

## SPOSTRZEŻENIA NAD BAKTERIOLOGICZNĄ DIAGNOSTYKĄ WIBRIOZY BYDŁA

ROMAN HOPPE, ZOFIA RYNIOWICZ

Klinika Położnicza Wydziału Wet. SGGW w Warszawie  
Kierownik: prof. dr R. Hoppe

W rozpoznawaniu wibriozy bydła podstawowe znaczenie ma diagnostyka bakteriologiczna. Pozwala ona wykryć schorzenie zarówno u osobników męskich, jak też u osobników żeńskich znajdujących się w zakażonych stadach, bądź też użytych do próby biologicznej dla rozpoznania zakażenia u osobników męskich. Diagnostyka serologiczna pod postacią aglutynacji ze śluzem pochwowym ma o wiele mniejsze znaczenie, zwłaszcza w takich krajach jak Polska, w których w grę wchodzi reakcja krzyżowa w związku z rozprzestrzenieniem zarazy rzęsistkowej.

W prowadzonych przez autorów doniesienia pracach nad bakteriologiczną diagnostyką wibriozy bydła zasadniczy materiał rozpoznawczy stanowiły wypłuczyny z napletka buhajów, śluz pochwoy oraz zeskrobiny błony śluzowej szyjki macicy. W rzadkich przypadkach materiał diagnostyczny stanowiły poronione płody i nasienie buhajów.

Wypłuczyny z napletka pobierano przez przepłukiwanie go przy użyciu szklanej pipety i gruszki gumowej bulionem peptonowym (20 ml) o  $\text{pH} = 7,0$ . Pobierano śluz pochwoy pipetą z okolicy sklepienia pochwy, zeskrobiny błony śluzowej szyjki macicy posługując się katecterem do biopsji Folmer-Nielsena osobno z zewnętrznego i osobno z wewnętrznego ujścia szyjki. Nasienie buhajów, przez niewielu tylko autorów uważane za odpowiedni materiał rozpoznawczy, badano w nielicznych przypadkach.

Badanie mikroskopowe wyżej wspomnianego materiału, które dokonywano przy użyciu kontrastu fazowego, nie odgrywa w diagnostyce większej roli.

W kilku tylko przypadkach udało się autorom stwierdzić *Vibrio* w świeżym materiale z poronionych płodów i wypłuczyn z napletka. Największe znaczenie diagnostyczne posiada posiew na podłożach stałych. Autorzy doniesienia używają stosowanej przez Florent pożywki wybiórczej, to jest agaru z krwią z dodatkiem cysteiny i zieleni brylantowej oraz zwykłego agaru z krwią baranią.

Spośród podłoży płynnych, na które wysiewano materiał diagnostyczny, autorzy używali znanej ogólnie pożywki Bartletta ze ściętych jaj zalewanej płynem Ringera.

Jak wiadomo, zasadniczą trudność w uzyskiwaniu wzrostu *Vibrio* zarówno na pożywkach stałych, jak i na płynnych sprawia przerastanie posiewów przez pałeczkę odmieńca oraz w mniejszym stopniu przez pałeczkę ropy błękitnej. Na płytkach z zielenią brylantową pałeczka odmieńca rozlewa się dopiero po 48 godz., można więc uniknąć „zalania” płytki przez usunięcie pojedynczych kolonii na 2 dzień od dokonania posiewu.

Zbadany przez autorów preparat PNPG/1 (Paranitrophenylglicerol), hamujący rozrastanie się szczepów odmieńca, opisany przez Bera (1958), produkcji zakładów VEB Berlin Chemie, okazał się zbliżonym w swym działaniu do zieleni brylantowej. Materiałem najbardziej zanieczyszczonym wymienionymi drobnoustrojami są wypłuczyny z napletka, będące zasadniczym materiałem diagnostycznym pochodzącym od buhajów. Z wypłuczyn w tej postaci, w jakiej są do badania dostarczane, a zanieczyszczonych odmieńcem, żadne dodatki do pożywek nie są w stanie powstrzymać wzrostu tego drobnoustroju. Dlatego też autorzy poddawali wypłuczyny, podobnie jak Florent, Hubrig i inni, 30-minutowemu wirowaniu przy 3000 obrotów/min., bezpośrednio po czym wysiewano kroplę supernatantu z  $\frac{1}{3}$  dolnej jego słupa.

Postępowanie powyższe pozwoliło autorom na 229 posiewów z wypłuczyn od 103 buhajów otrzymać wzrost w 191 przypadkach (84,4%), w których pałeczka odmieńca nie zakłóciła toku badania w kierunku wykrycia *Vibrio*.

Na 103 badane buhaje od jednego tylko przy trzykrotnym badaniu nie udało się uniknąć zalania pożywek. Przytoczone wyżej cyfry nie są więc gorsze w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Jak wiadomo, *Vibrio foetus* jest względnym beztlenowcem. Autorzy doniesienia podobnie jak większość badaczy w zaraniu prac nad *Vibrio* początkowo inkubowali posiewy pod ciśnieniem 760 mm Hg z dodatkiem 10% CO<sub>2</sub>. Ze względu na to, że w warunkach tych wzrost był słaby i powolny, stosowano następnie przez czas dłuższy warunki hodowli podane przez Reicha i Morse'a (1956), to jest ciśnienie 390 mm Hg z dodatkiem 10% CO<sub>2</sub>. Ostatnio autorzy stosują zalecaną przez Florent i Plastridge metodę hodowli w 90% N<sub>2</sub> z dodatkiem 3% CO<sub>2</sub> i 5% O<sub>2</sub> przy nieznacznie tylko obniżonym ciśnieniu.

Wzrost *Vibrio* na pożywkach stałych następuje zazwyczaj po 48-godzinnym przetrzymywaniu w termostacie. Brak wzrostu na tych pożywkach orzeka się jednak nie wcześniej, niż po 10 dniach. Na pożywce wybiórczej obok *Vibrio foetus*, które występuje pod postacią niewielkich, gładkich szarych kolonii wzrastać może niechorobotwórczy mętlik nazwany przez Florent *Vibrio bubulus*. *Vibrio bubulus* daje kolonie

o zabarwieniu zielonkawo-żółto-brązowym. Na agarze z krwią *Vibrio foetus* tworzy kolonie szaroróżowe, *Vibrio bubulus* zaś daje kolonie bardziej płaskie o odcieniu zielonkawożółtym.

W celu stwierdzenia, czy badane kolonie istotnie są złożone z *Vibrio*, rozmaz hodowli w kropli roztworu fizjologicznego oglądano przy użyciu kontrastu fazowego.

*Vibrio foetus* w młodych hodowlach ma kształt litery „S” lub krótkiej sinusoidy; postacie przecinkowate są stosunkowo nieliczne. *Vibrio bubulus* jest bardziej ruchliwe, w młodych hodowlach przeważają formy krótkie. Postacie „esowate” i rzadziej występujące dłuższe mają sinusoidę bardziej płaską niż *Vibrio foetus*.

Kwestionowana przez szereg autorów hodowla diagnostyczna na pożywkach płynnych wymaga sprawdzenia wzrostu w kontraście fazowym w 24—48 godzin po wysiewie. Jeżeli otok zawsze bujnej flory drobnoustrojów towarzyszących dostrzegano w preparatach mętlika, dającego się odróżnić po charakterystycznym kształcie i ruchu, kroplę płynu pożywki przenoszono na pożywkę wybiórczą dla izolacji. Przy nieznacznym zanieczyszczeniu posiewano kroplę płynnej pożywki na zwykły agar z krwią.

Przy silnym zanieczyszczeniu florą towarzyszącą, płynną część pożywki poddawano 30-minutowemu wirowaniu i posiewu dokonywano z supernatantu, podobnie jak przy materiale z wypłuczyn. Sposób ten zastosowany w hodowli *Vibrio* przez autorów doniesienia po raz pierwszy dał zadowalające wyniki i już w pierwszym, a niekiedy po drugim pasażu otrzymywano na pożywkach stałych wzrost kolonii *Vibrio*.

Do tej pory z 229 posiewów z wypłuczyn autorzy otrzymali 25 szczepów *Vibrio*, z których 17 (68%) wzrosło na pożywce wybiórczej, a 8 (32%) na pożywce Bartletta. Należy jednak podkreślić, iż od chwili zastosowania hodowli w atmosferze 90% N<sub>2</sub> przy obecności *Vibrio* w pożywce Bartletta otrzymywano jego wzrost zawsze i na pożywkach stałych, tak że nie zachodziła potrzeba izolowania zarazka z pożywki płynnej.

Spostrzeżenia te wskazują, że posiew materiału na pożywkę płynną traktować należy jako metodę rozpoznawczą uzupełniającą. Może ona oddać bardzo poważne usługi w przypadku zalania pożywek stałych przez odmieńca.

Dla odróżnienia *Vibrio foetus* od niechorobotwórczego *Vibrio bubulus* stosowano próbę na katalazę w powszechnie znanej modyfikacji Bloma, użytą do różnicowania chorobotwórczych szczepów po raz pierwszy przez Brynera i Franka (1955). Do przeprowadzenia próby autorzy doniesienia używali 3-dniowej hodowli zarazka na pożywce Bartletta. Wyizolowane szczepy *Vibrio* zarówno odmiany *venerialis*, jak i *intestinalis* miały liczbę katalazową wg Bloma w granicach 0,2—3 ml.

Próbie na obecność H<sub>2</sub>S przeprowadza się na ogół na bulionie z do-

datkiem Difco. Autorzy doniesienia w braku tego składnika z powodzeniem stosowali hodowlę na pożywce Bartletta. Po wysiewie 3-dniowej hodowli zarazka na pożywkę Bartletta umocowywali, jak to się ogólnie praktykuje, między korkiem a wylotem probówki, wąski pasek bibuły filtracyjnej nasączonej świeżym roztworem octanu ołowiu. Po 24-godzinnej inkubacji sprawdzano zabarwienie papierka. Wzrost *Vibrio bubulus* powoduje wyraźne szernienie bibuły. *Vibrio foetus* albo nie wywołuje żadnych zmian w zabarwieniu, albo tylko bardzo słabe zaczernienie dolnego końca papierka. *Vibrio foetus intestinalis* uwalnia H<sub>2</sub>S i koniec papierka ulega wyraźnemu ściemnieniu.

Wynik próby zarówno na katalazę, jak i na obecność H<sub>2</sub>S uzależniony jest od intensywności wzrostu zarazka.

#### PIŚMIENNICTWO

- Beer J. (1958): Zblt. f. Bakteriologie (Orig.). 171, 3.  
 Bryner J. H., Frank A. H. (1955): A. J. V. R. XVI, 58, 76.  
 Florent A. (1959): Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen u. Besamung d. Haustiere. III, 1/2. 30.  
 Hubrig T. H., Wohanka K. (1959): Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen u. Besamung d. Haustiere. III, 1/2. 67.  
 Reich C. V., Morse E. V., Wilson J. B. (1956): A. J. V. R. XVII. 62. 140.

Р. Гоппе и З. Рыневич (Варшава)

#### НАБЛЮДЕНИЯ ПО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВИБРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

##### Резюме

Авторами обсуждается применяемая ими методика изолирования штаммов *Vibrio foetus* из препуциальных смывов и из спермы быков а также образцов влагалищной слизи и биопсии шейки матки животных женского пола. Авторами приводятся применяемые среды, методы посевов, а также условия культур, и затем обсуждается бактериологическое и биохимическое дифференцирование штаммов *Vibrio foetus* от *Vibrio bubulus*.

R. Hoppe and Z. Ryniewicz (Warszawa)

#### OBSERVATIONS ON BACTERIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF CATTLE VIBRIOSIS

##### Summary

The authors discuss, applied by themselves, the method of isolating the *Vibrio foetus* strains out of the prepuce rinsings and out of the bull's semen as well as of the vaginal mucus tests and of biopsy of the female individuals *cervix uteri*. They present the bases used and the media methods as well as the culture conditions and then they discuss the bacteriological and biochemical differentiation of the *vibrio foetus* strains from that of *vibrio bubulus*.