

ANDRZEJ SKOCZEK

Wiarygodność wyników odczynu immunofluorescencji (if) w zależności od metody wstępnego namnażania pałeczek *Salmonella* w mięsie

Wojskowy Ośrodek Naukowo-Badawczy
Służby Weterynaryjnej

Diagnostykę pałeczek *Salmonella* w produktach spożywczych za pomocą odczynu if przeprowadzano dotychczas stosując bądź mikroskopię preparatów bezpośrednio z badanych próbek, bądź wstępną hodowlę na pożywkach namnażających. Badane próby inkubowano stosując różne modyfikacje namnażania oraz różne parametry czasu i temperatury.

Uzyskiwane rezultaty nie dawały podstaw do stwierdzenia, która z modyfikacji hodowli w połączeniu z odczynem if daje najwięcej wyników pozytywnych.

Łarionow i wsp. (8) wykrywali pałeczki *Salmonella* w mięsie robiąc mikroskopię odcisków badanego materiału (mięśni, węzłów chłonnych i narządów) na szkiełkach podstawowych i nastawiając odczyn if bez wstępnej hodowli. Wykrywali oni o 25% więcej pałeczek odczynem if niż metodą posiewów bakteryjnych.

Archangielskij i Kartachowa (1) badali mleko sztucznie zakażone pałeczkami *Salmonella*. Stosując mikroskopię odwirowanego osadu otrzymali zadowalające wyniki przy wykrywaniu znacznych zakażeń (10^5 bakterii w 1 ml), natomiast przy zakażeniach niewielkich (10^2 w 1 ml), dopiero po wstępnym namnożeniu próbek.

Rotow i Stiebljak (12) uzyskiwali dobre rezultaty przy wykrywaniu pałeczek *Salmonella* w tzw. podhodowlach próbek mięsa przetrzymywanych w termostacie w temp. 37°C w czasie 24 godz. bez dodawania pożywek. Następnie z próbek tych wykonywali rozmazy, zalewali bulionem odżywczym i przetrzymywali w łaźni wodnej dalsze 3 godziny, a dopiero potem wykonywali odczyn if.

Georgala i Boothroyd (2) stosowali wstępną hodowlę próbek mięsa surowego na bulionie seleninowym inkubując posiewy 18-24 godz. w temp. 43°C i następnie nastawiając odczyn if. Jednocześnie przeprowadzali badania tych samych próbek dotychczas przyjętą metodą posiewów bakteryjnych. Wyniki uzyskane w obu metodach były zbliżone.

Metodą wstępnej hodowli badanych próbek na podłożach namnażających a następnie odczynem if posługiwali się również Silliker i wsp. (13), Haglund i wsp. (5), Ginsburg i Panarina (4), Mierzejewski (10), Skoczek i Mierzejewski (14) uzyskując podobnie zadowalające wyniki wykrywania pałeczek *Salmonella*.

Tak więc w większości badań, w których stosowano odczyn if próbki środków spożyw-

czych badanych w kierunku na pałeczki *Salmonella* namnażano wstępnie różnymi metodami. Według Georgla i Boothroyd (2), Sillikera i wsp. (13) oraz własnych obserwacji jakość wyników w odczynie if zależy w dużej mierze od doboru metody wstępnego namnażania badanych bakterii.

W obecnej pracy postanowiono dokonać wyboru metody wstępnego namnażania pałeczek *Salmonella* dla uzyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników przy ich wykrywaniu odczynem if. Wstępne namnażanie prowadzono zarówno bezpośrednio w badanych próbkach mięsa, jak i na pożywkach bakteryjnych.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Konjugatę z surowicy diagnostycznej aglutynującej dla antygeny *Salmonella* BO prod. Biomed — Kraków.

Surowicę konjugowano z izotiocyanianem fluoresceiny wg metody Riggsa w modyfikacji Marshalla (9) i oczyszczano na kolumnach sephadexowych G-50 (wg 7).

2. Szczep bakteryjny *Salmonella paratyphi* B nr 73 z kolekcji Instytutu Weterynarii w Puławach.

3. Surowe mięso wieprzowe (schab).

Jednorodną porcję mięsa podzieloną na części zamrażano w temperaturze -10°C . Tak przygotowane mięso używano we wszystkich doświadczeniach. Przed badaniem próbki mięsa rozmrażano, homogenizowano, dzielono na porcje po około 20 g i zakażano zawiesiną bakterii od 10^6 do 10^9 w 1 ml w płynie fizjologicznym. Zawiesinę przygotowywano ze spluczyn 24-godzinnych hodowli agarowych ustalając gęstość wg skali Mc Farlanda. Do próbek kontrolnych zamiast zawiesiny bakteryjnej wprowadzono jałowy płyn fizjologiczny.

Przeprowadzono badania porównawcze następujących metod wstępnej hodowli pałeczek *Salmonella*:

1. Podhodowla w rozmazach w temp. 37°C w ciągu 3 godz.

2. Podhodowla w próbce mięsa w temp. 37°C w ciągu 7 godz.

3. Podhodowla w próbce mięsa w temp. 37°C w ciągu 18 godz.

4. Podhodowla w próbce mięsa w temp. 37°C w ciągu 24 godz.

5. Hodowla próbki mięsa na podłożu Müller-Kaufmana w temp. 37°C w ciągu 24 godz.

6. Hodowla próbki mięsa na podłożu Müller-Kaufmana w temp. 43°C w ciągu 24 godz.

7. Ponadto przeprowadzono serię doświadczeń, w których robiono preparaty bezpośrednio z badanego mięsa bez wstępnego namnażania i traktowano je konjugatą użytą do doświadczeń.

Podhodowlę w rozmazach przeprowadzono w ten sposób, że pobrany eż materiał zakaźny umieszczano na szkiełku podstawowym, zalewano 1 ml bulionu odżywczego i umieszczano w łaźni wodnej w temp. 37°C na okres 3 godzin. Po tym czasie 1 kroplę

bulionu przenoszono na inne szkiełko podstawowe wykonując rozmaz do odczynu if.

Podhodowle w próbcie mięsa przeprowadzano następująco: badaną próbkę umieszczano w jałowej płytce Petri'ego bez dodatku pożywki i przetrzymywano w termostacie w przyjętym umownie okresie czasu, po czym robiono z nich rozmazy do odczynu if.

Odczyn if wykonywano metodą bezpośrednią zalewając utrwalony rozmaz konjugatą rozcieńczoną 1:4. Preparaty przetrzymywano w komorze wilgotnej przez 30 min., po czym płukano zbuforowanym płynem fizjologicznym o pH 7,2. Wyszuszone preparaty oglądano pod immersją w mikroskopie luminescencyjnym ML-2 stosując filtry SS-15-2, SZS-7, BG-8, filtr okularowy 2 x, okular 5 x i obiektyw 90 x.

Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane we wszystkich seriach doświadczonych zebrano w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki wykrywalności pałeczek *Salmonella* odczynem if przy stosowaniu różnych metod wstępnego namnażania

Nr dośw.	Czas inkub.	Ilość próbek	Ilość próbek zakaż.	Wynik pozytywny	Odsetek wyników pozyt.	Wynik negatywny	Odsetek wyników negat.
1	3	200	160	69	43,1%	91	56,9%
2	7	200	160	87	54,4%	73	45,6%
3	18	200	160	121	75,6%	39	24,4%
4	24	200	160	123	76,8%	37	23,2%
5	24	200	160	147	91,9%	13	8,1%
6	24	200	160	158	98,7%	2	1,3%
7	0	200	160	71	44,4%	89	55,6%

Jak wynika z tab. 1 przy wstępnym namnażaniu w bulionie odżywczym w okresie 3 godz. w dośw. 1 uzyskano tylko 43,1% wyników poprawnych. Również Rotow i Stiebljak (12) posługując się tą metodą uzyskiwali niski procent wykrywalności pałeczek *Salmonella*. Dużo lepsze wyniki osiągnęli oni po namnażaniu pałeczek w próbach mięsa w czasie 24 godz. w temp. 37°C i wykonaniu z tych prób podhodowli inkubowanych przez dalsze 3 godz. Metoda ta przedłużała jednak wykonanie odczynu if do 27 godz.

W podhodowlach pałeczek w próbach mięsa (dośw. 2, 3, 4) w zależności od czasu inkubacji uzyskano od 54,4% do 76,8% wyników poprawnych. Tak więc przedłużenie czasu inkubacji zwiększało procent wykrywalności pałeczek *Salmonella*. Podobnie Pritulin (9) przedłużając czas inkubacji pałeczek w narządach i tkankach padłych zwierząt z 1 do 7-9 godz. uzyskiwał o około 30% wzrost wykrywalności.

Obraz mikroskopowy rozmazów wykonywanych z inkubowanych próbek mięsa oraz podhodowli na bulionie wykazywał obecność nielicznych typowych pałeczek świecących na ++ jak również liczniejsze nietypowe formy pałeczek nie stwierdzone w obrazie kontrolnym.

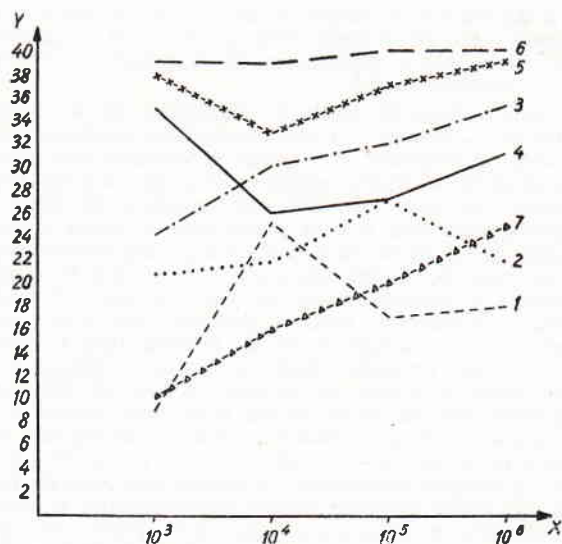
Stosując namnażanie wstępne na podłożu Müller-Kauffmana w temp. 37°C w czasie 24

godz. (dośw. 5) stwierdzono pałeczki *Salmonella* w 91,9% a temp. 43°C (dośw. 6) aż w 98,7%. Uzyskany wysoki procent wykrywalności pałeczek *Salmonella* przy namnożeniu na podłożu Müller-Kauffmana jest zgodny z wynikami badań Ginsburga i Panariny (4) oraz wcześniejszymi własnymi (14).

O stosowaniu podłoża Müller-Kauffmana do namnażania pałeczek *Salmonella* i wykrywania ich odczynem if wypowiedzieli się krytycznie Archangielskiej i Kartachowa (1). Według nich dużą przeszkodą w stosowaniu tego podłoża jest świecenie tła preparatów zabarwionych zielenią brylantową znajdującą się w pożywce. W badaniach własnych nie zauważono istotnego wpływu obecności zieleni brylantowej na jakość odczytów mikroskopowych. Obraz mikroskopowy wykonany z tego podłoża wykazywał typowe formy pałeczek *Salmonella* z obecnością swoistej fluorescencji (jasno zielonego świecenia otoczki wokół komórki) o intensywności określonej na ++++. Obrazy kontrolne wykonane z hodowli nie zakażonego mięsa nie wykazały bakterii swoście fluorujących.

Najwyższy procent wyników pozytywnych uzyskano przy inkubacji hodowli w temp. 43°C (dośw. 6). Również Georgala i Boothroyd (2, 3) inkubując próbki mięsa w tej temperaturze na podłożu seleninowym uzyskali dobre rezultaty. Tak więc temperatura 43°C niezależnie od stosowanego podłoża namnażającego wydaje się być optymalną dla namnażania pałeczek *Salmonella*. Podobnie Kafel (6) poleca stosowanie tej temperatury do namnażania pałeczek *Salmonella*.

Ryc. 1 przedstawia zależność stopnia wykrywalności pałeczek *Salmonella* przy użyciu odczynu if od ich liczby wprowadzonej do mięsa.



Ryc. 1. Zależność stopnia wykrywalności pałeczek *Salmonella* przy użyciu odczynu if od liczby pałeczek wprowadzonych do mięsa. X — liczba pałeczek wprowadzonych do mięsa, Y — liczba wyników pozytywnych, 1-7 numery doświadczeń patrz „Materiał i metody”.

Jak wynika z ryc. 1, wraz ze wzrostem liczby pałeczek wprowadzonych do mięsa zwiększała się ich wykrywalność odczynem if w podhodowli pałeczek w próbce mięsa (dośw. 3) i w rozmazie bezpośrednim (dośw. 7). W pozostałych doświadczeniach nie stwierdzono wyraźnego wpływu wielkości *inoculum* na wykrywalność pałeczek *Salmonella*.

Uzyskane wyniki wskazują, że przy wykrywaniu zakażeń mięsa pałeczkami *Salmonella* optymalną metodą jest wstępne namażanie badanych próbek na podłożu Müller-Kauffmana w temperaturze 43°C w czasie 24 godzin a dopiero potem stosowanie odczynu if.

Wnioski

1. Stwierdzono, że wykrywalność pałeczek *Salmonella* w mięsie przy użyciu odczynu if zależy od doboru metody wstępnego ich namażania.

2. Najwyższy procent wykrywalności w mięsie pałeczek *Salmonella* uzyskuje się po namnożeniu wstępnym w płynnym podłożu Müller-Kauffmana w temp. 43°C w czasie 24 godz., a następnie stosowaniu odczynu if.

3. Przedłużenie czasu inkubacji pałeczek *Salmonella* bezpośrednio w próbkach mięsa zwiększa do pewnego stopnia ich wykrywalność za pomocą odczynu if.

4. Nie stwierdzono całkowitej zależności między stopniem zakażenia mięsa pałeczkami *Salmonella* a częstością ich wykrywania za pomocą odczynu if.

Piśmiennictwo

1. Archangielskij J. J., Kartachowa W. M.: Veterinarija, Moskwa, 9, 74, 1962.
 2. Georgala D. L., Boothroyd M.: J. Hyg., Camb. 62, 319, 1964.
 3. Georgala D. L., Boothroyd M.: J. appl. Bact. 28, 421, 1965 b.
 4. Ginsburg B., Panarina M.: Mjas. Ind. SSSR 5, 1968.
 5. Haglund J. R., Ayres J. C., Paton A. M., Krafft A. A., Quinn L. Y.: Appl. Microbiol. 12, 5, 447, 1964.
 6. Kafel S.: Referat wygłoszony na sympozjum o pał. *Salmonella* w Gdańsku, 1969.
 7. Kubica J. F.: Immunofluorescencja, Warszawa, 1967.
 8. Larionow A. P., Zalesskij L. P., Kuźmin N. A.: Veterinarija, Moskwa, 5, 85, 1960.
 9. Marshall J. D., Eveland W. C., Smith S. W.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 898, 1958.
 10. Mierzejewski J.: Medycyna Wet. 24, 349, 1968.
 11. Pritulin P. I.: Veterinarija, Moskwa, 9, 74, 1962.
 12. Rotow W. J., Stiebljak P. M.: Vet. sel.-choz. Nauki Mosk., 7, 107, 1965.
 13. Silliker J. H., Schmall A., Chin J. Y.: J. Fd Sci. 31, 240, 1966.
 14. Skoczek A., Mierzejewski J.: w druku.
- Adres autora: lek. wet. Andrzej Skoczek, Puławy, ul. Partyzantów 8a/6.

RECENZJE I BIBLIOGRAFIA

Bulletin Office International des Epizooties, tome LXIII, numéros 5—6, mai-juin 1970. **Biuletyn Międzynarodowego Biura Epizootycznego**, tom LXIII, numer 5—6 maj — czerwiec 1970 r.

Spis treści:

1. Dokumenty oficjalne Biura
2. Prace oryginalne
3. Epizootiologia
4. Dokumenty i inne informacje
5. Sytuacja epizootyczna w świecie.

Ad. 1. W czasie XXXVIII Sesji Generalnej OIE, która odbyła się w Paryżu w dniach 25—30 maja 1970 r. stanowisko Prezydenta OIE na okres od maja 1970 r. do maja 1973 r. powierzono dr H. Oberfeldowi przedstawicielowi Polski.

Ad. 2. Auge de Mello P., Honigman M. N., Fernandes H. V., Gomes I., Panamerykańskie Centrum Pryszczycy w artykule pt. „Dalsze informacje nad przeżywalnością u bydła zmodyfikowanego wirusa pryszczycy” (j. ang. str. 489—505) przedstawili dane nad przeżywalnością wirusa pryszczycy u bydła szczepionego żywą zmodyfikowaną szczepionką przeciwpryszczycową. Do badań używano szczepionkę bivalentną opartą o zaadaptowany do jaja kurzego (92 pasaż) wirus pryszczycy typu A podtypu A24 oraz wirus pryszczycy zaadaptowany do królika (typ C, podtyp C3 szczep Resende). Badania przeprowadzono na 94 krowach w wieku 18—24 mies. u których nie występowały swoiste przeciwciała przeciwko typom A i C wirusa pryszczycy. Badane sztuki zaszczepiono dwukrotnie (grupa I - 0 i 180 dnia, zaś grupa II - 0 i 30 dnia) badaną szczepionką. Ponadto włączono do badań grupę krów nieszczepionych pozostających w ścisłym kontakcie ze sztukami szczepionymi. Popłuczynę przelykowo-gardzielową pobierano od sztuk badanych jeden raz w miesiącu przez okres 300 dni. Badania wykazały, że wirus pryszczycy wyizolowano na hodowli tkankowej BK II z popłuczyną przelykowo-gardzielową od 70 z 94 szczepionych sztuk. Wirus typu A

wyizolowano jedynie od jednej sztuki 90 dnia po zakażeniu. Nie izolowano go nigdy od sztuk nieszczepionych pozostających w ścisłym kontakcie ze sztukami szczepionymi. Typ C wirusa pryszczycy izolowano do 270 dnia od sztuk szczepionych i do 240 dni od sztuk nieszczepionych. Większy odsetek wyników dodatnich uzyskano stosując do izolacji wirusa zakażenie myszek w wieku 5—7 dni życia. Izolowanie wirusa z organizmu sztuk nieszczepionych przy braku przeciwciał w surowicy wskazuje na ich zakażenie dawką wirusa niewystarczającą do pobudzenia organizmu do produkcji przeciwciał.

Fernandez A. A., Fernandes M. V., Panamerykańskie Centrum Pryszczycy w pracy pt. „Doświadczalne zakażenie owiec wirusem pryszczycy” (j. ang. str. 507—520) omówili wyniki badań nad rozmieszczeniem zmian ogólnych i miejscowych u owiec zakażonych wirusem pryszczycy typu O/Vallee, podtyp 01, szczep Caseros). Badania przeprowadzono na 170 owcach w wieku 9—12 miesięcy zakażonych do nabłonka języka zjadliwym szczepem wirusa pryszczycy. Szczep Caseros, silnie patogenny dla świń i krów zaadaptował się do organizmu owiec po sześciu pasażach. U wszystkich zakażonych owiec po 48 godzinach po zakażeniu występowała wiremia, zaś u 97,4% sztuk wystąpiły typowe zmiany na rączkach.

Crandell R. A., Gomes I., Panamerykańskie Centrum Pryszczycy w artykule pt. „Dalsze badania nad markerami wirusa pryszczycy” (j. ang. str. 521—533) omówili zmiany jakie zachodzą w wirusie pryszczycy pod działaniem temperatury, PH oraz po pasażach przez krowy. Atenuowane i zjadliwe szczepy typu A podtypu A24 i typu C różnią się pomiędzy sobą swoistymi genetycznymi markerami. Wirusy stosowane do produkcji szczepionek przeciwpryszczycowych zmodyfikowano na drodze pasażowania przez zarodki kurze. Wirusy „reaktory” izolowano od krów szczepionych szczepionkami zawierającymi zmodyfikowane