

’n TAKSONOMIESE STUDIE VAN GRAM-NEGATIEWE, PLEOMORFE  
BAKTERIEË SOOS GEVIND IN DIE SKEDES EN SEMEN VAN SKAAP-  
RAMME IN DIE HOËVELDSTREEK

DEUR

JOHAN ADAM ERASMUS

(DVSc; PhD)

VERHANDELING VOORGELê TER GEDEELTELIKE

NAKOMING VAN DIE VEREISTES

VIR DIE

GRAAD MAGISTER SCIENTIAE

AAN DIE

POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR

CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS

LEIER

:

DR P.A.J. BRAND

DESEMBER 1983

## DANKBETUIGINGS

Ek wil graag my innige dank uitspreek teenoor:-

Die Direkteur van Veeartsenydiens wie sy goedkeuring verleen het om die eksperimentele gegewens vir die doeleindes van 'n verhandeling te gebruik;

Dr P.A.J. Brand vir die baie ure van gesprek tydens die eksperimentele periode en vir sy gewaardeerde kritiek gedurende die opstel van die manuskrip;

Mnr L. Tiedt wat die elektronmikroskopiese ondersoekes gedoen en die foto's geneem het.

Matilda en ons kinders vir hul geduld.

## ABSTRACT

Actinobacillus actinomycetem comitans, A. seminis and Histophilus ovis are all Gram-negative, pleomorphic bacteria, known to cause ram epididymitis. A. seminis and H. ovis are also described as weak, or even non-disseminators of glucose.

A study of the morphology of A. seminis and H. ovis revealed that the feature of pleomorphism is mainly encountered in young cultures. This disappears in older cultures. Both organisms metabolize glucose by fermentation should serum be added to the medium. In contrast older cells ferment glucose faster than young cells from the same isolate. From these findings it could be deduced that a long lag phase in the growth curve of these organisms could be a contributor towards the property of pleomorphism. As pleomorphism appears only when these organisms are cultured on an artificial medium, temporary variation appears to be the main contributing factor towards this property.

Applying the API 20 E system of classification it was impossible to distinguish between A. actinomycetem comitans, A. seminis and H. ovis. Their properties differed however radically from those of Pasteurella haemolytica. Using standard techniques on the other hand, it was possible to distinguish between A. seminis, H. ovis as well as a pleomorphic form of P. haemolytica. Based on the ONPG-test A. actinomycetem comitans and A. seminis could be differentiated, and by means of the decarboxylation of lysine the existence of 2 possible species of H. ovis was indicated.

The final differentiation between the relevant organisms was based on 10 different tests from which the

sugar reactions were excluded. Sugar metabolism using different sugars was examined, but due to variable reactions, these results were excluded from the eventual identification. The number of useful tests could however not be regarded as a final proof of the suggested classification. Further investigation must be done however to prove this.

Except for A. seminis other known pathogens such as A. actinomycetem comitans and H. ovis are also found in the genital system of rams in the Highveld area. No decision with regards to the pathogenicity of the pleomorphic form of P. haemolytica found, could be given.

## UITTREKSEL

Actinobacillus actinomycetem comitans, A. seminis en Histophilus ovis is Gram-negatiewe, pleomorfe bakterieë wat epididimitis onder skaappramme kan veroorsaak. Laasgenoemde twee word beskryf as mikrobes wat glukose glad nie of baie swak metaboliseer.

'n Studie van die morfologie van A. seminis en H. ovis het getoon dat die eienskap van pleomorfisme veral in jong kulture baie prominent is en dat dit grootliks in ouer kulture verdwyn. Terselfdertyd is waargeneem dat beide hierdie organismes glukose deur middel van fermentasie metaboliseer mits serum by die medium gevoeg word. In teenstelling met die morfologiese veranderinge wat met ouderdom plaasvind, is dit selle uit die ouer kulture wat glukose redelik vinnig kan metaboliseer. Uit hierdie gegewens blyk dit dat beide A. seminis en H. ovis 'n besondere lang sloerfase het; 'n faktor wat 'n bydrae kan lewer tot die voorkoms van pleomorfisme. Omdat pleomorfisme egter na vore kom wanneer hierdie organismes op kunsmatige medium groei, blyk dit dat tydelike variasie die belangrikste bydraer tot die eienskap is.

Deur die aanwending van die API 20 E klassifikasiesisteen kon daar nie onderskeid tussen A. actinomycetem comitans, A. seminis en H. ovis gemaak word nie. Hul eienskappe het radikaal met die van bekende isolate van Pasteurella haemolytica verskil. Deur die aanwending van standaard tegnieke kon daar onderskeid tussen A. seminis, H. ovis asook 'n pleomorfe vorm van P. haemolytica gemaak word. Op grond van die uitkoms van die ONPG-toets kon onderskeid tussen A. actinomycetem comitans

en A. seminis gemaak word. Netso kon die dekarboksilasie van lisien weer aangewend word om die moontlike bestaan van 2 spesies van H. ovis aan te toon.

Die finale onderskeid tussen die relevante organismes is gebasseer op 10 verskillende toetse waarby die suikertoetse uitgesluit is. Laasgenoemde werk is wel gedoen, maar die resultate was so variërend dat dit by die uiteindelijke identifisering weggelaat is. Die aantal bruikbare toetse kan egter nie as voldoende beskou word om die klassifikasie wat voorgestel is, bo alle twyfel te bewys nie. Verdere werk in hierdie verband sal nog gedoen moet word.

Afgesien van A. seminis kom daar ook bekende patogene soos A. actinomycetem comitans en H. ovis in die geslagstelsel van ramme in die Hoëveldstreek voor. 'n Pleomorfe vorm van P. haemolytica is ook gevind, maar geen uitspraak ten opsigte van sy patogeniteit kan tans gemaak word nie.

## INHOUD

### HOOFSTUK 1

#### INLEIDING

1.1	Geskiedkundige oorsig	1
1.2	Epididimitis onder skaapramme in die Oranje-Vrystaat	2
1.3	Die taksonomie van <u>A. seminis</u>	2
1.4	Doelstelling van die ondersoek	4
1.5	Metode van ondersoek	5

### HOOFSTUK 2

#### WERKWYSE

2.1	Neem van monsters	7
2.2	Verwerking van monsters	7
2.3	Bekende organismes vir verwysingsdoeleindes	8
2.4	Morfologiese ondersoek van die organismes	8
2.4.1	Ligmikroskopiese ondersoek	8
2.4.2	Elektronmikroskopiese ondersoek	8
2.5	Glukosemetabolisme	8
2.5.1	Hugh & Leifson-medium	8
2.5.2	Gewysigde fenolrooi-sopmedium	9
2.5.3.2	Gaschromatografiese ondersoek	10
2.6	Biochemiese eienskappe van organismes soos getoets met die API 20 E klassifikasiesisteen	11
2.7	Biochemiese eienskappe van toetsorganismes volgens standaard tegnieke	13
2.7.1	Groeivereistes	13
2.7.2	Beweeglikheid en H <sub>2</sub> S-produksie	13
2.7.3	Oksidase-toets	13
2.7.4	Katalase-toets	13
2.7.5	ONPG-toets ( $\beta$ -galaktosidase sintese)	13
2.7.6	Dekarboksilasie van aminosure	14

## INHOUD (vervolg)

2.7.7	Suikermetabolisme	14
2.7.8	Voges-Proskauer toets	16
2.7.9	Nitraatreduksie	16
2.7.10	Indolproduksie	16
2.7.11	Urease	16

### HOOFSTUK 3

#### RESULTATE MET KOMMENTAAR

3.1	Morfologie van organismes	17
3.1.1	Bekende isolate van <u>A. seminis</u>	17
3.1.1.1	Isolaat 6201	17
3.1.1.2	Isolaat 70/64	18
3.1.1.3	Isolaat T981V	21
3.1.1.4	Morfologiese verband tussen die drie bekende isolate van <u>A. seminis</u>	23
3.1.2	<u>H. ovis</u>	23
3.1.3	Isolaat I29 van <u>P. haemolytica</u>	25
3.1.4	Isolaat B11/65/1 uit die semen van 'n plaaslike ram	27
3.2	Glukosemetabolisme	27
3.2.1	Aanwending van standaard tegnieke	27
3.2.2	Die aanwending van gaschromatografie	30
3.3	Die API 20 E klassifikasiesisteen by die identifisering van <u>A. seminis</u>	33
3.3.1	Bekende isolate van <u>A. seminis</u> , <u>A. actinomycetem comitans</u> en <u>P. haemolytica</u>	33
3.3.2	Organismes uit die semen en skedes van plaaslike ramme	35

## INHOUD (vervolg)

3.4 Biochemiese eienskappe van bekende en onbekende isolate deur middel van standaard tegnieke	37
3.4.1 n Basiese klassifikasie	37
3.4.2 Ander biochemiese eienskappe	40
HOOFSTUK 4	
BESPREKING	42
BIBLIOGRAFIE	48
BYLAAG 1	54

## INLEIDING

1.1 Geskiedkundige oorsig.

Wanneer die epididimus of bybal van 'n manlike dier ontsteek, ontwikkel 'n epididimitis. Die klassieke oorsaak van epididimitis van skaapramme is Brucella ovis; 'n klein nie-beweeglike, Gram-negatiewe basil wat onder optimale toestande redelik swak groei (Merchant & Packer, 1969; Buxton & Fraser, 1977). Die organisme is suurvas met Stamp-kleuring en alkalivas met Hansen-kleuring en met Koester-kleuring (van Drimmelin, 1960).

Gedurende 1955 het Dodd & Hartley Gram-negatiewe, pleomorfe, nie-suurvaste basille uit die semen van ramme wat aan supperatiewe epididimitis gely het, geïsoleer. Die organismes wat as uiters pleomorf beskryf is, het uit baie lang sowel as baie kort selle bestaan. Laasgenoemde het ook bipolêre eienskappe vertoon; 'n kenmerk wat ook by die genus Pasteurella (Smith, 1975) gevind word. 'n Ander interessante eienskap van Dodd & Hartley (1955) se isolaat was dat dit goed op bloedagar in 'n anaërobe of in 'n karboksifiele atmosfeer kon groei, maar nie in aërobe toestande nie. Geen groei het ook op MacConkey-agar voorgekom nie. Roberts (1956) het hierdie besondere organisme Histophilus ovis genoem.

'n Tweede Gram-negatiewe, pleomorfe bakterie wat met epididimitis van skaapramme in Australië in verband gebring is, is Actinobacillus seminis (Baynes & Simmons, 1960). Soos in die geval van H. ovis benodig A. seminis ook bloed of serum in die kweekbodem en groei ook nie op MacConkey-agar nie. Sedertdien is A. seminis ook in die semen en epididimi van skaapramme gevind in die Republiek van Suid-Afrika (van Tonder & Bolton, 1968; Worthington &

Bosman, 1968; van Tonder, 1979 a) die VSA (Livingstone & Hardy, 1964), Nieu-Seeland (Ekdahl, Money & Martin, 1968) en Brittanje (Jackson & White, 1982). Laasgenoemde isolasie was uit die semen van 'n Saanen-bok. Van Tonder (1979 b), wat by verre die meeste isolasies van A. seminis gemaak het, beskryf die organisme as biochemies onaktief, maar ook as een wat gewoonlik katalase positief en oksidase negatief is. Sy bevindinge ten opsigte van die groeivereistes van A. seminis het met die van Baynes & Simmons (1960) ooreengekom.

In die VSA was A. seminis maar een organisme wat met die probleem van epididimitis onder skaapramme in verband gebring is. Ander organismes soos Actinobacillus actinomycetem comitans, Corynebacterium pyogenes, C. pseudotuberculosis, Pseudomonas maltophila en Staphylococcus spp is ook gevind (DeLong, Waldhalm & Hall, 1979).

### 1.2 Epididimitis onder skaapramme in die Oranje-Vrystaat.

Gedurende die periode 1980-83 het de Wet (1981, 1983) 15215 skaapramme in die Oranje-Vrystaatstreek vir die voorkoms van epididimitis en vir patogene bakterieë in hul semen ondersoek. Van hierdie groep het 905 gevalle (5,9%) kliniese letsels getoon. Nie minder as 662 ramme (4,4%) het B. ovis uitgeskei terwyl 'n verdere 443 ramme (2,9%) se semen besmet was met Gram-negatiewe, pleomorfe organismes wat heel waarskynlik ook A. seminis ingesluit het.

### 1.3 Die taksonomie van A. seminis.

In hul beskrywings van A. seminis is Baynes & Simmons (1960), Livingstone & Hardy (1964), Worthington & Bosman (1968) en van Tonder (1979 b) dit eens dat die afsonder-

like selle 1-4  $\mu\text{m}$  lank en ongeveer 1  $\mu\text{m}$  breed is. Hulle is onbeweeglik. Kolonies van 24 uur oud wat op serum-agar gekweek is, is 1-2 mm in deursnee, konveks, rond en gryswit van kleur. Die 96 uur oue kolonie is nawelvormig, 4-5 mm in deursnee met 'n golwende rand en 'n gryswit sentrum.

Baynes & Simmons (1960) en Worthington & Bosman (1968) het die vermoë van A. seminis om verskillende suikers te metaboliseer, ondersoek. In die teenwoordigheid van Andrade se indikator was hul resultate deurgaans negatief. Van Tonder (1982) vind egter dat A. seminis wel glukose kan metaboliseer indien die organisme toegelaat word om vir 28 dae lank die suiker te dissimileer.

Dit is interessant om daarop te let dat Baynes & Simmons (1960), Worthington & Bosman (1968) asook van Tonder (1979) gevind het dat A. seminis swak en selfs onreëlmatig op media groei wat nie serum bevat nie. Nogtans is daar geen aanduidings dat enigeen van hulle die basale media waarin die verskillende suikers ingesluit is, met serum verryk het nie.

Een van die standaard toetse by die identifisering van bakteriese organismes is die metabolisme van glukose (Buchanan & Gibbons, 1974; Cowan, 1979). Wanneer 'n organisme glukose metaboliseer, is die vorming van pirodruiwesuur die noodwendige eindproduk waarvandaan metaboliete geproduseer kan word (Nester, Roberts, Pearsall & McCarthy, 1978; Brock, 1979). As deel van die metabolisme van enige ander heksose is die eerste noodwendige stap die transformasie van die heksose na glukose (Brock, 1979). Indien 'n organisme soos A. seminis glukose stadig dissimileer, kan dit verwag word dat ander suikers moei-

lik of glad nie afgebreek sal word nie. Aan die ander kant is dit seker logies om te redeneer dat geen organisme in staat sal wees om 'n suiker soos glukose te metaboliseer indien dit nie goed in die basale medium kan groei nie.

Deur bekende isolate van A. seminis in serumsop te suspendeer en van hul biochemiese reaksies in die API 20 E klassifikasiesisteen te ondersoek, kon Erasmus (1983) aantoon dat hierdie organismes wel suikers soos glukose, mannitol, inositol en arabinose kan metaboliseer. Deur hierdie gegewens aan numeriese taksonomie te onderwerp, kon hy ook beduidende verskille tussen A. seminis en P. haemolytica aantoon. Hierdie bevindinge ten opsigte van A. seminis het goed ooreengekom met die van Higgs, Godbout-DeLasalle, Messier, Couture & Lamothe (1981).

#### 1.4 Doelstelling van die ondersoek.

Daar is afdoende getuienis dat epididimitis van skaappramme ook in die Republiek van Suid-Afrika voorkom. In die Oranje-Vrystaat is skaapbrusellose skynbaar die belangrikste oorsaak van die letsel. Nogtans is daar aanduidings dat A. seminis ook hier 'n belangrike oorsaak van epididimitis kan wees.

Taksonomiese studies wat tot op datum op organismes soos A. seminis onderneem is, het belangrike tekortkominge. Volgens die beskikbare literatuur is die morfologie daarvan slegs deur middel van gewone ligmikroskopie na die aanwending van veral die Gram-kleurtegniek nagegaan. Die elektronmikroskoop is nog nooit vir so 'n ondersoek gebruik nie.

'n Probleem wat baie duidelik na vore getree het, is verskillende resultate ten opsigte van suikermetabolisme.

Waar van Tonder (1982) vind dat glukosemetabolisme baie stadig oor 28 dae plaasvind, stel Erasmus (1983) vas dat reaksies in die API 20 E klassifikasiesisteen binne 48 uur gelees kan word.

'n Tweede probleem het ontstaan toe Jansen (1980) afgelei het dat daar nie 'n organisme soos A. seminis bestaan nie, maar dat dit wat as A. seminis beskou word, niks anders as P. haemolytica is nie.

Die doel van die huidige ondersoek is dus drieledig. Eerstens word die morfologie van verskillende Gram-negatiewe, pleomorfe basille wat in die semen en skedes van ramme voorkom, elektronmikroskopies bestudeer. Onderzoek word ingestel na glukosemetabolisme deur hierdie organismes en derdens word daar tussen hulle onderskei op grond van geselekteerde biochemiese eienskappe.

#### 1.5 Metode van ondersoek.

Morfologiese eienskappe van organismes soos A. seminis, H. ovis en P. haemolytica is na die toepassing van negatiewe kleuring, elektronmikroskopies ondersoek. Omdat snitte van die organismes nie gemaak is nie, is daar nooit gepoog om 'n beskrywing van hul organelle te gee nie.

Om te bewys dat A. seminis glukose redelik maklik fermenteer, is drie metodes van ondersoek gebruik. As eerste stap is die organismes toegelaat om die glukose wat in serumverrykte Hugh & Leifson se medium opgelos is, af te breek. Die indikator in Hugh & Leifson se medium is broomtimolblou (Hugh & Leifson, 1953). Indien 'n betrokke isolaat nie soveel suur uit glukose kan produseer om die pH van die medium tot minder as 5,2 te verlaag nie, sou hierdie toets negatiewe resultate lewer. Behalwe vir Hugh & Leifson se medium, is glukosemetabolis-

me deur dieselfde isolate ook in serumverrykte fenolrooi-medium ondersoek. In hierdie geval is die kleuromslagpunt van die indikator slegs 6,8. Derdens is die metabolisme wat sommige isolate in glukosesop vorm, deur middel van gaschromatografie ondersoek.

Nadat die inligting ten opsigte van glukosemetabolisme bekend was, is daar van die biochemiese eienskappe van bekende isolate van A. seminis, H. ovis en P. haemolytica ondersoek. Bekende isolate van die genoemde organismes is gebruik om die reaksies van die onbekende isolate uit die semen en skedes van plaaslike ramme mee te vergelyk.

## HOOFSTUK 2

## WERKWYSE

2.1 Neem van monsters.

'n Kliniese ondersoek van die testes van plaaslike ramme is gemaak. Semen van ramme met epididimitis is deur middel van elektriese stimulasie getap volgens die beskrywing van Van Tonder, Bolton, Robertson & Greeff (1973). Sulke monsters is in wyebek McCartneybottels versamel.

Sedert Jansen (1981) aangetoon het dat die besmetting van ramme deur pleomorfe, Gram-negatiewe bakterieë waarskynlik deur die skedeopening plaasvind, is gesonde, nie-geslagsryp ramlammers ook by die ondersoek betrek. Van sulke lammers kon slegs skededeppers geneem word. Dit is gedoen nadat die lang hare van die voorhuid kortgeknip en dit deur middel van 70% alkohol ontsmet is. Omdat die skede van so 'n jong lam baie droog is, is steriele deppers (Staatslaboratorium vir patologie) eers in steriele gedistilleerde water gedoop. Daarna is dit in die lam se skede gesteek om organismes wat vry op die slymvliese en die penis lê, op te tel. Onmiddelik na monsterneming is die depper na Stuart se transportmedium (Biolab Chemicals) oorgedra en na die laboratorium vervoer.

2.2 Verwerking van monsters.

Beide die semenmonsters en die deppers is by ontvangs op sjokoladeagar (Cowan, 1979) uitgestryk en vir 72 uur lank by  $37^{\circ}\text{C}$  in die teenwoordigheid van 10%  $\text{CO}_2$  gekweek. Daarna is enkelkolonies wat aan die beskrywings van Baynes & Simmons (1960) en van Tonder (1979 b) voldoen het, naamlik nawelvormige kolonies met golwende rande en 'n deursnee van ongeveer 1-3 mm op sjokoladeagar uitgestryk.

### 2.3 Bekende organismes vir verwysingsdoeleindes.

Bekende isolate van A. actinomycetem comitans, A. seminis, H. ovis en P. haemolytica is verkry. Die isolaat van A. actinomycetem comitans is afkomstig van dr W.J. DeLong van die universiteit van Idaho in die VSA. Isolaat K3844C van A. seminis is voorsien deur mnr J.D. Connole van die Animal Research Institution, Yeerongpilly, Queensland in Australië. Dr E.M. van Tonder van die Veterinêre Streeklaboratorium te Middelburg, KP. het isolate 6201, 70/64, T981V en V350 van A. seminis voorsien. Alle isolate van P. haemolytica is van die Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde te Onderstepoort verkry.

### 2.4 Morfologiese ondersoek van die organismes.

#### 2.4.1 Ligmikroskopiese ondersoek.

Smere van tipiese kolonies is berei. Na droging en hittefiksasie is die Gram-kleurtegniek (Preston & Morrell, 1962) toegepas. Tydens die ondersoek van so 'n smeer is daar spesiaal gelet na die voorkoms van pleomorfisme en van bipolarêre eienskappe.

#### 2.4.2 Elektronmikroskopiese ondersoek.

Kulture van geselekteerde isolate is berei soos reeds beskryf. Na inkubasie vir 24 uur, 48 uur, 72 uur en 96 uur onderskeidelik by 37°C is enkelkolonies van elk van hierdie kulture vir elektronmikroskopiese ondersoek geneem. Vir so 'n ondersoek is negatiëwe kleuring met  $\frac{1}{2}\%$  uranielasetaatoplossing uitgevoer.

### 2.5 Glukosemetabolisme.

#### 2.5.1 Hugh & Leifson-medium.

Hugh & Leifson se oksidatiewe en fermentatiewe medium (Biolab Chemicals) is volgens voorskrif opgemaak.

Na die verhoging van die agarinhoud tot 1% deur die byvoeging van Oxoid nr. 1 agar (Protea Laboratory Services) asook die byvoeging van glukose om die konsentrasie daarvan tot 1% (m/v) te staan te bring, is die medium vir 10 min. lank by 115° C gesteriliseer. Daarna is dit tot by 45-50° C afgekoel, steriele perdeserum (1% v/v) bygevoeg en in 10 cm<sup>3</sup> bijoubotteltjies gegiet. Die botteltjies is skuins geplaas en die medium toegelaat om te stol. Sodoende is daar in elke botteltjie 'n skuins vlak en 'n diep kolf verkry. 'n Steriliteitstoets is op elke groep media gedoen deur dit vir minstens 48 uur lank by 37° C te inkubeer.

Organismes is op die skuinste uitgestryk en deur middel van 'n naaldsteek tot op die bodem, is daar van hulle tot diep in die kolf ingedra. Elke houer wat op hierdie wyse met 'n proeforganisme ingeënt is, is 144 uur lank by 37° C geïnkubeer. 'n Reaksie waar die kleur van die medium alleenlik aan die oppervlakte van groen na geel verander het, is as respiratief aangeteken. Indien die kleur van die kolf ook van groen na geel verander het, is die reaksie as fermentatief geneem.

#### 2.5.2 Gewysigde fenolrooi-sopmedium.

Fenolrooi-sopmedium (Biolab Chemicals) is volgens voorskrif opgemaak en gewysig deur die byvoeging van 1% (m/v) Oxoid nr. 1 agar (Protea Laboratory Services) asook 1% (v/v) steriele perdeserum. Om die metabolisme van glukose te kan aantoon is 1% (m/v) glukose ook by die medium gevoeg. Soos in die geval van Hugh & Leifson se medium is ook hierdie een in skuinsvlakke in 10. cm<sup>3</sup> bijoubotteltjies gegiet.

In gemodifiseerde fenolrooi-medium is die metabolisme van glukose as respiratief geneem as die kleur van die medium slegs aan die oppervlakte van rooi na geel verander het. Indien beide die oppervlakte en die kolf geel geword het, is die reaksie as fermentatief geneem.

### 2.5.3 Gaschromatografiese ondersoek.

#### 2.5.3.1 Voorbereiding van die medium.

'n Sop bestaande uit die volgende bestanddele is opgemaak (Lategan, du Preez & Potgieter, 1978):-

Proteose-peptoon (Difco)	_____	15g
Gisekstrak (Dico)	_____	5g
Glukose (Merck)	_____	5g
Gedistilleerde water	_____	1000ml
pH verstel na 7,2 - 7,4		

Die medium is vir 10 min lank by 115 °C gesteriliseer en tot by 45-50 °C afgekoel voordat 1% (v/v) steriele perdeserum bygevoeg is. Die steriele sopmedium is in 9 cm<sup>3</sup> volumes in bijoubotteltjies versprei, aan 'n steriliteits-toets onderwerp en by 4 °C in die donker bewaar.

#### 2.5.3.2 Gaschromatografiese ondersoek.

'n Suspensie van toetsorganismes is tot 'n digtheid van 4 op die McFarlandskaal (Branson, 1972) in proteose-peptoonsop (2.5.3.1) opgemaak. 'n Volume van 1 cm<sup>3</sup> hiervan is na 9 cm<sup>3</sup> proteose-peptoonsop oorgedra en 48 uur by 37 °C geïnkubeer. Kontrole medium sonder organismes is op dieselfde wyse behandel.

Na inkubasie is die selle vir 30 min by 3000xg uitgeswaai. By 1 cm<sup>3</sup> helder sop is 1 cm<sup>3</sup> 20% mieresuur volgens die voorskrifte van du Preez & Lategan (1976, 1978) gevoeg. Nou kon 3  $\mu$ l van hierdie mengsel in die enkelkolom van 'n 5380 A Hewlett Packard gaschromatograaf wat

met 'n vlamionisasie-detektor, en 'n elektroniese integreerder toegerus was, ingespuit word. Vir elke monster is 'n skeidingsperiode van 25 min toegelaat waarna die kolom met  $3 \mu\text{l}$  20% mieresuuroplossing uitgewas is.

Die kolom waardeur metabolietskeiding bewerkstellig is, was van glas vervaardig, 2 m lank en 3 mm binnedeur-snee én met Poropak N gepak. Stikstof, die draergas het teen 'n tempo van  $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  deur die kolom gevloei. Die kolomtemperatuur is konstant gehou by  $185^\circ \text{C}$ , die van die inlaat by  $220^\circ \text{C}$  en die detektor by  $240^\circ \text{C}$ .

Metaboliete wat op hierdie wyse geskei is, is geïdentifiseer deur die retensietye daarvan met die van standaard reagense, wat afsonderlik in die kolom ingespuit is, te vergelyk.

## 2.6 Biochemiese eienskappe van organismes soos getoets met die API 20 E klassifikasiesisteen.

Die metode waarvolgens hierdie deel van die ondersoek uitgevoer is, is volledig beskryf (Erasmus, 1983). Kortliks kom dit daarop neer dat kolonies met die tipiese voorkoms, nadat 'n kultuur vir 72 uur by  $37^\circ \text{C}$  op sjokoladeagar gekweek is, na steriele, normale soutoplossing oorgedra is om 'n suspensiedigtheid van 4 op die McFarlandskaal te gee (Branson, 1972). Die soutoplossing is verryk deur die byvoeging van 2% (v/v) steriele mensserum. Uit hierdie suspensie is volumes, soos aanbeveel deur die verspreiders (Ayerst), na die verskillende reagense in die API 20 E klassifikasiesisteen oorgedra. Alle reaksies is gelees nadat die strokies vir 48 uur by  $37^\circ \text{C}$  geïnkubeer is.

Die API 20 E klassifikasiesisteen wat vir die vinnige identifisering van die Enterobacteriaceae ontwerp is, het

broomkresolpers as indikator by die verskillende suikers. Broomkresolpers verander van bloupers tot geel wanneer die pH tot laer as 6,0 daal. As een van die Enterobacteriaceae 'n suiker metaboliseer, is die samestelling van die metaboliete sulks dat die pH van die betrokke medium tot minder as 6,0 daal. Sulke reaksies gaan gepaard met volledige kleuromslag van die indikator. Collins & Swanson (1981) het die API 20 E sisteem ook vir die identifisering van nie-Enterobacteriaceae aangewend. Hulle het 'n suikerreaksie as positief geneem as 'n oksidase-positiewe organisme die kleur van die indikator van bloupers na geelgroen kon verander tydens 48 uur inkubasie by 37 °C. Hierdeur slaag hulle (Swanson & Collins, 1981) daarin om minstens 62% van hul isolate wat uit organismes soos Acinetobacter anitratus, Actinobacillus spp. (A. seminis uitgesluit) en Pasteurella spp. bestaan het, korrek te identifiseer.

Soos later aangetoon sal word, is die organismes wat op hierdie verhandeling betrekking het, almal oksidase positief. Omdat hulle as nie-Enterobacteriaceae beskou word, is 'n suikerreaksie in die API 20 E sisteem dus as positief beskou indien die kleur van die indikator minstens na geelgroen verander het tydens die inkubasieperiode.

Die skrywer het bevind dat die oksidasetoets, soos dit op die API 20 E sisteem uitgevoer word, nie betroubare resultate lewer nie. Daarom is hierdie toets apart uitgevoer deur die gebruik van 'n 10% waterige oplossing van N,N,N,N-tetrametiel-p-fenileendiamien dihydrochloried (Kovacs, 1956). Reaksies is geïnterpreteer volgens die voorskrifte van Branson (1972).

## 2.7 Biochemiese eienskappe van toetsorganismes volgens standaard tegnieke.

### 2.7.1 Groeivereistes.

Tipiese, verteenwoordigende kolonies is vanaf sjokoladeagar oorgedra na elk van drie petribakkies met triptose-bloedagar (Biolab Chemicals) waarby 5% (v/v) steriele beesbloed gevoeg is. Die drie bakkies is onderskeidelik aëroob, anaëroob (Gaspak) en in die teenwoordigheid van 10% CO<sub>2</sub> vir 48 uur by 37° C gekweek. Al drie bakkies is vir groei en  $\beta$ -hemolise ondersoek.

Die groeivermoë van dieselfde isolate op MacConkey-agar is ook ondersoek na inkubasie vir 48 uur by 37° C.

### 2.7.2 Beweeglikheid en H<sub>2</sub>S-produksie.

SIM-medium (Difco) waarby daar, na die sterilisering van die basiese medium 1% (v/v) steriele perdeserum gevoeg is, is vir hierdie toetse gebruik. Soos voorheen is die reaksie na 48 uur inkubasie by 37° C gelees.

### 2.7.3 Oksidase-toets.

Kovacs (1956) se indirekte filtreerpapiertegniek is gebruik en geïnterpreteer volgens Branson (1972).

### 2.7.4 Katalase-toets.

Organismes is in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gesuspendeer. Slegs in gevalle waar gasvorming onmiddelik plaasgevind het, is die reaksie as katalase-positief aangeteken. Wanneer gasvorming afwesig was of waar gasvorming vertraag is, is die reaksie as katalase-negatief geneem.

### 2.7.5 ONPG-toets ( $\beta$ -galaktosidase sintese).

Genoeg ONPG (o-nitrofeniel- $\beta$ -D-galaktopiranosied) is in 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> opgemaak om 'n verhouding van 6,0g ONPG in 1000 cm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-oplossing te gee. Op sy beurt is die ONPG/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-oplossing met peptonwater vermeng om

'n verhouding van 250 cm<sup>3</sup> ONPG tot 750 cm<sup>3</sup> peptonwater te gee (Cowan, 1979). Nadat die substraat deur middel van drukfiltrasie gesteriliseer is, is dit in 2,5 cm<sup>3</sup> volumes in 10 cm<sup>3</sup> bijoubotteltjies versprei en vir hoogstens 30 dae by 4 °C bewaar.

Vir die toets is 'n ogie vol organismes in die substraat gesuspendeer en by 37 °C geïnkubeer. Alhoewel positiewe reaksies gewoonlik na 4 uur inkubasie verkry is, is die finale reaksie gewoonlik eers na 24 uur inkubasie gelees. 'n Reaksie is as positief beskou as die suspensie 'n donker geel kleur aangeneem het.

#### 2.7.6 Dekarboksilasie van aminosure.

Moller se substraat (Moller, 1955) is gebruik en opgemaak soos aanbeveel (Biolab Chemicals). Nadat die onderskeie aminosure n-lisien en ornitien bygevoeg is, is die pH tot 5,5 verstel en vir 10 min by 115 °C gesteriliseer. Terwyl die substraat nog warm was, is dit in 1,5 cm<sup>3</sup> volumes in bijoubotteltjies versprei en deur 'n lagie aptekersparaffien bedek. Sodoende kon die substraat onder anaërobe omstandighede bewaar word.

Wat die toets self betref, is Kilian & Frederiksen (1981) se aanbevelings by die ondersoek van Haemophilus spp gevolg. 'n Digte suspensie van organismes vanaf 'n agarplaat is gemaak en by 37 °C inkubeer. Met so 'n swaar inokulum kon die finale uitslag reeds binne 4 uur gelees word. 'n Positiewe reaksie is een waarby die substraat na 'n donkerpers kleur verander het.

#### 2.7.7 Suikermetabolisme.

"Suikers" wat in die ondersoek gebruik is, is:-

Monosakkariede

## (a) Pentoses

(i) (D-aldose) \_\_\_\_\_ arabinose

(ii) (D-ketose) \_\_\_\_\_ fruktose

## (b) Heksoses

(i) (D-aldoses) \_\_\_\_\_ glukose

\_\_\_\_\_ mannose

## Disakkariede

(i) sukrose

(ii) maltose

(iii) laktose

(iv) trehalose

## Alkohole

(i) mannitol

(ii) inositol

(iii) sorbitol

Elk van die genoemde koolhidrate is afsonderlik tot 'n konsentrasie van 1% (m/v) in fenolrooisop (Biolab Chemicals) opgemaak. Voordat die sop gesteriliseer is, is die pH daarvan tot 7,2 - 7,4 verstel deur die byvoeging van N NaOH. Na sterilisasie is die media afgekoel, in geskikte bijoubotteltjies versprei, aan 'n steriliteits-toets onderwerp en by kamertemperatuur gestoor.

Toetsorganismes is in 9 cm<sup>3</sup> voedingsop waarby 1 cm<sup>3</sup> steriele perdeserum gevoeg is, gesuspendeer om 'n digtheid van 4 op die McFarlandskaal (Branson, 1972) te gee. 'n Volume van 0,6 cm<sup>3</sup> van hierdie suspensie is na elk van die suikers oorgedra.

'n Positiewe reaksie is geneem as een waarvan die kleur van die medium van rooi na geel verander het tydens 48 uur inkubasie by 37°C, dws die pH van die medium moes tot laer as 6,8 gedaal het.

### 2.7.8 Voges-Proskauer toets.

Vir hierdie toets is 0,6 cm<sup>3</sup> van die suspensie soos beskryf in 2.7.7 na houers wat elk sowat 5 cm<sup>3</sup> MRVP toetsmedium (Cowan, 1979) bevat het, oorgedra. Na 'n inkubasie van vyf dae by 37<sup>o</sup> C is die teenwoordigheid van asetoïen in die medium deur middel van Barritt (1936) se tegniek, aangetoon.

### 2.7.9 Nitraatreduksie.

'n Volume van 0,6 cm<sup>3</sup> van die suspensie wat in 2.7.7 beskryf is, is oorgedra na 10 cm<sup>3</sup> steriele voeding-sop waarby 0,1% (m/v) NaNO<sub>3</sub> gevoeg is (Cowan, 1979). Na 'n broeiperiode van 48 uur by 37<sup>o</sup> C is die suspensie vir die teenwoordigheid van nitriet getoets deur die byvoeging van sulfanielsuur- en a-naftielamienreagense onderskeidelik. Die toets is gelees en geïnterpreteer volgens Branson (1972).

### 2.7.10 Indolproduksie.

Die medium van Arnold & Weaver (1948) wat uit 0,03% triptofaan, 0,1% pepton en 0,5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in gedistilleerde water (pH = 7,4) bestaan, is gebruik. Na die byvoeging van 0,6 cm<sup>3</sup> van die suspensie soos beskryf in 2.7.7, is die sop vir 48 uur by 37<sup>o</sup> C geïnkubeer. Die teenwoordigheid van indol is daarna aangetoon deur die byvoeging van Kovacs se reagens (Cowan, 1979).

### 2.7.11 Urease.

Ureasesop is volgens voorskrif opgemaak (Biolab Chemicals), met 0,6 cm<sup>3</sup> van die suspensie soos beskryf in 2.7.7 geïnkuleer, en vir 48 uur by 37<sup>o</sup> C geïnkubeer. Die eindresultaat is geïnterpreteer volgens Cowan (1979).

## HOOFSTUK 3

## RESULTATE MET KOMMENTAAR

3.1 Morfologie van organismes.

Beide A. seminis en H. ovis is Gram-negatiewe, pleomorfe bakterieë wat 1-4  $\mu\text{m}$  lank kan wees (Baynes & Simmons, 1960; Livingstone & Hardy, 1964; Worthington & Bosman, 1968; van Tonder, 1979 b). Die skrywer se ondervinding is dat lang selle veral in jong kulture voorkom. In ouer kulture het hierdie selle die neiging om te fragmenteer. Nou is die selle hoofsaaklik kort en vertoon bipolêre eienskappe.

Vir die doeleindes van hierdie verhandeling is bekende isolate van A. seminis nl. 6201, 70/64 en T981V elektronmikroskopies ondersoek. Hul morfologie is met die van H. ovis, P. haemolytica (Isolaat I29) asook met isolaat B11/65/1 uit die semen van 'n plaaslike ram vergelyk.

3.1.1 Bekende isolate van A. seminis.3.1.1.1 Isolaat 6201.

Selle, afkomstig van 'n 24 uur oue kolonie (Fig. 1) is pleomorf en sonder flagelle. Die lengte van die selle wissel tussen 0,8-3  $\mu\text{m}$ . Bipolêre eienskappe kan in die kort sowel as in sommige van die langer selle waargeneem word. Minstens twee van hierdie selle toon tekens van tweedeling.

Laasgenoemde verskynsel word duideliker in Fig. 2 uitgebeeld waar 'n 24 uur oue sel van sowat 3,8  $\mu\text{m}$  lank, besig is om in drie te verdeel. Die twee eindselle is elk naastenby 0,9  $\mu\text{m}$  lank. Dit is belangrik om te besef dat die kortste selle in Fig. 1 van dieselfde orde grootte is as die twee eindselle (Fig. 2). Hierdie verskynsel

ondersteun dit wat dikwels onder die ligmikroskoop waargeneem word, naamlik dat die lang selle die indruk skep dat dit uit 'n ketting van kort selle bestaan.

Selle uit 'n 48 uur kolonie (Fig. 3) kom nog goed ooreen met die uit die jonger kultuur (Fig. 2). Pleomorfisme kom nog steeds voor, bipolêre eienskappe is nog sigbaar en tekens van seldeling sonder dat die selle vanmekaar skei, is teenwoordig.

Dit is opvallend dat selle uit die 72 uur kolonie (Fig. 4) soveel uranielasetaat opgeneem het, dat daar nog minder van hul interne struktuur gesien kan word. Tweedens het die selle se breedte afgeneem van ongeveer  $0,06 \mu\text{m}$  (Fig. 1) tot  $0,03-0,05 \mu\text{m}$  (Fig. 4). 'n Foto van selle in 'n 96 uur kultuur is ook geneem, maar die kom so nou ooreen met dit wat reeds in Fig. 4 waargeneem is, dat plasing daarvan as oorbodig beskou word.

### 3.1.1.2 Isolaat 70/64

Veranderinge wat in selle van isolaat 70/64 gedurende 96 uur inkubasie plaasgevind het, word in Fig. 5-8 weergegee. Die mate van die 24 uur oue selle wat uitgebeeld word, is sowat  $0,9-2,5 \times 0,5-0,7 \mu\text{m}$ . Ook in hierdie geval toon die langste sel (Fig. 5) tekens dat dit besig is om in drie te deel. Twee van die nuwe selle is elk ongeveer  $0,7 \mu\text{m}$  lank terwyl die derde een naastenby  $0,9 \mu\text{m}$  lank is. Hier is ook geen tekens dat die selle vanmekaar skei of van bipolêre eienskappe nie.

Fig. 6 toon slegs twee normale selle uit 'n 48 uur oue kolonie. Die langste van die twee selle is  $5,4 \times 0,7 \mu\text{m}$ . In werklikheid bestaan dit uit twee afsonderlike selle wat onderskeidelik  $2,5$  en  $2,9 \mu\text{m}$  lank en aanmekaar geheg is. Die tweede sel op Fig. 6 se mate is min of meer

Isolaat 6201 van A. seminis

Fig. 1 24 uur oue kultuur, x13600



Fig. 3 48 uur oue kultuur, 13600



Fig. 4 72 uur oue kultuur, x13600

Fig. 2 24 uur oue  
kultuur, x3400

Isolaat 70/64 van A. seminis



Fig. 5 24 uur oue  
kultuur, x13600



Fig. 6 48 uur oue kultuur,  
x13600



Fig. 7 72 uur oue kultuur,  
x13600



Fig. 8 96 uur oue  
kultuur, x13600

1,2 x 0,05  $\mu\text{m}$ . Sy interne struktuur is sulks dat dit onder die ligmikroskoop bipolêre eienskappe behoort te vertoon.

Selle in die 72 uur oue kolonie van isolaat 70/64 (Fig. 7) is meestal van die kort tipe (0,9-1,1  $\mu\text{m}$  lank) met sterk bipolêre eienskappe. Geen tekens van tweedeling kan in die enkele lang sel van 3,0 x 0,07  $\mu\text{m}$  gesien word nie.

Soos voorheen is daar ongetwyfeld tekens van selverskrompeling en van 'n verhoogte opname van uranielase-taat by sommige van die selle in 'n 96 uur oue kultuur (Fig. 8). Die kort selle toon steeds bipolêre eienskappe, maar van die langste selle met afmetings van 3,8 x 0,04  $\mu\text{m}$  toon bepaald geen tekens van verdeling nie.

### 3.1.1.3 Isolaat T981V.

Soos in die geval van isolate 6201 en 70/64 bevat 24 uur, 48 uur, 72 uur en 96 uur oue kolonies van isolaat T981V van A. seminis ook pleomorfe selle (Fig. 9-12).

In die 24 uur oue kolonie is daar selle wat tussen 0,8 x 0,7  $\mu\text{m}$  en 2,4 x 0,9  $\mu\text{m}$  wissel (Fig. 9). In plaas van bipolêr, kan hierdie, bykans bolvormige selle as monopolêr beskou word. Aan die een pool van die langste sel in Fig. 9 is so 'n bolvormige sel besig om te vorm.

Monopolêre eienskappe is nog meer opvallend in die 48 en 72 uur oue kolonies (Fig. 10 en 11). In sferiese selle sal bipolêre eienskappe nie noodwendig so goed sigbaar wees soos in die geval van basille nie. Tot op hierdie stadium is dit dus nie seker dat die monopolêre eienskappe van isolaat T981V nie 'n blote optiese illusie is nie.

Isolaat T981V van A. seminis

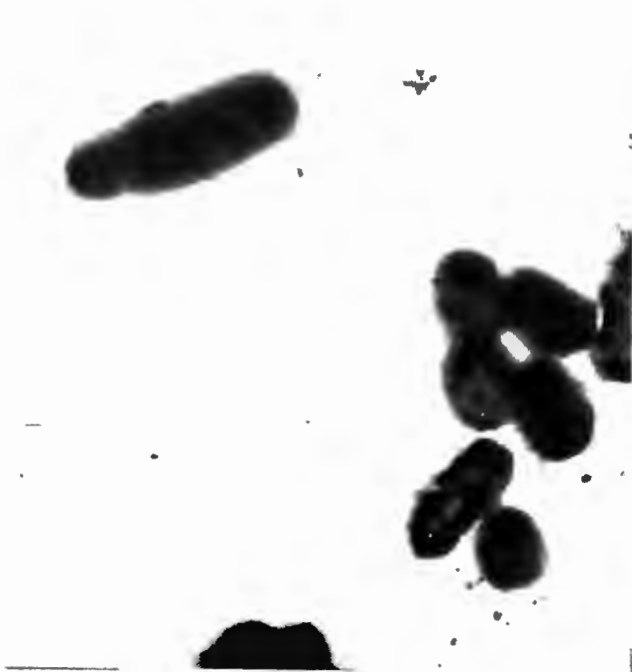


Fig. 9 24 uur oue kultuur,  
x13600

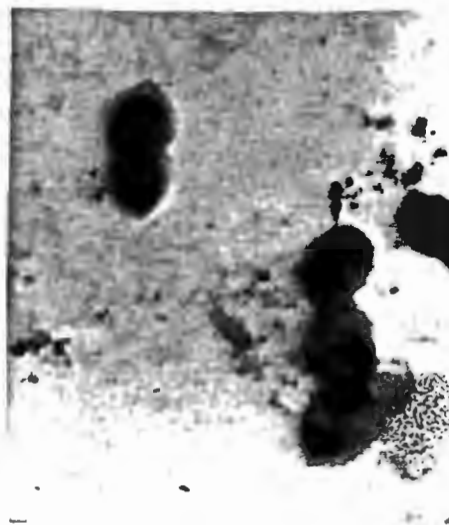


Fig. 10 48 uur oue  
kultuur, x13600



Fig. 11 72 uur oue kultuur,  
x13600



Fig. 12 96 uur oue  
kultuur, x13600

Afgesien daarvan dat selle van die 96 uur oue kolonie meer uranielasetaat opgeneem het as in die geval van die jonger selle, is die lang sel in Fig. 12 besig om te verskrompel.

#### 3.1.1.4 Morfologiese verband tussen die drie bekende isolate van A. seminis.

Pleomorfisme is 'n belangrike eienskap van al drie die isolate van A. seminis; tewens die selgrootte wissel tussen 0,8-5,4 x 0,03-0,9  $\mu\text{m}$ . Afgesien van isolaat T981V waar die kort selle skynbaar monopolêre eienskappe het, het die kort selle van die ander twee isolate opvallende bipolêre eienskappe. Veral in jong kulture is die langer selle gewoonlik in 'n fase van verdeling om twee tot drie selle te gee, maar sonder dat hulle werklik vanmekaar skei. Die laaste interessante eienskap van hierdie selle is dat hulle op 'n ouderdom van 96 uur al besig is om te verskromel. Dat hierdie verskynsel afsterwing mag wees, word gestaaf deur die feit dat lewensvatbare subkulture uit kulture van ouer as 96 uur baie moeilik gemaak kan word.

#### 3.1.2 H. ovis.

H. ovis se sterk pleomorfe eienskappe (Dodd & Hartley, 1955) kom in Fig. 13-16 na vore. In Fig. 13, waar selle in 'n 24 uur kultuur weergegee word, wissel hulle van 1,2 x 0,06 tot 2,2 x 0,08  $\mu\text{m}$ . Die enkele lang sel is ook besig met tweedeling en lewer twee selle van naastenby 1,0  $\mu\text{m}$  lank. Bipolêre eienskappe kom in die lang en die kort selle voor. Ook in Fig. 14 is 'n 24 uur oue sel van 3,4 x 0,6  $\mu\text{m}$  grootte besig om in drie te verdeel; 'n soortgelyke verskynsel kan gesien word in 'n 24 uur kultuur van isolaat 6201 van A. seminis (Fig. 2).

Bekende isolaat van H. ovis

Fig. 13 24 uur oue  
kultuur, x13600

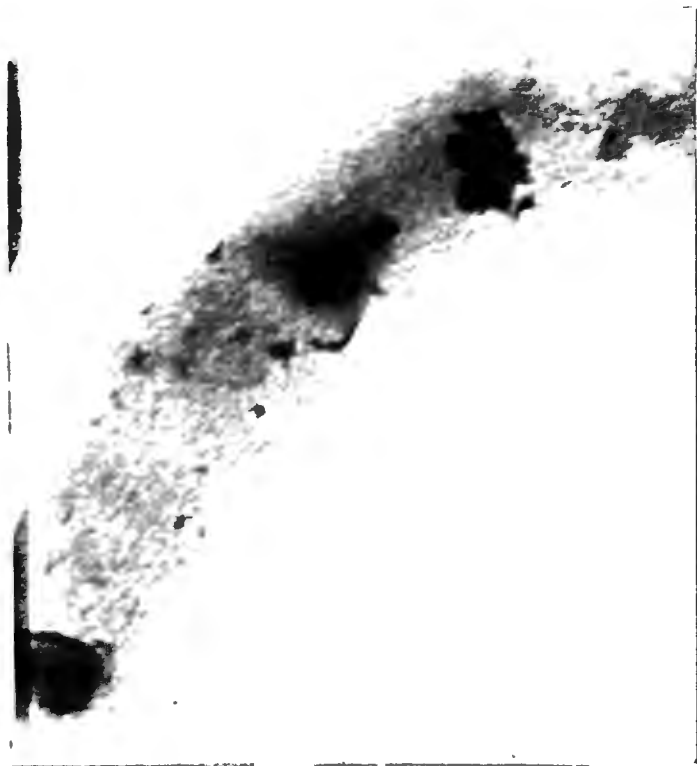


Fig. 14 24 uur oue kultuur, x42500

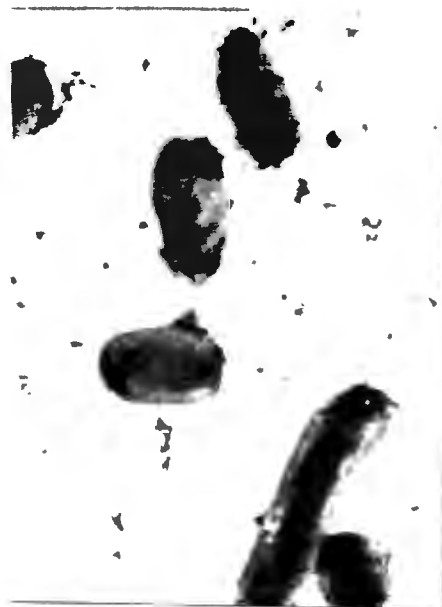


Fig. 15 48 uur oue  
kultuur, x13600

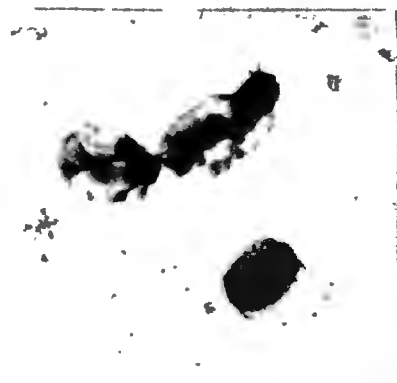


Fig. 16 72 uur oue  
kultuur, x13600

Sodra die sel 48 uur oud is, is pleomorfisme steeds sigbaar, maar die bipolarêre eienskappe het nou vir monopolêre eienskappe plek gemaak (Fig. 15). Laasgenoemde eienskap word nog sterker in selle van die 72 uur oue kultuur (Fig. 16) beklemtoon. Soos voorheen tree selverskrompeling en 'n verhoogde opname van uranielsulfaat by selle in die 96 uur oue kultuur in en word vervolgens nie getoon nie.

Soos A. seminis is H. ovis ook 'n pleomorfe organisme waarvan jong, lang selle verdeel om kort kettings te vorm. Selle toon ook bipolarêre en later monopolêre eienskappe en neig om in die 96 uur oue kolonies af te sterf.

### 3.1.3 Isolaat I29 van P. haemolytica.

Geoordeel aan Fig. 17 wissel selle in die 24 uur oue kolonie van  $0,7 \times 0,5$  tot  $1,9 \times 0,7 \mu\text{m}$ . Alhoewel een van die langer selle in so 'n kultuur hier uitgebeeld word, is die voorkoms daarvan volgens ligmikroskopiese ondersoek nie die reël nie. In hierdie geval (Fig. 17) kan bipolarêre eienskappe by die lang en kort selle waargeneem word.

By die 48 uur oue kultuur is selle van  $1,3 \times 0,7 \mu\text{m}$  die oorwegende tipe en is bipolarêre eienskappe minder opvallend (Fig. 18). Een van hierdie selle is besig met tweedeling (Fig. 18). Daar is in hierdie geval nie net insnoering soos in die geval van A. seminis en H. ovis nie, maar 'n duidelik sigbare dwarswand.

'n Verhoogde opname van uranielasetaat kom reeds in die 72 uur oue sel voor (Fig. 19) en verskrompeling in die 96 uur oue selle (Fig. 20).

Enkel selle van P. haemolytica is volgens hierdie gegewens kleiner as die van A. seminis. Hulle is minder

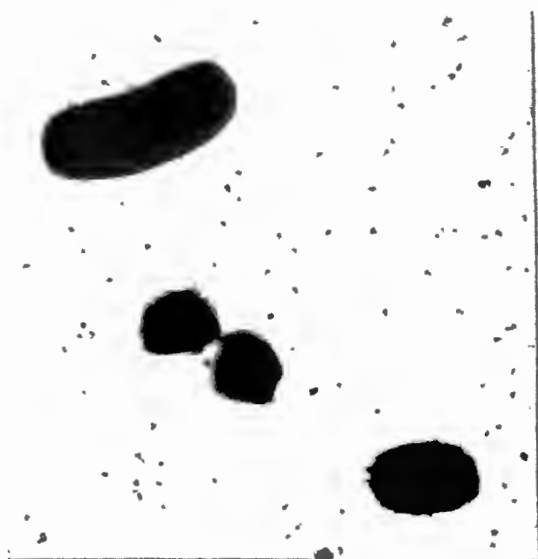
Isolaat I29 van P. haemolytica

Fig. 17 24 uur oue kultuur,  
x13600



Fig. 18 48 uur oue  
kultuur, x13600

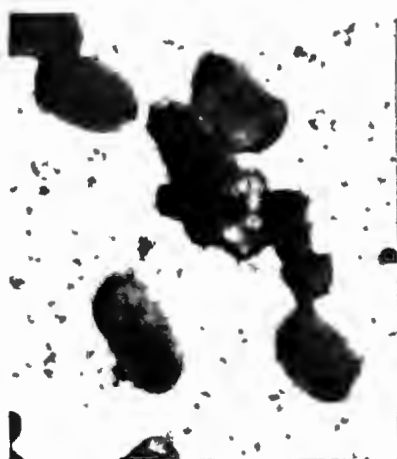


Fig. 19 72 uur oue  
kultuur, x13600



Fig. 20 96 uur oue  
kultuur, x13600

pleomorf, vertoon bipolêre eienskappe en begin ook om in 96 uur oue kulture verskrompel.

#### 3.1.4 Isolaat B11/65/1 uit semen van 'n plaaslike ram.

Selle in 'n 24 uur oue kultuur van isolaat B11/65/1 (Fig. 21) kan as kokko-basille met afmetings van  $0,7 \mu\text{m}$  deursnee tot  $0,8 \times 1,3 \mu\text{m}$  beskryf word. Sommige van hulle toon effense bipolêre eienskappe. Laasgenoemde eienskap tree veel sterker na vore in die 48 uur oue kultuur (Fig. 22). In die 72 en 96 uur oue kulture (Fig. 23, 24) neig die selle om meer rond te wees en verloor grootliks hul bipolêre voorkoms. Die 96 uur oue kultuur (Fig. 24) toon geen tekens van selverskrompeling nie.

Daar is op morfologiese gronde geen verwantskap tussen hierdie isolaat en óf A. seminis óf H. ovis nie, maar wel tussen hierdie isolaat en P. haemolytica.

### 3.2 Glukosemetabolisme.

#### 3.2.1 Aanwending van standaard tegnieke.

Twaalf verskillende organismes is vir hierdie deel van die ondersoek gebruik. Bekende isolate van A. seminis is 6201, K3844C en T981V. Plaaslike isolate van A. seminis (bevestiging van identifikasie word later gegee) is 207, 380, 2615, Jooste, PF 1005 en Roets en van P. haemolytica is 145, 213 en 472.

Die gekose isolate is primêr op sjokoladeagar gekweek. Sommige van die isolate (Tabel 1) is 24 uur later na gemodifiseerde Hugh & Leifson se medium asook na gemodifiseerde fenolrooimedium oorgedra. Die res van die isolate is vir 48 uur lank op vaste medium gekweek voordat kolonies na die twee glukose bevattende media oorgedra is. Reaksies wat gevolg het, word in Tabel 1 weergegee.

Veldisolaat B11/65/1



Fig. 21 24 uur oue  
kultuur, x13600



Fig. 22 48 uur oue kultuur, x13600



Fig. 23 72 uur oue  
kultuur, x13600



Fig. 24 96 uur oue  
kultuur, x13600

TABEL 1. GLUKOSEMETABOLISME DEUR VERSKILLENDE ISOLATE VAN A. SEMINIS EN  
P. HAEMOLYTICA (INKUBASIEPERIODES IN UUR).

Organisme	Isolaat	Ouderdom (uur)	Glukosemetabolisme op:-					Fenol rooi 24	
			Hugh & Leifson-medium						
			24	48	72	96	120		144
<u>A. seminis</u>	6201	48	-	-	F			F	
	T981V		-	-	F			F	
	K3844C	24	-	-	-	-	-	F	F
	Jooste		-	-	-	-	-	F	F
	207	48	-	-	F			F	
	PF1005		-	-	F			F	
	Roets		-	F				F	
	Jooste		-	F				F	
	380	24	-	-	-	-	F		F
	2615		-	-	-	-	-	F	F
<u>P. haemolytica</u>	145	24	F						
	213		F						
	472		F						

-: Geen reaksie

F: Glukose gemetaboliseer deur fermentasie

\*: Ouderdom van isolaat op vaste medium

A. seminis en P. haemolytica metaboliseer glukose deur middel van fermentasie (Tabel 1). Beide organismes kan so 'n reaksie binne 24 uur teweegbring indien hulle in fenolrooimediuim geplaas word. Dit is ook die periode wat P. haemolytica nodig het om die glukose in Hugh & Leifson se mediuim te fermenteer. As 24 uur oue kolonies van A. seminis na gemodifiseerde Hugh & Leifson se mediuim oorgedra word, vind glukosemetabolisme wel plaas, maar eers na 'n tydsverloop van 120-144 uur. Indien so 'n kolonie 48 uur oud is, is slegs 48-72 uur nodig om die glukose in Hugh & Leifson se mediuim te fermenteer.

### 3.2.2 Die aanwending van gaschromatografie.

Steriele proteosepeptonmediuim wat gebruik is vir die produksie van metaboliete deur die gekose isolate, het drie belangrike byprodukte bevat nl. n-butanol, etielasetaat en asynsuur. Die konsentrasies daarvan was 368 mg.  $\text{cm}^{-3}$ , 196 mg.  $\text{cm}^{-3}$  en 554 mg.  $\text{cm}^{-3}$  onderskeidelik. Nadat isolate van A. seminis vir 48 uur lank in hierdie mediuim gegroei het, was dit veral die drie genoemde produkte wat opvallende veranderinge in konsentrasie ondergaan het (Tabel 2). Laasgenoemde gegewens word ook grafies in Fig. 25 weergegee.

Die konsentrasies van die metaboliete wat verskillende isolate van A. seminis tydens die metabolisme van glukose geproduseer het, was gewoonlik baie laag. Etielasetaat, die mees prominente van hierdie produkte, het nooit 236 mg.  $\ell^{-1}$  of 0,024% oorskrei nie. Terselfdertyd is maksimum konsentrasies van 25 mg n-butanol.  $\ell^{-1}$  en 52 mg asynsuur.  $\ell^{-1}$  verkry. 'n Isolaat soos T981V kon weer al drie hierdie metaboliete verbruik.

Van die drie produkte is dit slegs asynsuur wat 'n

TABEL 2. METABOLIETE WAT VERSKILLENDE ISOLATE VAN A. SEMINIS  
 IN PROTEOSEPEPTOONMEDIUM PRODUSEER OF VERBRUIK ( ALLE  
 KONSENTRASIES IS MG.  $l^{-1}$  )

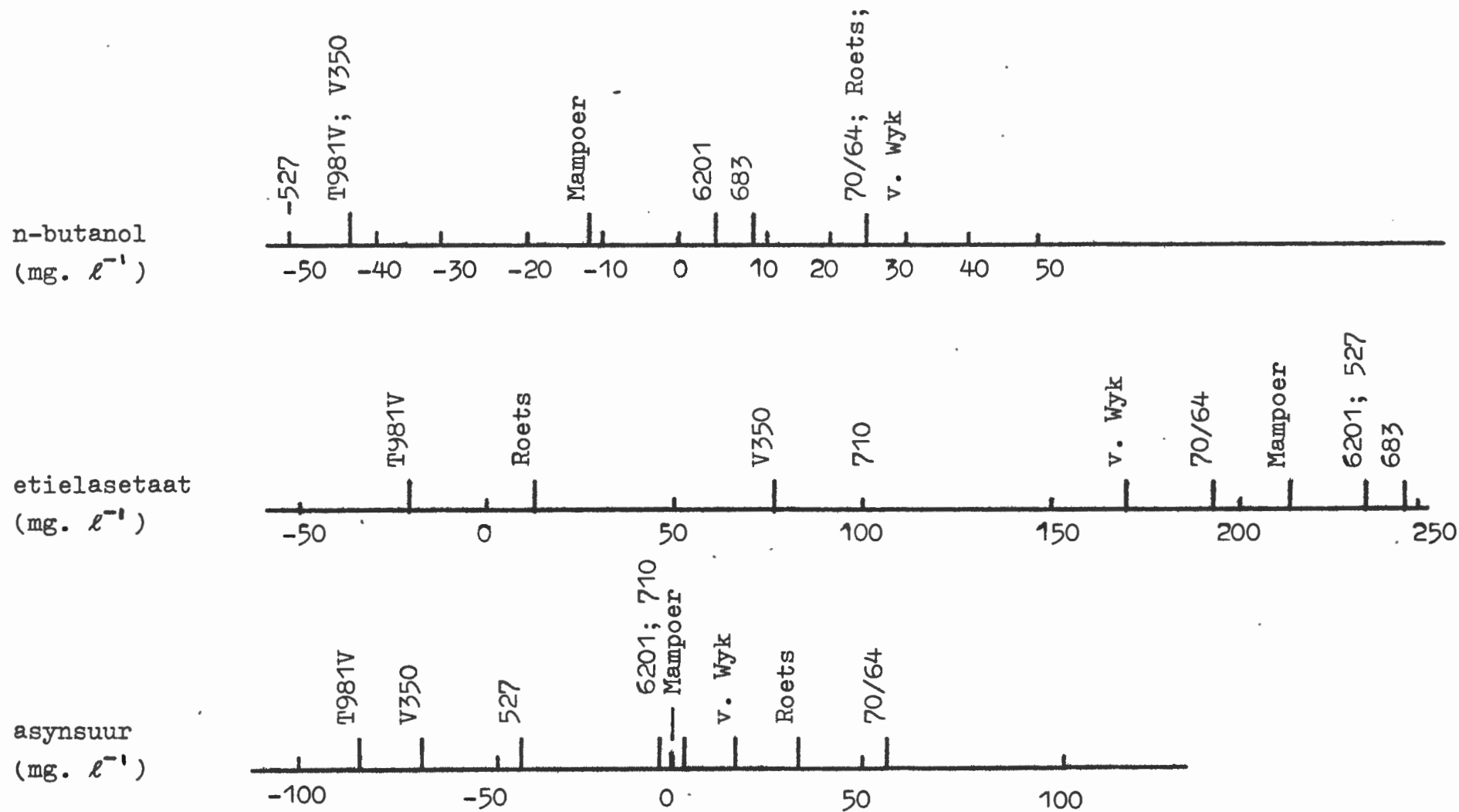
Isolaat	Konsentrasie in medium			Hoeveelheid gevorm of verbruik		
	n-buta- nol	etiel- asetaat	asynsuur	n-buta- nol	etiel- asetaat	asynsuur
6201*	370	419	556	+2	+223	+2
70/64*	394	389	606	+26	+193	+52
T981V*	324	175	475	-44	-21	-80
V350*	325	271	491	-43	+75	-63
527	318	418	505	-50	+222	-49
683	375	432	565	+7	+236	+11
710	350	302	553	-18	+106	-1
Mampoer	360	403	549	-8	+207	+5
Roets	393	202	593	+25	+6	+39
van Wyk	394	356	582	+26	+160	+28

+: Produkte geproduseer deur 'n isolaat.

-: Produkte verbruik deur 'n isolaat.

\*: Bekende isolate van A. seminis.

Fig. 25 n Grafiese voorstelling van die belangrikste metaboliete wat A. seminis tydens die metabolisme van glukose produseer of verbruik.



betekenisvolle daling op die pH van die medium kan hê.

As die klein hoeveelheid asynsuur wat A. seminis tydens die fermentasie van glukose in ag geneem word, moet hierdie organisme as 'n swak fermenteerder beskryf word.

### 3.3 Die API 20 E klassifikasiesisteen by die identifisering van A. seminis.

#### 3.3.1 Bekende isolate van A. seminis, A. actinomycetem comitans en P. haemolytica.

Bekende isolate van A. seminis nl. 6201, 70/64, K3844C, T981V en V350 is gebruik. Die reaksies van hierdie isolate in die API 20 E klassifikasiesisteen asook die van A. actinomycetem comitans en van P. haemolytica word in Tabel 3 vergelyk.

Daar is ooglopende verskille en ooreenkomste tussen die organismes wat in Tabel 3 met mekaar vergelyk word. Nie een van die bekende isolate van A. seminis asook A. actinomycetem comitans kon  $\beta$ -galaktosidase sintetiseer nie. Al die bekende isolate van P. haemolytica kon  $\beta$ -galaktosidase produseer. Die voorbeelde van A. seminis en A. actinomycetem comitans kon almal ornitien dekarboksileer, terwyl nie 'n enkele isolaat van P. haemolytica daartoe in staat was nie.

Soos verwag kon word, kon die betrokke isolate almal glukose metaboliseer (Tabel 3). P. haemolytica het suikrose konsikwent gemetaboliseer, maar origins was die resultate met die verskillende suikers wisselend.

Alle isolate kon nitraat reduceer en was beide oksidase en katalase positief. Die uitsondering was isolaat V350 van A. seminis wat katalase negatief was. Wat die produksie van asetoeien betref, is wisselende resultate verkry.

TABEL 3. REAKSIES DEUR BEKENDE ISOLATE VAN A. ACTINOMYCETEM COMITANS,  
A. SEMINIS EN P. HAEMOLYTICA IN DIE API 20 E KLASSIFIKASIE-  
 SISTEEM.

Toets	<u>A. seminis</u>					A.a.c.	<u>P. haemolytica</u>				
	6201	70/64	K3844C	T981V	V350		Bok	Skaap	Vark	I29	KC282
ONPG	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ADL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Sitraat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Gelatien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Rhaminose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sukrose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Arabinose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Nitraat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ONPG:  $\beta$ -galaktosidase sintese ; ADL: Arginien dihidrolasie; LDC: Lisien dekarok-  
 silasie; ODC: Ornitien dekarboksilasie; TDA Triptofaan deaminasie; VP: Voges-  
 Proskauer; A. actino com.: Actinobacillus actinomycetem comitans

Volgens hierdie gegewens kon duidelike verskille tussen bekende isolate van A. seminis en A. actinomycetem comitans nie gevind word nie. Daarom lei Erasmus (1983) af dat hierdie twee organismes in werklikheid dieselfde behoort te wees. P. haemolytica is duidelik verskillend hiervan aangesien dit nie net ONPG positief is nie, maar ook konsikwent sukrose en mannitol kan metaboliseer.

### 3.3.2 Organismes uit die semen en skedes van plaaslike ramme.

Na aanleiding van die resultate wat met bekende isolate van A. actinomycetem comitans, A. seminis en P. haemolytica behaal is, is dieselfde prosedure ook op isolate uit die semen en skedes van plaaslike ramme herhaal. Slegs die belangrikste resultate verskyn in Tabel 4.

Die betrokke isolate was almal Gram-negatiwe, pleomorfe organismes wat glukose metaboliseer, nitraat reduceer en beide oksidase en katalase positief was; eienskappe wat hul verwantskap beklemtoon. Aangesien die eerste 15 isolate (Tabel 4) ONPG negatief was, ornitien kon dekarboksileer en nie sukrose kon metaboliseer nie is hulle, na aanleiding van die gegewens in Tabel 3 as A. seminis/A. actinomycetem comitans beskou. 'n Tweede groep van vyf isolate (Tabel 4) nl. 129, 1033, 1050, 1176 en 1232 deel weer eienskappe van A. seminis en P. haemolytica tewete die metabolisme van glukose, asook positiewe katalase- en oksidasereaksies. Soos A. seminis dekarboksileer hulle ornitien en soos P. haemolytica produseer hulle  $\beta$ -galaktosidase en metaboliseer sukrose (uitsonderings is isolate 1050 en 1176). Teenoor hierdie groepie staan 'n volgende vier isolate

TABEL 4. REAKSIËS VAN 23 VERSKILLENDIGE ISOLATE  
UIT DIE SEMEN EN SKEDES VAN RAMME  
VOLGENS DIE API 20 E KLASSIFIKASIESISTEEM

Isolaat	ONPG	ODC	GLU	SUK	KAT	OKS	(NO <sub>3</sub> )
906	-	+	+	-	+	+	+
912	-	+	+	-	+	+	+
916	-	+	+	-	+	+	+
923	-	+	+	-	+	+	+
932	-	+	+	-	+	+	+
955	-	+	+	-	+	+	+
977	-	+	+	-	+	+	+
1001	-	+	+	-	+	+	+
1081	-	+	+	-	+	+	+
1095	-	+	+	-	+	+	+
1100	-	+	+	-	+	+	+
1434	-	+	+	-	+	+	+
1521	-	+	+	-	+	+	+
Boshoff	-	+	+	-	+	+	+
Engelbrecht	-	+	+	-	+	+	+
129	+	+	+	+	+	+	+
1033	+	+	+	+	+	+	+
1050	+	+	+	-	+	+	+
1176	+	+	+	-	+	+	+
1232	+	+	+	+	+	+	+
1861	+	-	+	+	+	+	+
1863	+	-	+	+	+	+	+
1870	+	-	+	+	+	+	+
1879	+	-	+	-	+	+	+

ONPG:  $\beta$ -galaktosidase sintese; ODC: Ornities dekarboksie;

GLU: Glukose; SUK: Sukrose; KAT: Katalase;

OKS: Oksidase; (NO<sub>3</sub>): Nitraatreduksie.

nl. 1861, 1863, 1870 en 1879 (Tabel 4) wat 'n goeie ooreenkoms met die eienskappe van P. haemolytica toon.

Hierdie gegewens is aanduidend dat die 24 gekose isolate uit minstens drie tipes van organismes bestaan, naamlik een groep wat goed vergelyk met bekende isolate van A. seminis/A. actinomycetem comitans, 'n tweede groep wat vergelykbaar is met P. haemolytica en 'n derde groep wat tussen die genoemde twee geplaas kan word.

'n Welbekende eienskap van A. seminis is dat dit nie op MacConkey-agar groei nie (Baynes & Simmons, 1960; van Tonder & Bolton, 1968; Worthington & Bosman, 1968). P. haemolytica groei weer op MacConkey-agar (Smith, 1975). Deur ook hierdie eienskap in berekening te bring, kan die 24 isolate van Tabel 4 asook die bekende isolate in Tabel 3 herrangskik word soos voorgestel in Fig. 26.

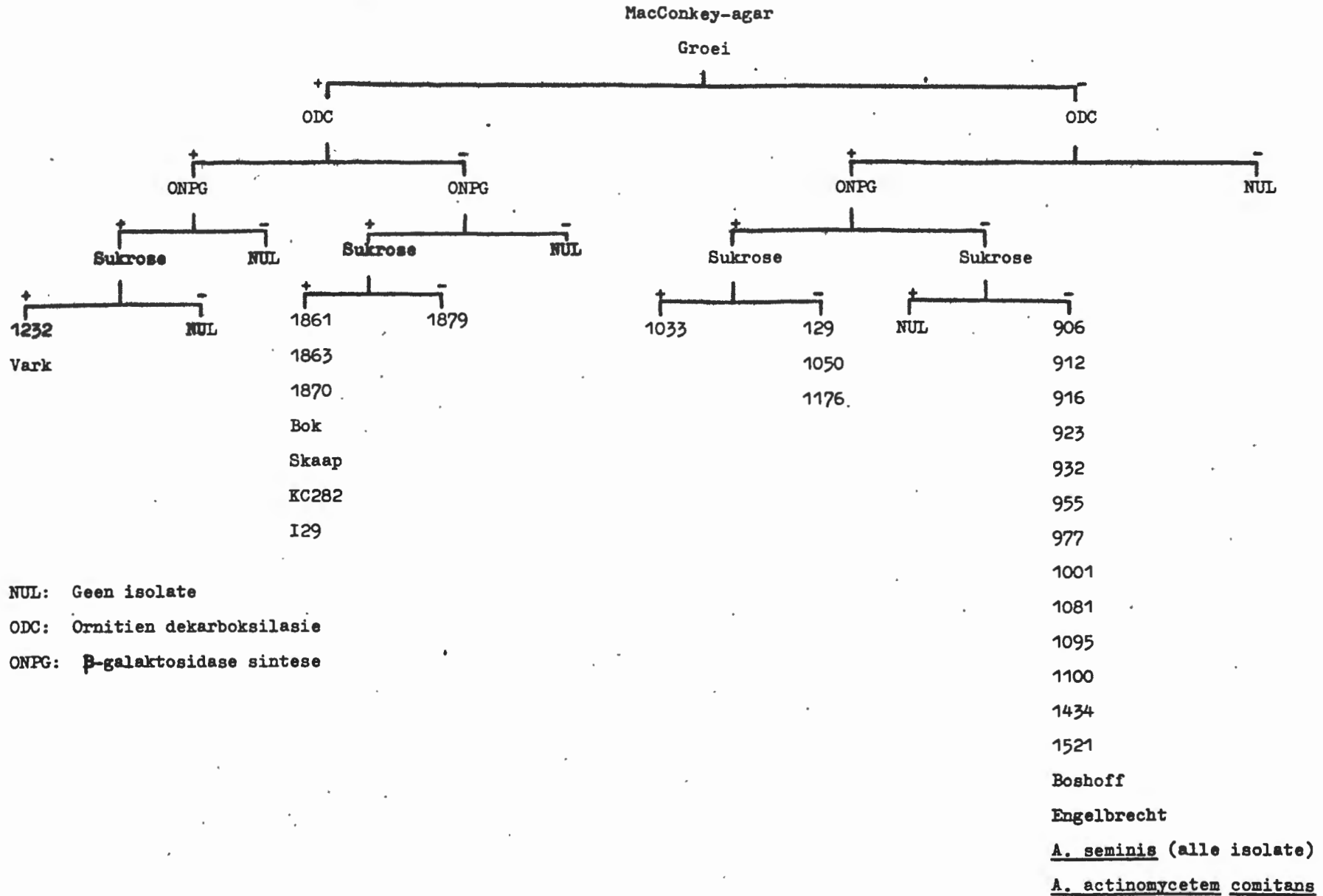
Slegs 10 van hierdie 35 isolate kon op MacConkey-agar groei. Hierdie 10 isolate het onder andere die bekende isolate van P. haemolytica ingesluit. Die grootste deel van die monster naamlik 21 isolate kon saam met die bekende isolate van A. actinomycetem comitans en A. seminis in dieselfde groep geplaas word. Soos voorheen kon 'n klein groepie van vier isolate naamlik 129, 1033, 1050 en 1176 tussen P. haemolytica en A. actinomycetem comitans/A. seminis geplaas word, maar omdat hulle nie op MacConkey-agar kon groei nie, lê hierdie groepie waarskynlik nader aan A. seminis as aan P. haemolytica.

### 3.4 Biochemiese eienskappe van bekende en onbekende isolate deur middel van standaard tegnieke.

#### 3.4.1 'n Basiese klassifikasie.

Sommige eienskappe van bekende isolate van A. actinomycetem comitans, A. seminis en P. haemolytica

FIG. 26 GROEFERING VAN ISOLATE UIT DIE SEMEN EN SKEDES VAN RAMME NA AANWENDING VAN DIE API 20 E KLASIFIKASIESISTEEM ASOOK GROEI OP MACCONKEY-AGAR



is met die van 98 isolate uit die semen en skedes van plaaslike ramme vergelyk. Hierdie gegewens word in Bylae 1 opgesom.

Die skema waarvolgens die verskillende isolate geklassifiseer is, is min of meer dieselfde as wat Cowan (1979) vir die Gram-negatiewe organismes voorgestel het. Laasgenoemde skema maak egter nie onderskeid tussen pleomorfe en nie-pleomorfe organismes nie. Groei op MacConkey-agar verskyn of laer in die hirargie of word gladnie aangewend nie.

Afgesien van pleomorfisme wat die betrokke isolaat in twee hoof groepe verdeel, deel hulle almal eienskappe soos groei onder anaërobe toestande en in 10% CO<sub>2</sub>, die fermentasie van glukose asook positiewe oksidase reaksies. Deur verder van eienskappe soos groei in 'n aërobe atmosfeer, die dekarboksilasie van ornitien en lisien, die ONPG-reaksie asook groei op MacConkey-agar gebruik te maak, kan hierdie organismes in 14 verskillende groepe ingedeel word waarvan minstens ses groepe 10 isolate of meer bevat.

Organismes in groep 1 (Bylaag 1) groei almal op MacConkey-agar. Alhoewel hulle pleomorf was, kon hulle dus nie as A. seminis of A. actinomycetem comitans geklassifiseer word nie.

Toe die bekende isolate van A. seminis en A. actinomycetem comitans deur middel van die API 20 E klassifikasiesisteen ondersoek is, is gevind dat hulle ONPG negatief reageer (Tabel 3). Deur middel van standaard tegnieke egter blyk dit dat isolate 6201, 70/64 en K3844C van A. seminis positiewe ONPG-toetse lewer terwyl isolaat T981V van A. seminis en A. actinomycetem

comitans ONPG negatief reageer.

In vergelyking met die reeds genoemde organismes, vorm H. ovis en isolaat V350 van A. seminis ongetwyfeld 'n aparte groep (Bylaag 1). Beide van hulle groei nie onder aërobe toestande nie en reageer katalase negatief. Hulle dekarboksileer ook ornitien, maar is almal ONPG negatief. Verder dekarboksileer H. ovis ook lisien; 'n reaksie wat nie by isolaat V350 van A. seminis gevind is nie. Alhoewel daar, volgens hierdie gegewens, 'n noue verband tussen H. ovis en isolaat V350 van A. seminis is, skyn dit tog nie of hulle as dieselfde spesie beskou kan word nie.

Soos verwag kon word, verskil die bekende isolaat van P. haemolytica (Groep 6; Bylaag 1) radikaal van die res.

#### 3.4.2 Ander biochemiese eienskappe.

Ander biochemiese eienskappe van organismes in drie van die groepe in Bylaag 1, word in Tabel 5 opgesom.

Dit is duidelik uit Tabel 5 dat sekondêre toetse wat aangewend is nie gehelp het om 'n fyner indeling van die bestaande groepe te bewerkstellig nie.

TABEL 5. ANDER BIOCHEMIESE EIENSKAPPE VAN GRAM-NEGATIEWE PLEOMORFE ORGANISMES UIT DIE SEMEN EN SKEDES VAN SKAAPPRAMME (GROEPE VERWYS NA BYLAAG 1).

Toets	Aantal positiewe reaksies deur organismes in		
	Groep 1	Groep 2	Groep 3
Urease	0	0	0
Indol	0	0	0
VP	5	6	4
Nitraat	10	4	6
Arabinose	9	8	8
Fruktose	10	7	10
Glukose	10	8	10
Mannose	0	0	0
Maltose	6	8	7
Sukrose	3	1	8
Trehalose	1	0	0
Laktose	0	0	0
Mannitol	9	7	10
Sorbitol	8	1	5
Inositol	2	7	4
Isolate getoets	10	8	10

## HOOFSTUK 4

## BESPREKING

Pleomorfisme word gedefinieer as 'n variasie in die grootte en vorm tussen individuele selle in 'n suiwer kultuur (Singleton & Sainsbury, 1978). Teenoor hierdie definisie staan die gedagte van monomorfisme wat suggereer dat organismes met verskillende vorm van verskillende spesies afkomstig is (Carpenter, 1967).

Pas nadat 'n organisme in 'n kunsmatige medium geplaas word, vind verdubbeling van die selle nie onmiddelik volgens die generasietyd van die genus plaas nie. In plaas daarvan bly die bevolkingsgetal tydelik onveranderd terwyl individuele selle tot twee of drie keer hul normale lengte kan word (Salle, 1973; Volk & Wheeler, 1973; Pelczar, Reid & Chan, 1977). Sodoende kan die verskynsel van pleomorfisme 'n bloot normale verskynsel wees. Tydens die sloerfase is dit nie net die morfologie van die organisme wat geraak word nie, want terwyl hulle fisiologies aktief is in die sintese van nuwe protoplasma, kan hulle 'n tekort aan ensieme en ko-ensieme ondervind; 'n toestand wat verhoed dat so 'n sel chemies optimaal kan funksioneer (Pelczar, Reid & Chan, 1977; Brock, 1979).

Dit is bekend dat bakterieë tydelike variasie, waarvan morfologiese variasie 'n voorbeeld is, kan ondergaan (Carpenter, 1967). So is Bacillus anthracis gekapseld terwyl dit in dierlike weefsel voorkom, maar ongekapseld op kunsmatige medium (Henning, 1956). Arthrobacter en Rhizobium spp, organismes van landboukundige belang, is reëlmatige basilli in hul natuurlike habitat, maar pleomorf op kunsmatige medium (Pelczar, Reid & Chan, 1977). Die ondervinding het geleer dat A. seminis en

H. ovis ook reëlmatige basille is terwyl hulle in hul natuurlike omgewing, naamlik ramsemen verkeer. Pleomor- fisme ontwikkel sodra hulle op kunsmatige medium gekweek word. Hierdie eienskap verdwyn grootliks namate so 'n kultuur ouer word.

Wat glukosemetabolisme betref, kan beide A. seminis en H. ovis as swak fermenteerders beskou word. Selle uit 'n jong kultuur kan glukose nie vinnig fermenteer nie. Daarenteen kan ouer selle hierdie proses veel vinniger voltooi.

Hierdie twee eienskappe, naamlik pleomorfisme en die wyse waarop glukosemetabolisme plaasvind, is eers- tens aanduidend daarvan dat A. seminis en H. ovis rede- like lang sloerfases het. Omdat pleomorfisme eers na vore kom wanneer hulle op kunsmatige medium groei, kan dit ongetwyfeld afgelei word dat tydelike variasie die be- langrikste oorsaak van hierdie verskynsel is. Alvorens 'n volledige studie van die morfologie van A. seminis en H. ovis op 'n verskeidenheid van media gemaak is, kan 'n finale uitspraak egter nie oor hierdie deel van die pro- bleem gemaak word nie.

In preparate wat van besmette dierlike weefsel ge- maak word, bestaan die selle van Pasteurella spp uit kort basille met bipolêre eienskappe. Hulle metaboli- seer glukose deur middel van fermentasie. Verder produ- seer hulle ook katalase en oksidase (Smith, 1975). Actinobacillus spp. word ook as basille met sferiese elemente wat dikwels aan een pool van so 'n sel voorkom, beskryf. Hierdie samestelling gee aan die sel 'n tipiese morsekode vorm (Holt, 1977). Wat sy verdere basiese kenmerk betref, is Actinobacillus spp. fermentatief,

katalase positief, maar oksidase negatief (Smith, 1975).

Die tipiese morsekode vorm is minstens in een iso-  
laat van A. seminis waargeneem, maar eers na die aanwen-  
ding van elektronmikroskopie. Bipolêre eienskappe was  
deurgaans so duidelik dat hierdie eienskap ook met die  
gewone ligmikroskoop waargeneem kon word. Wat bioche-  
miese eienskappe betref, kon al die isolate wat in hierdie  
studie gebruik is, glukose fermenteer. Hulle was almal  
oksidase positief en met die uitsondering van H. ovis,  
ook katalase positief. Weens hierdie verskynsels moet  
dit afgelei word dat die Gram-negatiewe, pleomorfe or-  
ganismes wat uit die semen en skedes van skaapramme ver-  
kry word, verwant is aan Pasteurella spp. Hierdie gedag-  
te is nie vreemd nie, aangesien Bohacek & Mraz (1967) in  
'n studie van die basissamestelling van die genoom die  
verwantskap tussen Actinobacillus spp. en P. haemolytica  
aangetoon het. Ook Smith (1975) beklemtoon hierdie ver-  
wantskap.

Wanneer die API 20 E klassifikasiesistiem ingespan  
word om die Gram-negatiewe, pleomorfe bakterieë in die  
geslagstelsel van skaapramme te identifiseer, lyk dit of  
daardie organismes wat nie op MacConkey-agar groei nie,  
op grond van die sintese van die ensiem  $\beta$ -galaktosidase  
in twee groepe verdeel kan word. Die organismes wat  
hierdie ensiem nie kan sintetiseer nie, is volgens die  
monster wat voor hande was, nie net die grootste in getal  
nie, maar sluit ook al die bekende isolate van  
A. actinomycetem comitans en A. seminis in. Omdat eers-  
genoemde reeds 'n internasionale erkende organisme is,  
sou dit sekerlik aanvaarbaar kon wees om af te lei dat  
sommige van die bekende isolate van A. seminis in der  
waarheid dieselfde as A. actinomycetem comitans is.

As daar aan die ander kant na die Gram-negatiewe pleomorfe organismes wat op MacConkey-agar groei gekyk word, blyk dit dat die bekende isolate van P. haemolytica wat gebruik is, almal hieronder groepeer en dat die meeste van hulle nie ornitien dekarboksileer nie, maar wel B-galaktosidase kon sintetiseer. Een van die bekende isolate van P. haemolytica asook een van die veldisolate wat op MacConkey-agar groei, kon ook ornitien dekarboksileer; 'n eienskap wat wel by P. haemolytica gevind kon word (Smith, 1975).

Deur die aanwending van standaard tegnieke blyk dit dat isolaat V350 van A. seminis asook H. ovis katalase negatief toets. Hulle groei ook nie op vaste medium onder aërobe toestande nie. Daarom kan hulle nie saam met die ander bekende isolate van A. seminis en A. actinomycetem comitans in dieselfde groep geplaas word nie. Behalwe dat H. ovis lisien kon dekarboksileer en isolaat V350 van A. seminis nie, was die biochemiese eienskappe van die twee isolate wat wel beskou is, dieselfde. Hiervolgens is dit nog nie duidelik of die twee isolate wel as dieselfde spesie geneem behoort te word nie. Elektroforese van die sitoplasmiese proteïene van hierdie organismes behoort 'n positiewe antwoord op hierdie vraag te gee.

Indien slegs die resultaat van die ONPG-toets voldoende sou wees om tussen twee spesies te onderskei, kan die bekende isolate van A. seminis in twee verskillende spesies ingedeel word. Weens hul sintese van B-galaktosidase is isolaat K3844C uit Australië waarskynlik dieselfde as isolate 6201 en-70/64 wat uit die Republiek van Suid-Afrika afkomstig is. Op grond van 'n negatiewe ONPG-toets kan isolaat T981V van A. seminis weer met A. actinomycetem comitans vergelyk word. Onge-

lukkig bied die ander biochemiese toetse wat uitgevoer is, nie 'n duidelike rigting vir die verdere indeling van hierdie groepe nie.

Deur middel van standaard tegnieke kon van die Gram-negatiewe, pleomorfe bakterieë wel as P. haemolytica uitgewys word. Pleomorfisme is normaalweg nie 'n sterk eienskap van hierdie organismes nie (Smith, 1975). Wat hier wel moontlik is, is dat verblyf in 'n bykans abnormale habitat, so 'n uitwerking op die organisme gehad het dat hy homself as pleomorf op kunsmatige medium gedra.

Wat die diagnostiek van hierdie besondere groep van organismes betref, kan die API 20 E klassifikasiesisteem 'n handige tegniek wees. Terselfdertyd egter is dit ook 'n sisteem met besondere tekortkominge. Afgesien van die skrywer se ondervinding dat die oksidase-toets soos in die sisteem uitgevoer kan word, nie baie betroubaar is nie, blyk dit dat ook die katalase- en ONPG-toetse vir hierdie tipe organisme ook onder verdenking staan.

Wanneer standaard toetse ingespan word om hierdie identifikasies te maak, het suikertoetse min waarde. Daar kan ook nie net op die morfologie van die organisme gesteun word nie, aangesien sommige isolate van P. haemolytica ook sterk pleomorfe eienskappe kan toon. Deur van hul vermoë om op MacConkey-agar te groei gebruik te maak, kan daar egter tussen P. haemolytica en Actinobacillus spp. onderskei word. Groei in aërobe atmosfeer asook die uitkoms van die katalase toets kan as hulpmiddels gebruik word om tussen Actinobacillus spp. H. ovis te onderskei. Vir die onderskeiding van A. actinomycetem comitans en A. seminis kan die ONPG-toets ingespan word.

Voorheen is alle Gram-negatiewe, pleomorfe bakterieë wat besmette ramme in die Republiek van Suid-Afrika uit-skei as A. seminis (van Tonder, 1979 b) en selfs as P. haemolytica (Jansen, 1981) beskou. Na aanleiding van hierdie studie blyk dit dat beide hierdie organismes in die semen van ramme in die Hoëveldstreek voorkom. Afgesien hiervan kom A. actinomycetem comitans en H. ovis ook voor; feite wat tot op datum nog onbekend was. Verdere navorsing is egter nodig om fyner onderskeid tussen spesies binne hierdie groepe te maak.

## BIBLIOGRAFIE

- ARNOLD, W.M. & WEAVER, R.H. 1948. Quick micro-techniques for the identification of cultures. 1. Indole production. Journal for Laboratory and Clinical Medicine. 33: 1334-1337.
- BARRITT, M.M. 1936. The identification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. Journal of Pathology and Bacteriology. 42: 441-454.
- BAYNES, I.D. & SIMMONS, G.C. 1960. Ovine epididymitis caused by Actinobacillus seminis. N. SP. The Australian Veterinary Journal. 36: 454-459.
- BOHACEK, J. & MRAZ, O. 1967. Basengehalt der desoxyribonukleinsäure bei den arten *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus lignieresii* und *Actinobacillus equuli*. Zentrablatt für Bacteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Orig). 202: 268-278.
- BRANSON, D. 1972. Methods in clinical bacteriology. A manual of tests and procedures. Illinois: Charles C. Thomas.
- BROCK, T.D. 1979. Biology of micro organisms. 3<sup>rd</sup> ed. London: Prentice/Hall International.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., eds. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkens.
- BUXTON, A. & FRAZER, G. 1977. Animal microbiology. Vol. 1. Immunology, bacteriology, mycology and diseases of fish and laboratory methods. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- CARPENTER, P.L. 1967. Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders.
- COLLINS, M.T. & SWANSON, E.C. 1981. Use of the API 20 E system to identify non-enterobacteriaceae from veterinary medical sources. American Journal of Veterinary Research. 42: 1269-1273.
- COWAN, S.P. 1979. Cowan & Steel's manual for identification of medical bacteria. Cambridge: Cambridge University Press.
- DeLONG, W.J., WALDHALM, D.G. & HALL, R.F. 1979. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. American Journal of Veterinary Research. 40: 101-102.
- DE WET, J.A.L. 1981. Laboratory annual report: 1980 - 1981. Veterinary Laboratory, P.O. Box 502, Bloemfontein 9300.
- DE WET, J.A.L. 1983. Laboratory annual report: 1982-83. Veterinary Laboratory, P.O. Box 502, Bloemfontein 9300.
- DODD, D.C. & HARTLEY, W.J. 1955. A specific suppurative epididymitis of rams. New Zealand Veterinary Journal. 3: 105-110.
- DU PREEZ, J.C. & LATEGAN, P.M. 1976. Gas chromatographic determination of C2-C5 fatty acids in organic media with a Poropak N column. Journal of Chromatography. 124: 63-65.
- DU PREEZ, J.C. & LATEGAN, P.M. 1978. Gas chromatographic analysis of C2-C5 fatty acids in aqueous media using Carbowax 20M- phosphoric acid. Journal of Chromatography. 150: 259-262.

- EKDAHL, M.O., MONEY, D.F.L. & MARTIN, C.A. 1968. Some aspects of epididymitis in rams in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal. 16: 81-82.
- ERASMUS, J.A. 1983. The usefulness of the API 20 E classification system in the identification of Actinobacillus actinomycetem comitans, Actinobacillus seminis and Pasteurella haemolytica. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 50: 97-99.
- HENNING, M.W. 1956. Animal diseases in South Africa. 3<sup>rd</sup> ed. South Africa: Central News Agency.
- HIGGENS, R., GODBOUT-DeLASALLE, F., MESSIER, S., COUTURE, Y. & LAMOTHE, P. 1981. Isolation of Histophilus ovis from vaginal discharge of ewes in Canada. Canadian Veterinary Journal. 22: 395-396.
- HOLT, J.G. 1977. The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkens.
- HUGH, R. & LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology. 66: 24-26.
- JANSEN, B.C. 1981. The aethiology of ram epididymitis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 47: 101-107.
- JACKSON, P.G.G & WHITE, R.A.S. 1982. Epididymitis in a goat. The Veterinary Record. 111: 81-82.
- KILIAN, M. & FREDERIKSEN, W. 1981. Identification tables for the Haemophilus - Pasteurella - Actinobacillus group (In Kilian, M., Frederiksen, W. & Biberstein, E.L. red. Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus). London: Academic Press.

- KOVACS, N. 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature. 178: 703.
- LATEGAN, P.M., DU PREEZ, J.C. & POTGIETER, H.J. 1978. Preliminary findings on the characterization of bacteria causing mastitis by gas chromatography. British Veterinary Journal. 134: 342-349.
- LIVINGSTONE, C.W. & HARDY, W.T. 1964. Isolation of Actinobacillus seminis from ovine epididymitis. American Journal of Veterinary Research. 25: 660-663.
- MERCHANT, I.A. & PACKER, R.A. 1969. Veterinary bacteriology and virology. 7<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press.
- MOLLER, V. 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathology and Microbiology Scandanavia. 36: 158-172.
- NESTER, E.W., ROBERTS, C.E., PEARSALL, N.N. & McCARTHY, B.J. 1978. Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Holt, Rinehart and Winston.
- PELCZAR, M.J., REID, R.D. & CHAN, E.C.S. 1977. Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. New Delhi: TATA McGraw-Hill.
- PRESTON, N.W. & MORREL, A. 1962. Reproducible results with the Gram stain. Journal of Bacteriology and Pathology. 84: 241-243.
- ROBERTS, D.S. 1956. A new pathogen from a ewe with mastitis. The Australian Veterinary Journal. 32: 330-332.
- SALLE, A.J. 1973. Fundamental principles of bacteriology. 7<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill.

- SINGLETON, P. & SAINSBURY, D. 1978. Dictionary of microbiology. Chichester: John Wiley.
- SMITH, J.E. 1975. Genus Pasteurella. (In Buchanan, R. & Gibbons, N.E. eds. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8<sup>th</sup> ed.) Baltimore: Williams & Wilkens.
- VAN DRIMMELIN, G.C. 1960. Grepe uit die Afrikaanse handleiding by die bakteriologie. 2<sup>de</sup> uitgawe. Pretoria: Wallach.
- VAN TONDER, E.M. 1979 a. Actinobacillus seminis infection in sheep in the Republic of South Africa. II. Incidence and geographical distribution. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 46: 125-140.
- VAN TONDER, E.M. 1979 b. Actinobacillus seminis infection in sheep in the Republic of South Africa. III. Growth and cultural characteristics of A. seminis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 46: 141-148.
- VAN TONDER, E.M. 1982. 'Isolasie en identifikasie van Actinobacillus seminis. (Lesing gelewer op 16 September 1982 as deel van 'n vergadering van veteriniere tegnoloë, Middelburg, KP. Ongepubliseer.)
- VAN TONDER, E.M. & BOLTON, T.F.W. 1968. Epididymitis in rams caused by Actinobacillus seminis. Journal of the South African Veterinary Medical Association. 39: 87-90.
- VAN TONDER E.M., BOLTON, T.F.W., ROBERTSON, A.O. & GREEFF, L. 1973. Modification and use of the generator type of electro-ejaculator for rams. Journal of the South African Veterinary Association. 44: 437-439.

VOLK, W.A. & WHEELER, M.F. 1973. Basic microbiology.  
3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott.

WORTHINGTON, R.W. & BOSMAN, P.P. 1968. Isolation of  
Actinobacillus seminis in South Africa. Journal  
of the South African Veterinary Medical Association.  
39: 81-85.

