

576.851.45.078.39

## PŘÍSPĚVEK K LABORATORNÍ DIAGNOSTICE NĚKTERÝCH PASTEUREL

Podplukovník MUDr. F. KYNTERA, CSc., prom. farm. F. ŠITA  
Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové

Laboratorní diagnostika některých pasteurel, zejména jejich pohotová diferenciaci, má v polní epidemiologii veliký význam. Rozlišení Yersinova bacila — *Pasteurella pestis* od pěti typů *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Pasteurella multocida*, ev. *Pasteurella homolytica* bývá v některých případech velmi náročná a hlavně zdlouhavá.

Na základě vlastních zkušeností po praktickém prověření všech dostupných metod diferenciaci některých pasteurel předkládáme vlastní poznatky k urychlení diferenciaci některých pasteurel na podkladě kultivačně biochemických metod.

Základem biochemické diferenciaci diagnostiky je Knappovo schéma:

P ů d a	P. pestis	P. pseudotbc	P. multocida
Melibióza	—	(±)	—
Salicín	(±)	(±)	(±)
Rhamnóza	(±)	+	—
Sorbit	(±)	±	(±)
Sacharóza	(±)	(±)	+
Ureáza	—	+	+
H <sub>2</sub> S	—	(+) slabě	+
Indol	—	—	+
Pohyblivost	—	+	—

+ = pozitivní      — = negativní      ( ) = výjimečně

Mollaret pokládá za nejspolehlivější znak diferenciaci *Pasteurella pseudotuberculosis* od Yersinova bacila: tvorbu ureázy a pohyblivost nad 37° C. I v Raškově rozlišovací tabulce kvasných a biochemických vlastností pasteurel je tvorba ureázy a H<sub>2</sub>S zvláště.

## Kvalitní průkaz ureázy

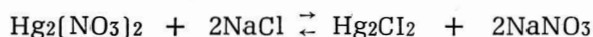
Základem průkazu ureázy je její specifická vlastnost, rozkládání urey:



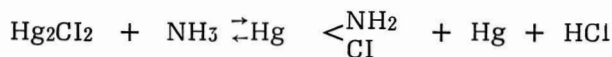
Používané diagnostické půdy obsahují ureu a vzniklý amoniak je dokazován nespecificky, na základě posunu pH půdy do alkalické oblasti běžným vhodným acidobázickým indikátorem. Při specifickém průkazu se obvykle využívá reakce alkalického jodortuřnatanu — Nesslerova činidla, které dává s amoniakem žluté zbarvení až amorfní hnědou sraženinu sumárního složení Hg<sub>2</sub>J<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>.

První způsob byl vyzkoušen s použitím půdy Rustigianovy-Stuartovy, jejímž základem je kvasnicový extrakt s přidavkem KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Indikátorem je fenolová červeň. Tato metoda se neosvědčila pro malou citlivost a selektivitu. Nevýhodou Nesslerova činidla je především malá rozlišovací schopnost.

Ve snaze využít selektivity tvorby ureázy jako stabilního diferenciacního znaku navrhujeme tento způsob detekce: Testovaný mikrob se inkubuje v bujónu s přidavkem urey. Detekce je provedena roztokem dusičnanu rtuťného, který reaguje nejprve s NaCl obsaženým v bujónu za vzniku bílé nerozpustné sraženiny chloridu rtuťného, kalomelu:



Je-li ve vzorku přítomen amoniak, ihned zreaguje:

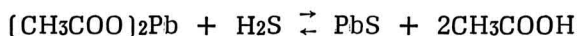


Uvolněná koloidní rtuť vybarví přítomnou bílou sraženinu význačně černě, je-li množství amoniaku malé — šedě. Koloidní rozptýl rtuti činí reakci velmi citlivou. V dosavadním použití se metoda osvědčila pro vysokou rozlišovací schopnost, citlivost, jednoduchost provedení a selektivitu pro *P. pseudotbc* a *P. multocida*. Přes uvedené klady má metoda tuto nevýhodu: Dusičnan rtuťný, který deteguje ureázu v kultivačním bujónovém médiu, po aplikaci ho znehodnocuje.

### Kvalitativní důkaz produkce sirovodíku

Pokus o průkaz sirovodíku se běžně provádí s použitím diagnostické půdy podle Reeda a Orra, jak ji popisuje Raška — pepton 2 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 %, glukóza 0,1 %, agar 0,2 % v destilované vodě. Jako indikátor se používá 10 ml 0,02% roztoku octanu olovnatého na 1 litr vody. Inkubace 24 hodin při teplotě 37° C.

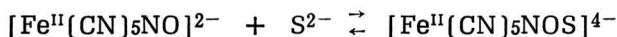
Podstatou této metody je vznik nerozpustného, charakteristicky zbarveného siřníku olovnatého:



Uvedená metoda se nám rovněž nejevila dostatečně citlivá a selektivní, jmenovitě při kvantitativně slabém růstu.

Jako nový postup navrhujeme detekci sirovodíku reakcí s nitroprussidem sodným, který dává s alkalickými roztoky siřníků intenzivní, červenofialové zbarvení. Jako půdu je možno použít bujón, (přítomnost urey nevadí).

Protože sirovodíková voda přímo nereaguje, je nutno provést alkalizaci amoniakem. Celkové schéma reakce můžeme vyjádřit:



Uvedená metoda se osvědčila při všech dosa-  
vadních pokusech. Byla specifická pro *P. multocida*, citlivá a jednoduchá.

### Návod k přípravě půdy s ureou a činidel pro detekci ureázy a sirovodíku

#### 1. Příprava diagnostické půdy:

Chemikálie a suroviny: 20% roztok urey v destilované vodě, bujón.

Bujón se rozlije do zkumavek po 5 ml, zkumavky se zazátkují a sterilizují. Po vychladnutí se přidá sterilně do každé zkumavky 0,1 ml roztoku urey, předem zfiltrovaného přes bakteriální filtr (Seitz).

#### 2. Příprava činidel:

- 1% roztok nitroprussidu sodného. Připravujeme nejraději vždy čerstvý a spotřebujeme nejlépe do 24 hodin. Časem se rozkládá;
- amoniak připravujeme zředěním na 5 %;
- dusičnan rtuťný připravíme rozpuštěním 5,6 g  $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml destilované vody.

#### Provedení:

Z čisté kultury očkujeme běžným způsobem do popsaných tekutých půd. Inkubujeme 24 h. při 37° C.

Při detekci ureázy aplikujeme 2 ml roztoku dusičnanu rtuťného, při detekci  $\text{H}_2\text{S}$  nejprve 0,5 ml 5% amoniaku a ihned 0,3 ml nitroprussidu sodného.

#### Odečtení:

Bakteriální kmen	Ureáza (dusičnan rtuťný)	Sirovodík (nitroprussid sodný)
<i>Pasteurella pestis</i> <i>Pasteurella pseudotbc</i> I—V	bílá sraženina	bezbarvý roztok
<i>Pasteurella multocida</i>	černá sraženina černá sraženina	bezbarvý roztok červenofialový roztok

Obě navrhované reakce urychlují a zvýrazňují diferenciaci *Pasteurella pestis*, *Pasteurella pseudotuberculosis* I—V a *Pasteurella multocida*.

### Souhrn

V práci je popsána nová metoda kultivačně biochemického průkazu ureázy a  $\text{H}_2\text{S}$  u některých pasteurel. Podstatou detekce ureázy je přítomnost urey v tekuté půdě a dusičnan rtuťný jako aplikovaný indikátor ureázy. Reakce je okamžitá, v pozitivním případě se projeví zčernáním.

Sirovodík se prokazuje v tekuté půdě (bujónu) pomocí 5% amoniaku a nitroprussidu sodného. Reakce je okamžitá, v pozitivním případě se projeví zčervenáním (červenofialový odstín).

Písemnictví u autorů

## ZLEPŠOVACÍ NÁVRHY

ZN č.:

13 HT-ZS/66

Název ZN:

Pojízdný stojan k očnímu magnetu a sestavení elektrického zařízení napájení magnetu

Autoři ZN:

o. p. Jaroslav Dvořák, Vojenská nemocnice Plzeň

Stručný popis:

Magnet i napájecí část jsou umístěny na pojízdném stojanu. Úprava umožňuje pohyb magnetu všemi směry. Napájení je provedeno pomocí transformátoru a selenového usměrňovače umístěného rovněž ve stojanu. Odpadají tedy akumulátory, čímž je odstraněno šíření výparů z nich a jejich vliv na korozi přístroje a ostatních předmětů na sále.

Odměna v místě podání 600,— Kčs

Informace: Autor, Vojenská nemocnice Plzeň