zanieczyszczenie, przy czym nie zawsze można to w porę stwierdzić, co często prowadzi do pomyłek diagnostycznych. Konieczne jest też posiadanie dobrze izolowanych pomieszczeń na zwierzęta doświadczalne. Ważna jest również jakość tych ostatnich. Zwierzęta zakupywane dorywczo stanowią materiał niewyrównany, o którego przeszłości środowiskowej i immunologicznej nic się nie wie. Powoduje to konieczność używania większej ilości i w efekcie kosztuje więcej, dając wyniki o problematycznej nieraz wartości. O tym jak ważne jest użycie właściwych zwierząt, odpowiednio żywionych szczególnie w wirusologii, świadczy pozornie paradoksalny fakt, że zwierzęta niedożywione wykazują większą oporność na zakażenie pewnymi wirusami. Do pewnych badań wirusologicznych konieczne jest posiadanie czystych linii małych zwierząt laboratoryjnych.

Jak już wspomniano większość badań wykonuje się przy użyciu hodowli komórek. Kłopot polega na tym, że każda pracownia wirusologiczna musi sama sobie sporządzać te żywe podłoża, w odróżnieniu od pracowni bakteriologicznych, które dostają gotowe pożywki, mogą je gromadzić na zapas i używać w dowolnym czasie. Przygotowanie podłoży (żyjących komórek) dla wirusów na określony dzień jest nieporównanie trudniejsze; nie można ich przy tym gromadzić, gdyż toczą się w nich procesy życiowe, podłoża zmieniają się i stają się nieprzydatne. Stworzenie w przyszłości pracowni hodowli tkankowych w dobrze zorganizowanych zakładach usprawni pracę w tym samym stopniu w jakim osiągnięto to w bakteriologii po wydzieleniu pracowni pożywek.

Ostatnio sprawą rozwoju wirusologii w Pols-

ce zajęła się Komisja Wirusologiczna PAN, która dokonała analizy stanu tej dyscypliny w kraju. Stwierdzono niedostateczne wyposażenie w aparaturę, brak odczynników, surowic i antygenów diagnostycznych, brak dostatecznej ilości średniego personelu oraz niedostateczne finansowanie badań w dziedzinie wirusologii. W badaniach podstawowych jesteśmy w Polsce znacznie opóźnieni w porównaniu z krajami sąsiadującymi z nami. Komitet Mikrobiologiczny i Komisja Wirusologiczna PAN przesłały do odpowiednich resortów wnioski. A oto niektóre dotyczące wirusologii weterynaryjnej (skierowane do Ministerstwa Oświaty i Szkolnictwa Wyższego oraz do Ministerstwa Rolnictwa):

1. Szkolenie studentów w zakresie wirusologii w Katedrach Mikrobiologii Weterynaryjnej — co najmniej 24 godziny wykładów i 30 godzin ćwiczeń.

2. Utworzenie Zakładów Wirusologii przy niektórych Katedrach Mikrobiologii Wydziałów Weterynaryjnych WSR i SGGW (Warszawa, Lublin, Olsztyn) oraz uruchomienie przy Zakładach Higieny Weterynaryjnej Pracowni Wirusologicznych.

3. Wyposażenie placówek w aparaturę, etaty i przyznanie odpowiednich nakładów finansowych na rozwój badań podstawowych.

4. Poszerzenie zakresu szkolenia wirusologów w kraju, studia podyplomowe i zwiększenie liczby stypendiów dla szkolenia wirusologów w ośrodkach zagranicznych.

5. Opracowanie programu popularyzacji zagadnień wirusologicznych.

Poczuje się realizację wniosków w okresie najbliższych 2—4 lat i jeżeli uda się to zrobić, chociażby tylko w zakresie szkolenia kadr, to perspektywy wprowadzenia rutynowego wirusologicznego badania prób nadsyłanych przez weterynaryjną służbę terenową staną się całkiem realne i bliskie.

Adres autora: doc. dr Zdzisław Larski, Olsztyn-Kortowo.

TADEUSZ JASTRZĘBSKI, ZYGMUNT CYGAN, JULIAN NOWAK

Badania nad wyosabnianiem i identyfikacją *Cl. oedematiens* z próbek ziemi

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie
Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy drobnoustrojami z grupy *Cl. oedematiens* stale wzrasta. Wiąże się to z występowaniem w obrębie tego gatunku szeregu typów chorobotwórczych. Zaproponowany przez Oakleya i wsp. (22, 24) nowy system taksonomii przyjmuje obecność czterech odrębnych typów (A, B, C i D) różniących się wytwarzaniem odmiennych antygenów toksycznych. W związku z częstym występowaniem *Cl. oedematiens* A

w ziemi (2, 21, 40) uważany jest on za główny, poza *Cl. perfringens*, czynnik etiologiczny zgorzeli gazowej (10, 14, 15, 16, 28, 32, 34). Duże zainteresowanie badaczy *Cl. oedematiens* B wiąże się z coraz częściej wykrywanymi przypadkami zakaźnego martwiczego zapalenia wątroby u owiec (*hepatitis infectiosa necrotica*, black disease of sheep, bradsot niemiec-ki — 1, 7, 9, 25, 33, 36, 37, 41), u świń (black disease of pigs — 3, 39) oraz u bydła (black

disease of cattle — 37). *Cl. oedematiens* C nie ma większego znaczenia, aczkolwiek opisano wywoływane przez ten drobnoustrój przypadki osteomyelitis u bawołów.

Duże znaczenie posiada *Cl. oedematiens* D. Powoduje on chorobę przebiegającą w postaci hemoglobinurii (bovine bacillary hemoglobinuria — 17, 26, 29, 30, 35, 37).

W polskim piśmiennictwie weterynaryjnym publikacji dotyczących zakażeń zwierząt *Cl. oedematiens* jest b. mało. Gołaszewski (7) doniósł mianowicie o przypadku tzw. bradsotu niemieckiego u owiec, nie podając jednak użytej metody identyfikacji zarazka. Druga publikacja Stępkowskiego i Wołoszyna (31) obejmuje opis epizootologiczny i kliniczny przypadków bradsotu owiec. Identyfikację szczepu przeprowadził Zakład Beztlenowców PZH. Na uwagę zasługują badania Cygana i Wawrzkie-wiczowej (4) oraz Cygana (5) na temat etiologii zgorzeli gazowej u zwierząt oraz przynależności gatunkowej i typowej szczepów *Clostridium* wykrytych w tkankach zwierząt zdrowych i padłych. Badania te w żadnym przypadku w badanym materiale nie wykazały *Cl. oedematiens*. Jak się wydaje, powyższe dane nie wskazują wcale na rzadkie występowanie w Polsce *Cl. oedematiens*, a jedynie na duże trudności metodyczne związane z wyosabnianiem i identyfikacją tego zarazka.

Celem niniejszej pracy było: 1) znalezienie metody umożliwiającej maksymalną wykrywalność *Cl. oedematiens* bez eliminowania szczepów ciepłowrażliwych, 2) opracowanie możliwie prostej metody identyfikacji gatunkowej i typowej *Cl. oedematiens*, 3) ustalenie częstości występowania w ziemi uprawnej województwa rzeszowskiego i lubelskiego laseczek *Cl. oedematiens*.

Materiał i metody

1. Rodzaj i pochodzenie materiału

Materiał do badania. Badaniu poddano próbki ziemi uprawnej pochodzące z różnych okolic województwa lubelskiego i rzeszowskiego. Pobierano je po usunięciu 10 cm zewnętrznej warstwy ziemi.

Podłoża. Zmodyfikowane podłoże Horodniceanu i Sasarmana oraz Willisa-Hobbs przygotowywano wg przepisów podanych w pracy Cygana (6). Ponadto używano podłoża Naglera (19), Hayward (8) i Nishidy-Nakagawary (21).

2. Metody izolacji

Otrzymany materiał rozcierano w równej ilości bulionu, po czym wysiewano na podłoże Horodniceanu i Sasarmana w modyfikacji własnej (6) oraz na podłoże Wrzosek-Tarozzi z dodatkiem 0,5% glikozy i 10% odwłóknionej krwi baraniej.

Posiewy na podłożu Wrzosek-Tarozzi inkubowano 24 godz., a także 3, 7—14 i 21 dni w myśl zaleceń Nishidy i Nakagawary (21), z przesiewem na zmodyfikowane podłoże Horodniceanu i Sasarmana (2 płytki). Pojedyncze kolonie odpowiadające morfologicznie *Cl. oedematiens*, uzyskane na podłożu z dodatkiem 100 µg/ml siarczanu neomycyny (Cygani — 6) przesiewano z powrotem na podłoże Wrzosek-Tarozzi. Uzyskane hodowle kontrolowano na podłożu Zeisslera inkubowanym w warunkach tlenowych i beztleno-

wych. Hodowle na podłożach stałych prowadzono metodą pyrogallolową wg Kocha (11) i Mossela (18). Wszystkie czyste szczepy poddawano identyfikacji.

3. Metody identyfikacji

a — identyfikację gatunkową wyosobnionych drobnoustrojów beztlenowych przeprowadzono określając morfologię zarazka (sposób barwienia, wygląd zarodników i obecność otoczki) jak również morfologię kolonii na podłożu Horodniceanu i Sasarmana oraz Zeisslera (kształt, połysk kolonii i rodzaj hemolizy). Prócz tego każdy szczep sprawdzono na podłożu Willisa-Hobbs na obecność lecytynazy (antygen gamma i beta), lipazy (antygen epsilon), charakterystyczny iryzujący połysk kolonii, zdolności proteolityczne oraz na działanie fermentacyjne w stosunku do laktozy. Jednocześnie na podłożu Willisa-Hobbs przeprowadzono próbę hamowania działania lecytynazy przy pomocy swoistej surowicy antytoksykcyjnej przeciwko *Cl. oedematiens* A (anty-gamma). Na podłożu Naglera obserwowano efekt wytwarzania lecytynazy lipazy oraz hemolizy alfa i beta. Reakcję peroksydazową badano na podłożu Hayward. Dla kontroli podłoża diagnostycznych wysiewano na nie szczepy wzorcowe *Cl. oedematiens* A (Fenoir 630, 650, 292, 426, 483), *Cl. botulinum* B, *Cl. bifermentans* i *Cl. sporogenes*. Właściwości biochemiczne określano w stosunku do najważniejszych węglowodanów (laktoza, glikoza, sacharoza, maltoza), alkoholi (mannitol i glicerol) i glikozydów (salicyna) (6). Właściwości proteolityczne badano w 10% żelatynie i w ściętej słupkowej surowicy końskiej (6). Zdolność wytwarzania siarkowodoru oznaczano na podłożu Hiblera (6). Ponadto określano zdolność redukcji azotanów (6), wytwarzania indolu (6) oraz przeprowadzano próbę MR. Badano również zachowanie się wyosobnionych szczepów na mleku lakmusowym (6).

b — identyfikację typów przeprowadzano ilościowo testem LV wg MacFarlane i wsp. (13), Jamiesona (9) i Williamsa (36, 37) oraz ilościowo testem „egg agar column” wg Oakleya i wsp. (22). W obu odczynach stosowano stałą dawkę surowicy pko *Cl. oedematiens* A (25 jed. antytok.) oraz zmienne ilości toksyny. Toksynę stanowił supernatant 24-godzinnej hodowli szczepów w podłożu Nishidy i Nakagawary.

c — chorobotwórczość drobnoustrojów sprawdzano na świnkach morskich wprowadzając im domięśniowo po 1 ml 24 godz. hodowli na podłożu Wrzosek. Określano przebieg kliniczny schorzenia, a po śmierci wygląd skóry (martwice, depilacja) i mięśni (kolor, konsystencja), rodzaj wysięku (ilość, kolor, obecność tłuszczu), obecność gazu i efekty działania toksyny alfa — bursztynowe galaretowate nacieki tkanki podskórnej.

d — hialuronidazę badano *in vitro* metodą ACRA wg Oakleya i Warrack (23).

Wyniki i omówienie

Badaniom poddano 50 próbek ziemi uprawnej z różnych okolic woj. lubelskiego i rzeszowskiego. W wyniku przeprowadzonych badań wyosobniono ogółem 47 szczepów *Cl. oedematiens* A i 2 szczepy *Cl. oedematiens* C. Dodatni wynik izolacji uzyskano z 35 próbek ziemi (70%). Uzyskany wskaźnik był wyższy aniżeli w badaniach Zeisslera (40) — 64% oraz Bessemansa i Monteneya (2) — 30%, natomiast niższy od osiągniętego przez Nishidę i Nakagawarę (21) — 100%. Wyniki autorów japońskich obejmują jednak również szczepy uznane za *Cl. oedematiens* A, a wytwarzające indol, co w odniesieniu do *Cl. oedematiens* A nie było przez nikogo obserwowane.

Rezultaty badań własnych zdają się kolidować z wynikami pracy Cygana i Wawrzkie-wiczowej (4), którzy szukając przyczyn bez-tlenowcowych zakażeń przyranych u różnych gatunków zwierząt wśród wyosobnionych bez-tlenowców nie znaleźli *Cl. oedematiens*, oraz z badaniami Cygana (5) które nie wykazały tego drobnoustroju w narządach zwierząt rzeź-nych i w materiałach zwierzęcych przesłanych do ZHW. Przyczyną być może w pewnych przypadkach charakter mechanizmu warunku-jącego rozwój zgorzeli gazowej, lub przenika-nia drobnoustrojów z przewodu pokarmowego do tkanek, ale przede wszystkim zastosowana metodyka wyosabniania. W wyżej wymienio-nych badaniach chodziło bowiem autorom prze-de wszystkim o uchwycenie *Cl. perfringens* wobec czego jako okres inkubacji przyjmowali 24–48 godzin. Natomiast jak wynika z tabeli 1 dopiero przedłużenie okresu inkubacji —

Tab. 1. Wpływ czasu inkubacji wstępnej w podożu Wrzaska na częstość wyosabniania z ziemi *Cl. oedematiens*

Czas inkubacji	<i>Cl. oedematiens</i>	
	ilość *	%
0 godz.	0/50	0
24 godz.	0/30	0
72 godz.	4/35	11,4
7-14 dni	12/35	34,3
21 dni	33/50	66,0
Ogółem	35/50	70,0

* - w mianowniku ilość zbadanych próbek ziemi

niekorzystne dla *Cl. perfringens* — umożliwia maksymalną wykrywalność *Cl. oedematiens*. Wyniki podane w tab. 1 są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Nishidy i Nakagawary (21). Większa wykrywalność *Cl. oedematiens* z próbek dłużej inkubowanych wiąże się przede wszystkim z zanikaniem przerastającej flory bez-tlenowcowej, głównie właśnie *Cl. perfringens*. W doświadczeniach własnych próbki ziemi inkubowane 21 dni, nie wykazywały już zupełnie obecności *Cl. perfringens*, natomiast prawie zawsze duże ilości *Cl. sporogenes*. Izolowanie w tych warunkach *Cl. oedematiens* staje się zadaniem ogromnie ułatwionym, gdyż odróżnienie *Cl. oedematiens* od *Cl. sporogenes* nie sprawia już większych trudności.

Wyosabnianie *Cl. oedematiens* z próbek ziemi wybitnie upraszcza zastosowanie podłoża selektywnego z siarczanem neomycyny, który w ilości 100 µg/ml podłoża okazał się wystarczająco skutecznym inhibitorem towarzyszącej flory tlenowej, nie hamując przy tym wziętych dla kontroli 5 szczepów wzorcowych *Cl. oedematiens* A. Wyniki te potwierdzają rezultaty wcześniejszych spostrzeżeń Willisa i Hobbs (38)

odnośnie dużej tolerancji szczepów *Cl. oedematiens* A na siarczan neomycyny. Podstawową zaletą tego podłoża jest poza tym kontrastowość kolonii, łatwość obserwacji szczegółów ich morfologii i możliwość określenia efektów działania hemolizyn.

Właściwości biochemiczne wyosobnionych szczepów *Cl. oedematiens* zebrano w tabeli 2.

Tab. 2. Właściwości biochemiczne wyosobnionych z ziemi szczepów *Cl. oedematiens*

Grupa	Lp	Ilość	Fermentacja									
			Morfol. kol.	Laktoza	Sacharoza	Mannitoł	Salicyna	Glukoza	Maltoza	Glicerol	Mleko lakt.	Żelat. / rozpr.
1	39	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	5	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	3	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	2	11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

1 - jeden szczep dał wynik negatywny
2 - badano tylko po 1 szczepie

Spośród 47 szczepów zidentyfikowanych na podstawie analizy toksyn jako *Cl. oedematiens* A, u 39 (grupa 1) dane morfologiczne i biochemiczne odpowiadały w zupełności kryteriom ustalonym przez Scotta i wsp. (27) dla typu A. Natomiast 5 szczepów biochemicznie nie-odpowiadających typowi A (grupa 2) nie wykazywała aktywności fermentacyjnej w stosunku do glicerolu; dalsze 3 szczepy (grupa 3) nie fermentowały maltozy. Tego rodzaju odchylenia były już opisane przez Oakleya i wsp. (22). Właściwości obydwu szczepów *Cl. oedematiens* C były jednakowe i charakterystyczne dla tego typu. Z przeprowadzonych badań własnych oraz Oakleya i wsp. (22) wynika, że właściwości morfologiczne, biochemiczne i letalne (tzw. parametry Scotta i wsp.) nie stanowią pewnego kryterium identyfikacyjnego dla typów *Cl. oedematiens*.

W celu uzupełnienia rutynowych prób biochemicznych, w toku dalszej pracy przeprowadzono charakterystykę wyosobnionych szczepów, w oparciu o zachowanie się ich na specjalnych podłożach diagnostycznych zalecanych dla szybkiej identyfikacji *Cl. oedematiens*. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 3.

Przydatność podłoża Willisa-Hobbs i Naglera dla szybkiego rozpoznawania czystych hodowli *Cl. oedematiens* jest bezsporna. Na

Tab. 3. Wzrost wyosobnionych szczepów *Cl. oedematiens* na podłożach diagnostycznych

Gatunek i typ <i>Clostridium</i>	Podłoża diagnostyczne									
	Willis-Hobbs	Nagler	Willis-Hobbs	Nagler	Willis-Hobbs	Nagler	Willis-Hobbs	Nagler	Willis-Hobbs	Nagler
<i>Cl. oedematiens</i> A (1-39)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. oedematiens</i> C (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. oedematiens</i> A (6 szczepów)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. botulinum</i> B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. sporogenes</i> Nr 120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. botulinum</i> Nr 149	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Objaśnienia: + - reakcja silnie dodatnia, + - reakcja dodatnia, ± - reakcja wątpliwa, - - reakcja ujemna, 0 - nie badano

podłożach tych szczepy wzorcowe i badane *Cl. oedematiens* zachowywały się typowo. Obecność lecytynazy była łatwo wykrywalna w związku z występowaniem charakterystycznego zmętnienia dookoła kolonii. O wytwarzaniu lipazy świadczyła obecność tzw. perłowej warstwy pokrywającej powierzchnię kolonii. Oprócz tych efektów na podłożu Naglera bardzo wyraźnie zaznaczały się wokół każdej kolonii dwie obwódki hemolizy. Pierwsza obwódka hemolizy pokrywała się ze strefą zmętnienia (efekt lecytynazowy). Podłoże Willisa-Hobbs oprócz efektów działania lecytynazy i lipazy, umożliwiało stwierdzenie charakterystycznego iryzującego połysku kolonii oraz ocenę aktywności proteolitycznej w stosunku do mleka i fermentacyjnej w odniesieniu do laktozy. Do pewnego stopnia wadą podłoża Willisa-Hobbs było występowanie niekiedy przy fermentacji laktozy różowienia kolonii.

Wyraźnie ograniczoną przydatność dla szybkiej identyfikacji szczepów *Cl. oedematiens* A wykazało natomiast podłoże Hayward. Mechanizm czernienia tego podłoża i kolonii oparty o reakcję peroksydazową występuje nie tylko u szczepów *Cl. oedematiens*. Ponadto efekty hemolizy na tym podłożu, zwłaszcza przy intensywnym jego ściemnieniu czasami są mało czytelne.

Wyniki badań nad chorobotwórczością wyosobnionych szczepów wykazują pewne różnice w odsetku szczepów chorobotwórczych w zależności od czasu inkubacji wstępnej. Przy inkubacji 72-godzinnej jedyny wyosobniony szczep *Cl. oedematiens* A był patogenny. Przy inkubacji trwającej 7—14 dni na 10 szczepów wyosobnionych 8 (80%) było patogennych. Wreszcie na 22 wyosobnionych z próbek inkubowanych wstępnie przez 21 dni patogennych było tylko 14 (63,6%). Uzyskane wyniki wydają się więc potwierdzać hipotezę Nishidy i Nakagawary (21) że przedłużenie inkubacji sprzyja przede wszystkim wyosabnianiu szczepów niepatogennych.

U świnek morskich padłych po domięśniowym zakażeniu 1 ml 24-godzinnej hodowli badanych szczepów stwierdzano stale bursztynowe, galaretowate nacieki tkanki podskórnej oraz bardzo rozległą nekrozę i depilację skóry. Ponadto obserwowano przeważnie stosunkowo małe ilości wysięku płynnego i gazu. Efekt lecytynazowy w postaci kropelek tłuszczu był widoczny jedynie przy równoczesnej obecności płynnego wysięku. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał działania na kolagen i miozynę mięśniową.

Typowanie wyosobnionych szczepów *Cl. oedematiens* wykonano przy pomocy prób *in vitro*. Jak wynika z tabeli 4 szczepy z grupy *Cl. oedematiens* wytwarzają dwie odrębne antygenowo lecytynazy (beta i gamma) decydujące o rozpoznaniu typu. Identyfikacja typów polega na wykazaniu, w płynnej hodowli

Tab. 4. Budowa antygenowa *Cl. oedematiens*

<i>Cl. oedematiens</i>	Typ	Antygeny								Hialuronidaza w jedn.	
		α	β	γ	δ	ϵ	ζ	λ	θ	16	32
Szczepy wzorcowe wg McLennana	A	+	-	+	+	+	?	-	-	0	
	B	+	+	-	-	-	+	+	-	0	
	C	-	-	?	-	-	-	-	-	0	
	D	-	-	-	-	-	-	+	+	0	
Szczepy własne	A	+	-	+	0	+	0	0	0	5/26	2/26
	C	-	-	-	0	-	0	0	0	0/1	0/1

+ wynik dodatni

- wynik ujemny

? wynik wątpliwy

0 nie badano

 α - alfa (toksyna letalna) ϵ - epsilon (lipaza) β - beta (lecytynaza) ζ - zeta (hemolizyna) γ - gamma (lecytynaza) λ - lambda (tropomyosinaza) δ - hemolizyna θ - theta (lipaza)

+ wynik dodatni u 23 szczepów na 31 zbadanych

lub podłożach stałych, efektu lecytynazowego i swoistym jego zahamowaniu w odczynie seroneutralizacji. Przy przeprowadzaniu tego odczynu istotne znaczenie miało ustalenie zależności pomiędzy dawką toksyny, a ilością anty-toksyny, niezbędnej dla całkowitej seroneutralizacji. Próba ta z jednej strony świadczy o swoistości odczynu, a z drugiej jest szczególnie ważna dla różnicowania szczepów *Cl. oedematiens* B i D różniących się zasadniczo jedynie ilością wytwarzanej toksyny beta. W badaniach własnych dwadzieścia pięć jednostek anty-toksycznych surowicy pko *Cl. oedematiens* A (anty gamma) neutralizowało aktywność lecytynazową zawartą w 0,1—1 ml supernantu hodowli badanych szczepów. Na tej podstawie wszystkie zbadane szczepy (47) zidentyfikowano jako *Cl. oedematiens* A. Wytwarzały one stale również antygen epsilon. Natomiast antygen alfa, decydujący o patogenności szczepów typu A, wytwarzało 23 z 31 zbadanych szczepów. Hialuronidazę wykazało w niewielkich ilościach tj. od 16—32 j.h./ml ogółem 26,8% zbadanych szczepów, co odpowiada na ogół wynikom badań Mac Cleana i wsp. (12). Dwa szczepy biorąc pod uwagę właściwości morfologiczne, biochemiczne oraz niewytwarzanie toksyn zaliczono do *Cl. oedematiens* C.

Z dwóch porównywanych metod typowania szczepów *Cl. oedematiens*, zdecydowanie czulszą i wygodniejszą okazała się metoda oparta o probówkowy odczyn LV. Dała ona wyniki pozytywne u wszystkich 47 zbadanych szczepów (47/47—100%) podczas gdy metoda „egg-agar test” dała pozytywne wyniki u 25 szczepów na 36 zbadanych (tj. w 69,4%). Metoda LV pozwala na przeprowadzenie badania już w ciągu 2—3 godzin. Ponadto zaletą tej metody jest mała pracochłonność oraz łatwość odczytu wyników. Natomiast metoda polegająca na teście „egg-agar-column” wymaga kilkunastu godzin czasu, często nie daje wyraźnie oddzielonych efektów rozkładu owolecytyny (wywołanych dyfuzją do podłoża antygenów gamma

i epsilon) i może być użyta tylko przy zastosowaniu specjalnego podłoża. Użycie różnych koncentracji agaru (0,75%, 1,2% i 2,5%) nie wzmocniło efektów działania obu antygenów.

Wnioski

1. Maksymalną wykrywalność *Cl. oedematiens* w glebie bez eliminowania szczepów ciepłowrażliwych uzyskano, przedłużając czas inkubacji hodowli wstępnej na pożywce Wrzodka-Tarozzi do 3 tygodni z zastosowaniem następnie wysiewu na zmodyfikowane przez Cyganę podłoże stałe Horodniceanu i Sasarmana.

2. W tych warunkach wykazano w ziemi uprawnej woj. rzeszowskiego i lubelskiego *Cl. oedematiens* w 70% badanych próbek, natomiast przy namnażaniu ograniczonym do 24 godzin — w 0%, do 72 godz. — w 11,4%, do 7—14 dni — 34,3% i do 21 dni — 65%.

3. Najwygodniejszą metodą identyfikacji gatunkowej i typowej zarazka w warunkach pracowni, okazało się:

— badanie makroskopowe hodowli na zmodyfikowanym podłożu Willis-Hobbs i Naglera,

— badanie biochemiczne w pożywkach z laktozą, glikozą, sacharozą, maltozą oraz na H_2S , proteazą i wzrost w mleku lakmusowym,

— LV test z użyciem owolecytyny i odpowiednich surowic pko określonym typom *Cl. oedematiens*.

4. Wyosobnione z gleby szczepy *Cl. oedematiens* należały do dwóch typów: A (95,9%) oraz C (4,1%).

Piśmiennictwo

1. Batty I., Buntain D., Walker P. D.: Vet. Rec. 76, 115, 1964.
2. Bessemans A., Montany V.: Compt. rend. soc. biol. 127, 361, 1938.
3. Bourne F. J., Kerry J. B.: Vet. Rec. 77, 1463, 1965.
4. Cygan Z., Wawrzkiwicz K.: Medycyna Wet. 9, 518, 1966.
5. Cygan Z.: Medycyna Wet. — w druku.
6. Cygan Z.: Materiały Sesji Bezlenowcowej, Lublin 1967 — w druku.
7. Gołaszewski H.: Medycyna Wet. 4, 163, 1952.
8. Hayward N. J.: J. Path. Bact. 54, 379, 1942.
9. Jamieson S.: J. Path. Bact. 61, 389, 1949.
10. Jamieson S.: Vet. Rec. 62, 772, 1950.
11. Koch F. E.: Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 132, 358, 1934.
12. Mac. Clean D., Rogers H. J., Williams B. W., Hale C. W.: Lancet 1, 355, 1943.
13. Mac Farlane R. G., Oakley C. L., Anderson C. G.: J. Path. Bact. 52, 99, 1941.
14. Mac Lennan J. D.: Lancet II: 63, 94, 123, 1943.
15. Mac Lennan J. D.: Lancet I, 203, 1944.
16. Mac Lennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
17. Marshall S. C.: N. Z. Vet. J. 7, 115, 1959.
18. Mosel D. A. A. i wsp.: J. Path. Bact. 78, 290, 1959.
19. Nagler F. P. O.: Nature 153, 496, 1944.
20. Nagler F. P. O.: Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 23, 59, 1945.
21. Nishida S., Nakagawara G.: J. Bact. 88, 1936, 1964.
22. Oakley C. L., Warrack G. H., Clarke P. H.: J. Gen. Microbiol. 1, 91, 1947.
23. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 63, 45, 1951.
24. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 78, 543, 1959.
25. Osborne H. G.: Aust. Vet. J. 34, 301, 1958.
26. Quinlivan T. D., Wedderburn J. F.: N. Z. Vet. J. 7, 113, 1959.
27. Scott J. P., Turner A. W., Vawter L. R. (1934): cyt. wg poz. 22.
28. Smith L. D. S.: Bact. Rev. 13, 233, 1949.
29. Smith L. D. S., Jasmin A. M.: J. Amer. vet. med. Ass. 129, 68, 1956.
30. Soltys M. A., Jennigs A. R.: Vet. Rec. 62, 5, 1950.
31. Stępkowski S., Wołoszyn S.: Medycyna Wet. 3, 142, 1956.
32. Stock A. H.: J. Bact. 54, 169, 1947.
33. Thomson A.: Vet. Rec. 60, 154, 1948.
34. Thomson A.: Bull. Off. Int. Epiz. 54, 171, 1960.
35. Wellington N. A. M., Perceval A.: Aust. Vet. J. 42, 128, 1966.
36. Williams B. M.: Vet. Rec. 74, 1536, 1962.
37. Williams B. M.: Vet. Rec. 76, 591, 1964.
38. Willis A. T., Hobbs G.: J. Path. Bact. 77, 511, 1959.
39. Wise P., Munday B. L.: Aust. Vet. J. 40, 239, 1964.
40. Zeissler J., Rassfeld L.: Arch. wiss. u. prakt. Tierheilk. 59, 419, 1929.

Adres autora: prof. dr Tadeusz Jastrzębski, Lublin, ul. Akademicka 11.

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, MARIA SŁUŻEWSKA

Badanie *in vitro* oporności na antybiotyki i nitrofurazon szczepów kilku gatunków *Salmonella* wyosobnionych od zwierząt

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: doc. dr M. TRUSZCZYŃSKI

W uprzedniej pracy (9) omówiono znaczenie badania antybiotykooporności drobnoustrojów *in vitro*. Podano również sposoby powstawania szczepów antybiotykoopornych wśród drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*. W powstawaniu szczepów opornych na antybiotyki obok mutacji spontanicznej i zmienności typu selekcyjnego coraz większe znaczenie przypisuje się tzw. „zakładnej” oporności na antybiotyki (4, 7, 10); polega ona na przeniesieniu materiału genetycznego z komórki odpornej na antybiotyk lub kilka antybiotyków na komórkę wrażliwą, która w wyniku tego bez kontaktu z antybiotykami staje się na nie oporna. Jak wynika z badań Andersona (1, 2, 3) szczepy *Salmonella* i *E. coli* występujące u zwierząt gospodarskich, a posiadające zdolności przenoszenia cechy antybiotykooporności

mogą dostawać się do ustroju ludzkiego i przekazywać tę cechę szczepom biorcom, chorobotwórczym dla człowieka. Przekazywanie materiału genetycznego, w tym cechy antybiotykooporności, występuje też w obrębie grup szczepów chorobotwórczych bądź dla człowieka, bądź dla zwierząt, przy czym dawkami (F+) i biorcami (F—) tej cechy mogą być różne gatunki bakterii. Jak wynika z badań Baudensa i Chabberta (6) znanych jest obecnie szereg czynników genetycznych ekstrachromosomalnych, zbudowanych z DNA — które determinują oporność na antybiotyki.

Notowane są również coraz częstsze przypadki oporności szczepów *Salmonella* na związki nitrofuranowe. Dotyczy to w większym stopniu szczepów izolowanych od ludzi niż od zwierząt.

W piśmiennictwie polskim nie spotkano