

AKTYWNOŚĆ KATALAZY *MYCOBACTERIUM AVIUM* I NIEFOTOCHROMOGENNYCH MYKOBAKTERII IZOLOWANYCH OD ŚWIŃ

Milan Pavlas

Instytut Weterynarii w Brnie

Atypowe mykobakterie grupy III, znane jako niechromogenne [12] mają znaczenie epizootologiczne, a w niektórych krajach nawet — epidemiologiczne. Wkrótce po podzieleniu atypowych mykobakterii na trzy grupy na podstawie tworzenia barwnika zauważono, że termin „niechromogenne” nieadekwatnie określa grupę III, gdyż wiele szczepów nie wytwarza barwnika. Niektóre szczepy tej grupy wytwarzały żółty, brunatny lub różowy pigment, jednak mniej intensywnie niż szczepy fotochromogenne lub skotochromogenne [16].

Stwierdzono również, że *M. avium*, znany patogenny gatunek mykobakterii, jest spokrewniony z III grupą atypowych mykobakterii m. in. ze względu na zdolność wytwarzania barwnika. Zaliczono więc *M. avium* do grupy „niefotochromogennych” mykobakterii.

Spośród atypowych niefotochromogennych mykobakterii chorobotwórczych dla człowieka ważną pozycję zajmuje *M. intracellulare*. Gatunek ten stwierdzono nie tylko u ludzi [3, 6, 7, 13] lecz również u zwierząt, zwłaszcza u świń [4, 15]. Prawdopodobnie *M. suis* (opisany przez Baumanna i współpr. w 1965 r.) i inne gatunki posiadają te same własności co *M. intracellulare*.

Objawy kliniczne zakażenia *M. avium* i *M. intracellulare* są identyczne [13]. Jednak *M. avium* u świń jest bardziej wirulentny i wywołuje uogólnioną chorobę. Na 103 szczepy mykobakterii izolowane od świń, 47 szczepów zaliczono do *M. avium*. (20% wyhodowano z płucnych węzłów limfatycznych, z mięszu wątroby lub śledziony). Natomiast 57 szczepów *M. intracellulare* pochodziło głównie z węzłów krezkowych i w nielicznych przypadkach z węzłów podszczękowych.

Różnice wirulencji między *M. avium* i *M. intracellulare* dla świń wskazują, że do jej analizy należy podchodzić nie tylko z punktu widzenia teksonomicznego ale również epizootologicznego.

W naszych badaniach stwierdziliśmy, że świny były zakażone wy-

łącznie *M. intracellulare*; w niektórych rejonach stanowiły one 77,5% wszystkich świń reagujących na tuberkulinę ptasią [11].

Na konferencji w Los Angeles w 1969 r. sugerowano, że klasyfikacja *M. avium* i *M. intracellulare* powinno być oparte głównie na różnicy wzrostu w temp. 22° i na awirulencji dla kur i królików. Ponadto metodami serologicznymi oraz w próbach alergicznych i biochemicznych (arylsulfataza, redukcja azotanów) stwierdzono mniej lub bardziej wyraźne różnice antygenowe [5, 8, 14].

Nie stwierdzono wyraźnych różnic między *M. avium* i *M. intracellulare* pod względem szybkości wzrostu, pigmentacji, morfologii kolonii, hydrolizy Tween 80, aktywności katalazy, nikotynamidazy i pyrazinamidazy, oraz pierwotnej oporności na leki przeciwprątkowe.

W pracy tej ograniczono się do omówienia niektórych ważniejszych cech *M. avium* i *M. intracellulare*. Zgodnie z większością badaczy, stwierdziliśmy, że w próbie biologicznej *M. avium* jest bardziej wirulentne dla kur i królików niż *M. intracellulare*.

Naszym zdaniem wirulencję dla kur można dokładniej określić zakazając kury domięśniowo zamiast dożylnie. (tab. 1). Testy biologiczne wykonane z 35 szczepami *M. avium* i 53 szczepami *M. intracellulare* wykazały, że wszystkie kurczęta zakażone domięśniowo 1 mg *M. avium* zachorowały po 8—10 tygodniach na uogólnioną infekcję z ogniskami chorobowymi w wątrobie i śledzionie a $\frac{1}{3}$ padła. Natomiast kury zakażone domięśniowo *M. intracellulare* nie wykazywały żadnych zmian makroskopowych w narządach mięsnych, zmiany stwierdzono jedynie w miejscu wstrzyknięcia.

Stosując domięśniowe zakażenie, stwierdziliśmy, że różnice między *M. avium* i *M. intracellulare* u kur zakażonych dawką 1 mg lub wyższą zacierają się.

Oprócz próby biologicznej, zastosowaliśmy szereg testów biochemicznych a mianowicie:

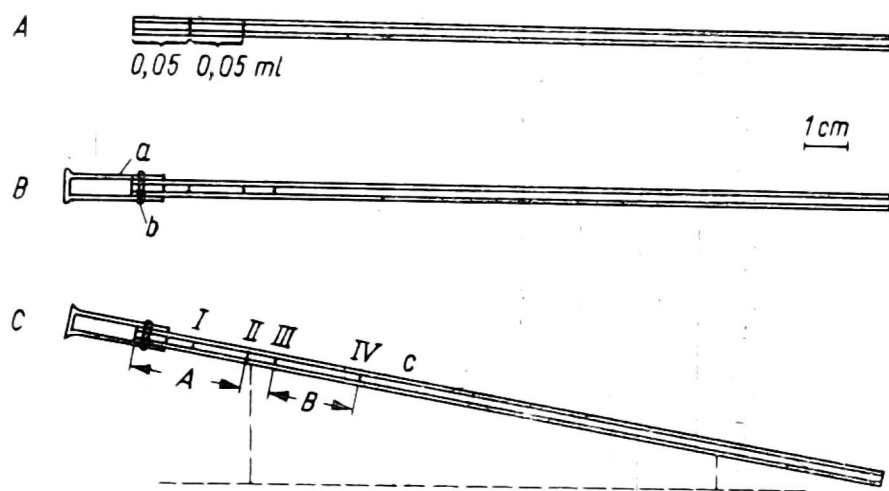
- aktywność amidazową,
- redukcję azotanów i azotynów,
- redukcję kwasu pikrynowego,
- redukcję tetrazolum (TTC),
- aktywność aarylsulfatazy,
- hydrolizę Tween 80,
- wrażliwość na INH,
- termostabilność,
- test fotochromogeny,
- zdolność wzrostu w temp. 22, 37 i 45°,
- ilościowy test aktywności katalazy.

Spośród wykonanych testów, najlepszy okazał się ilościowy test katalazowy, dawał on znacznie niższe wartości z *M. avium* niż z *M. intracellulare*. Test katalazowy wykonaliśmy w modyfikacji własnej.

Tabela 1
Badania anatomo-patologiczne i bakteriologiczne kurcząt zakażonych domięśniowo *M. avium* i *M. intracellulare* dawką 1 mg

Nr kurcząt	Rodzaj	Narząd	Badania							
			pozytywne		negatywne		pozytywne		negatywne	
			liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%
35	<i>M. avium</i>	wątroba	35	100	0	100	35	100	0	0
		śledziona	35	100	0	0	35	100	0	0
		płuca	9	25,7	26	74,3	22	62,9	13	37,1
		nerki	1	2,9	34	97,1	7	20	28	80
53	<i>M. intracellulare</i>	wątroba	p	0	53	100	0	0	53	100
		śledziona	0	0	53	100	3	5,6	50	94,4
		płuca	0	0	53	100	0	0	53	100
		nerki	0	0	53	100	0	0	53	100

Do wykonania ilościowego testu na katalazę posługiwaliśmy się sterylnymi szklanymi kapilarami o długości 18 cm i o średnicy wewnętrznej 2 mm. Znaczek *I* na kapilarce oznaczał poziom zawiesiny prątków równy ilości 0,05 ml. Do poziomu znacзка *II* nabierano roztwór 1% wody utlenionej do objętości 0,1 ml. (rys. 1).



Rys. 1. Ilościowy test katalazowy, metoda kropelkowa
a — czapeczka z PVC, *b* — podwiązanie, *c* — dodatkowy znaczek

Zawiesina mykobakterii zawierała 10 mg półmokrej wagi prątków z hodowli w 1 ml M/15 fosforanowego buforu w soli fizjologicznej (pH 7,2).

Koniec kapilarki przez który wciągnięto zawiesinę zamknięto przy pomocy plastikowej czapeczki sporządzonej z PVC (rurki 1,5 cm długości, 3,5 mm średnicy wewnętrznej, której jeden koniec był zatopiony nad palnikiem).

Na kapilarce zaznaczono wysokość kolumny (znaczek *III*) i sprawdzono szczelność w pozycji pionowej kapilarki. Następnie umieszczono kapilarę w statywie pochylonym pod kątem 15° i włączono stoper. Gaz utworzony w zawieszynie unosił się ku górze do zamkniętego końca kapilarki, spychając kolumnę ku dołowi, w kierunku otwartego końca. Objętość gazu odczytywano po 15, 30 i 60 minutach, mierząc odległość między znaczkami *III* i *IV*, tj. wysokością kolumny w momencie odczytu. Aktywność katalazową oznaczano wzorem:

$$I_C = \frac{B}{A}$$

gdzie:

I_C — indeks aktywności katalazowej,

A — wysokość kolumny zawiesiny mykobakterii z H₂O₂ (6,1 ml) w kapilarce (w mm),

B — wysokość kolumny gazu w chwili odczytu (w mm).

Badanie aktywności katalazy wykonywano w temperaturze pokojowej. Kontrolę stanowiła mieszanina wody utlenionej z M/15 fosforano-

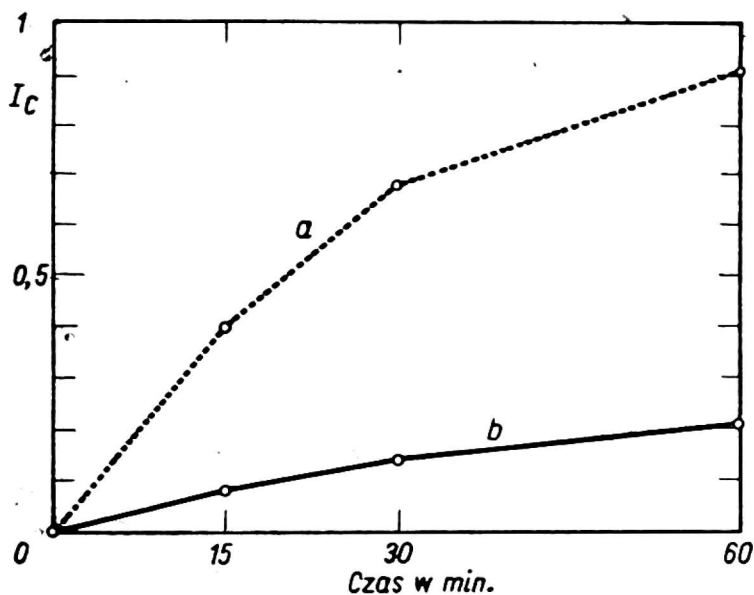
Tabela 2

Ilościowe badanie katalazy

Gatunek mykobakterii	Nr szczepu	Czas trwania reakcji min.	Nr szczepu z indeksem katalazowym											
			< 0,3		0,31—06		0,61—09		0,91—1,2		> 1,2			
			liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%		
<i>M. intracellulare</i>	57	15	24	42,1	20	35,1	10	17,5	3	5,3	0	0		
		30	8	14	20	35,1	13	22,8	10	17,5	6	10,6		
		60	5	8,8	13	22,7	13	22,7	12	21,2	14	24,2		
<i>M. avium</i>	40	14	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0		
		30	36	90	4	10	0	0	0	0	0	0		
		60	32	80	8	20	0	0	0	0	0	0		

wym buforem w soli fizjologicznej.

Spośród zbadanych 57 szczepów *M. intracellulare* 60% wykazało wartość $I_C > 0,3$ min. a przy odczycie po 30 minutach 86%, i po 60 minutach 91,2% (tab. 2).



Rys. 2. Aktywność katalazy *M. avium* i *M. intracellulare*
a — *M. avium*, b — *M. intracellulare*

Znacznie niższą aktywność katalazy wykazywały szczepy *M. avium*, 40 zbadanych szczepów wykazywało wartość $I_C < 0,3$ po 15 minutach (w tym 16 szczepów dało ujemny wynik próby). Po 30 minutach aktywność katalazy nieznacznie wzrosła; 90% szczepów wykazywało $I_C < 0,3$, a 10% szczepów w granicach od 0,31—0,6 (rys. 2). Po 60 minutach nastąpił nieznaczny wzrost; 20% szczepów wykazywało wartości między 0,12—0,6. Żaden ze szczepów *M. avium* nie wykazał wartości powyżej 0,60 przy odczycie po 60 minutach, natomiast szczepy *M. intracellulare* wykazywały w 68,5% przypadków wartość I_C powyżej 0,6 min. Największa różnica między *M. avium* i *M. intracellulare* wystąpiła po 30 minutach, gdy 90% szczepów *M. avium* wykazywało $I_C < 0,3$, w porównaniu z 14% szczepów *M. intracellulare*.

Test katalazowy wykonany na pożywkach lub na szkiełkach podstawkowych wypadł dodatnio ze wszystkimi badanymi szczepami, nie wykazał on wyraźnej różnicy między *M. avium* i *M. intracellulare*.

Na ogół wyniki nasze są zgodne z wynikami Middlebrooka [10], który jest zdania, że mykobakterie atypowe wykazują wysoką aktywność katalazową. W naszych badaniach, atypowe niefotochromogenne szczepy wykazujące biochemiczne i biologiczne cechy *M. intracellulare* charakteryzowały się wysoką aktywnością katalazy, znacznie przekraczającą aktywność szczepów *M. avium*. Stwierdzony stopień aktywności katalazy był odwrotnie proporcjonalny do wirulencji szczepów dla kur i królików.

Bojalil i Cerbon [2] porównując niefotochromogenne mykobakterie i *M. avium* uzyskali podobne wyniki. Nie stwierdziwszy dużych różnic w

aktywności katalazy między obu gatunkami, autorzy ci uważali, że test katalazowy nie nadaje się do różnicowania niefotochromogennych mykobakterii i *M. avium*.

Nasze wyniki wydają się dowodzić, że ilościowy test katalazowy nadaje się do rozpoznania szczepów mykobakterii dających dodatni wynik próby amidazowej z nikotynamidem i pyrazinamidem, oraz jako wskaźnik wirulencji niefotochromogennych mykobakterii dla kur. Test ten może służyć jako wstępna (screening) próba odróżniająca *M. avium* od grupy III atypowych mykobakterii i do oceny wirulencji dla kur bez przeprowadzania pracochłonnej i kosztownej próby biologicznej.

LITERATURA

1. Baumann R., Krenn E., Liebisch H.: Die käsige Lymphknotenentzündung der Schweine. Wien. tierärztl. Mschr. 42, 209—215, 1965
2. Bojalil L. F., Cerbon J.: A comparative study of nonchromogenic mycobacteria and *Mycobacterium avium*. Am. Rev. resp. Dis. 81, 382—386, 1960
3. Crow H. E., King G. T., Smith C. E., Corper R. F., Storgas T.: A limited clinical pathologic and epidemiologic study of patients with pulmonary lesions associated with atypical acid-fast bacilli in the sputum. Amer. Rev. Tuberc., 75, 199—201, 1957
4. Cernovski J., Kubin M.: Endemické lezisko nonchromogennich mykobakterii u prasat. Vet. Med. Praha, 14, 89—94, 1969
5. Furth J.: On the serological relationship of acid-fast bacteria. J. Immun. 12, 273—292, 1926
6. Jenkins D.: Recent clinical studies in the United States on atypical acid-fast bacilli. Bull. Intern. Union Tuberc. 29, 295—307, 1959
7. Kovacs N.: Nichtklassifizierte Mykobakterien. Zbl. Bakt. Orig., 184, 46—58, 1962
8. Meissner G.: Symposium über Atypische Mykobakterien, Plzen 1970, CSSR
9. Meyn A., Schliesser T.: Untersuchungen über das Vorkommen von Mykobakterien in den Darmlymphknoten von Schlachtschweinen. Mh. Vet. Med. 17, 49—53, 1962
10. Middlebrook G.: Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. A preliminary report. Am. Rev. Tuberc. 69, 471—473, 1954
11. Pavlas M., Rossi L., Patloková V.: The incidence of nonphotochromogenic mycobacteria of the intermediary groups in pigs and their epizootiological significance. Docum Vet., Brno, 9, 1971
12. Runyon E.: National Tuberculosis Association Meeting in Cansas City, May 1957
13. Runyon E.: Pathogenic *Mycobacteria*. Adv. Tuberc. Res. 14, 235—287, 1965
14. Schaefer W. B., Reggiardo Z.: Serological identification and classification of the mycobacteria other than *M. tuberculosis* encountered in human disease. Amer. Rev. resp. Dis. 88, 111—116, 1963
15. Tammegagi L., Simons G.: Battey-typowe mycobacterial infection of pigs. Aust. ven. J. 44, 121—125, 1968
16. Youmans P.: Studies in the United States on "atypical" acid-fast bacteria. Bull. inf. Union Tuberc. 27, 128—151, 1958

M. Pavlas

CALACTASEACTIVITET OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* AND
NON-PHOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA ISOLATED FROM PIGS

Summary

Evaluation of catalase activity in 97 mycobacterial strains isolated from pigs revealed significant differences in the amount of catalase between strains classifiable as *Mycobacterium avium* and non-photochromogenic mycobacteria. Using the quantitative catalase test as modified in this laboratory, it was found that groups of strains corresponding by its properties to *M. avium* had a very low catalase activity.

When the catalase reaction was read at 15 minutes, all 40 strains of *M. avium* showed a catalase index (I_C) of $< 0,3$ with 16 of these strains having the I_C entirely negative. When evaluated at 30 minutes, the catalase activity of *M. avium* strains showed little change: 90 per cent of the strains had the I_C index of $< 0,3$ the remaining 10 per cent of *M. avium* strains had a I_C of 0,31—0,6. A further mild rise in catalase activity was found at 60 minutes by which time the number of *M. avium* strains with the I_C of 0,31—0,6 had doubled, thus reacting 20 per cent.

Most of the non-photochromogenic mycobacteria, on the other hand, showed a high degree of catalase activity. The greatest difference in catalase activity between *M. avium* and non-photochromogenic mycobacteria was found when the reaction was read at 30 minutes. At this time the I_C of $< 0,3$ was shown by 90 per cent of *M. avium* strains and only by 14 per cent non-photochromogenic mycobacteria. When the catalase reaction was read at 60 minutes, 68,5 per cent of the non-photochromogenic strains had a I_C of $> 0,6$.

The catalase activity was inversely proportional to the virulence of the mycobacteria for fowls.