

Dobre wyniki dałoby zorganizowanie współzawodnictwa odnośnie współpracy z „Medycyną Weterynaryjną”.

Cały naród polski na cześć II Zjazdu Polskiej Zjednoczonej Partii Robotniczej wzmógł wysiłki, aby

przyspieszyć wzrost stopy życiowej mas pracujących miasta i wsi. Służba weterynaryjna razem z całym narodem wzmocze swoje wysiłki celem pełnej realizacji wytycznych IX Plenum Komitetu Centralnego Polskiej Zjednoczonej Partii Robotniczej.

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

J. WIŚNIEWSKI, I. KOCOWICZ, M. KAMIŃSKA

### Płytkowy odczyn zlepnny przy brucelozie bydła

Institut Zootechniki

Dyrektor: Członek rzecz. PAN Prof. Dr T. MARCHLEWSKI

Państw. Institut Weterynaryjny WZHW — Kraków,

Kierownik: Dr A. RATOMSKI

Państw. Institut Weterynaryjny WZHW — Stalinoród,

Kierownik: Dr J. SZAFIŁARSKI

Autorów zajmujących się serodiagnostyką brucelozy, w szczególności odczynem zlepnym, interesuje pytanie: jaką stosować metodę, czy aglutynację próbkową (powolną), czy płytkową (szybką).

Wyczerpujące rozważania na ten temat w ujęciu ogólnym, i w zastosowaniu do brucelozy, podał Diernhofer (1947). Autor ten wypowiada się następująco: Oba odczyny tj. próbkową i płytkową polegają na tym samym mechanizmie zlepiania się bakterii pod wpływem swoistych aglutynin. Dla określonej liczby bakterii potrzeba do zlepiania określonej ilości przeciwciał. W związku z tym wyznaczenie miana danej surowicy nie jest wartością bliżej określoną, jeżeli nie podamy równocześnie gęstości użytego antygeny. Jeżeli poszczególne placówki badawcze operują antygenami o różnej procentowej zawartości bakterii w 1 ml, to ta sama surowica może wykazywać różną wysokość miana, do tego stopnia, że w jednym zakładzie oceniona na 1/100, może w drugim zakładzie dysponującym gęstszą zawiesiną dać wynik ujemny. Takimi badaniami porównawczymi zajmował się Hamnerler (1939). Czas wystąpienia grudek zlepionych bakterii, widocznych makroskopowo, nie jest specjalnie zależny od gęstości antygeny. Odczyn występuje nieco później przy użyciu zawiesiny rzadszej, wskutek większego oddalenia od siebie bakterii, a więc potrzeba dłuższego czasu na zetknięcie się i zlepienie poszczególnych komórek. Ujmując ogólnie, należy przyjąć, że aglutynacja jest bardziej czuła gdy antygen jest rzadszy, wynik jednak występuje tym prędzej im antygen jest gęstszy. Aby zatem uniknąć rozbieżności w interpretacji wyników trzeba 1) albo rozcieńczyć dany antygen, tak by wystąpiła zgodność w wysokości miana, 2) albo obniżyć wysokość miana uznawanego za pozytywne, jeżeli pracuje się z antygenem gęstszym. W odczynie zlepnym szybkim (płytkowym) stosowany jest antygen bardzo gęsty i stosunkowo niskie rozcieńczenie surowicy (np. 1/1 tj. kropla antygeny + kropla nierozc. surowicy, lub 1/3 tj. kropla antygeny + kropla cytrynianu + kropla pełnej krwi). Wobec tego rozcieńczenie antygeny i proporcje surowicy, względnie roztw. cytrynianu trzeba tak dobrać, by wynik w pró-

bie szybkiej był zgodny z odczynem powolnym (próbówkowym). To znaczy dodatni wynik odczynu szybkiego ma odpowiadać wysokości miana uznawanego za dodatnie w obowiązującej aglutynacji próbówkowej. Jeżeli przeto dana surowica przy obowiązującej technice w met. próbówkowej w rozc. 1/100 daje wynik 2 plus, inna 1 plus, a trzecia minus — to te same surowice w odczynie płytkowym w ustalonych doświadczalnie proporcjach i rozcieńczeniu składników, powinny pokrywać się w wynikach. Tego rodzaju standaryzacja składników do odczynu szybkiego może być oparta na badaniu porównawczym 3-ch surowic (dodatniej, wątpliwej i ujemnej), gdyż wskutek prostoty samej techniki odczynu szybkiego, mało jest czynników mogących wpływać na zmienność aglutynacji. Jednorazowe wymiareczkowanie powinno dawać tę samą zgodność z wszystkimi surowicami. Diernhofer twierdzi dalej, że nie tylko teoretyczne przesłanki przemawiają za tym, ale i wiele prac doświadczalnych potwierdza daleko idącą zgodność w wynikach obu metod. Oczywiście należy się liczyć z pewnymi odchyleniami, które są zupełnie zrozumiałe dla przyrodnika, mającego do czynienia ze zjawiskami biologicznymi, przy których czasem odgrywają rolę pewne nieznanne i nieuchwytny czynniki. (W związku z uwagami Diernhofera na temat standaryzacji odczynu szybkiego, już tu zaznaczamy, a w omówieniu wyników szerzej potraktujemy, że sprawa pokrywania się wyników obu odczynów, jeżeli chodzi o ich nasilenie nie jest tak prosta jak ją cyt. autor ujmuje, gdyż w dużym odsetku przypadków siła odczynu szybkiego nie pokrywa się z odczynem próbówkowym — przyp. autorów).

Diernhofer podaje dalej, że odczyn szybki przeprowadza się naogół najprostszą metodą, tak by był on możliwy w wykonaniu terenowym, niema zatem stopniowania rozcieńczenia surowicy jak w odcz. próbówkowym, chociaż w pewnych wypadkach można zmieniając stosunki kropli, uzyskiwać szereg rozcieńczeń. Naogół jednak składniki dodaje się kroplami i uważa się tę metodę za metodę terenową, w przeciwieństwie do odczynu próbówkowego z szeregiem rozcieńczeń, będącego próbą laboratoryjną.

Próba szybkiej aglutynacji ma bardzo duże znaczenie praktyczne, jeżeli jest stosowana w terenie przez doświadczonego, i wyszkolonego lekarza wet. praktyka. Pozwala ona na natychmiastowe rozpoznanie np. etiologii poronienia i na natychmiastowe wydanie odpowiednich zarządzeń sanitarnych. Dużą wartość ma na spędach, targach, zwłaszcza gdy brak warunków na kilkudniowe przetrzymanie sztuk w miejscu transakcji kupna. (Moriakowa, 1948, podkreśla ponadto duże korzyści tej metody przy masowych badaniach owiec i świń, gdyż ma się możliwość od razu eliminować sztuki reagujące, nieraz z olbrzymich stad.) Diernhofer uważa, że w wypadku konieczności wydania natychmiastowego rozpoznania, wskazane jest wykonanie odczynu szybkiego w różnych proporcjach, by uniknąć ewentualnej blokady (strefy zahamowania agl.), która może wystąpić przy niskich rozcieńczeniach surowicy. Oceniając korzyści wypływające ze stosowania tej metody, wprowadzono ją w Niemczech w r. 1944 jako metodę urzędowo zatwierdzoną, przyczym do wykonania zostali upoważnieni tylko specjalnie przeszkoleni terenowi lekarze wet. Wadą stosowania tej próby jest czasem subiektywna ocena wyniku, przez przeprowadzającego badanie terenowego lekarza wet., niejednokrotnie zależnego finansowo od właściciela zwierzęcia (w naszych warunkach uspołecznienia lecznictwa moment podkreślany przez Diernhoffera nie jest aktualny — przyp. autorów), względnie niezgodność wyniku z kontrolnym badaniem laboratoryjnym, przeprowadzonym próbą próbkową. Ta ewentualna niezgodność może podważyć autorytet lekarza wet. terenowego, mimo że wykonał on odczyn *lege artis*. Te okoliczności nie umniejszają znaczenia szybkiej aglutynacji — trzeba raczej dążyć do uświadomienia posiadaczy zwierząt, że niezgodności nie są wynikiem złej woli, czy nieumiejętności lek. wet. terenowego, ale jak to się zdarza przy próbach biologicznych, pewnymi nieuchwytnymi czynnikami, względnie zmianą poziomu przeciwciał (jeżeli krew oboma próbami nie była badana w tym samym czasie). W celu uzyskania możliwie jaknajmniejszej rozbieżności między wynikami terenowymi a laboratoryjnymi, należy antygen sporządzać centralnie, a stronę techniczną wykonania odczynu opisać w drobiazgowy sposób. Diernhofer podkreśla wreszcie, że odczyn aglutynacyjny nie może być uważany za niezachwiane kryterium rozpoznania, lekarz wet. w terenie nie może ślepo i bezkrytycznie polegać na wyniku. Wskazane jest przeprowadzenie dodatkowych odczynów jak wiązanie dopełniacza czy Meinicke'go.

W związku z tymi wypowiedziami Diernhoffera, należy przypomnieć doniesienia Anczykowskiego (1946, 1947) na temat standaryzacji odczynu aglutynacyjnego, oraz dążność Parnasa i wsp., którzy w szeregu publikacji podkreślali konieczność stosowania prócz odczynu aglutynacyjnego również w pewnych przypadkach i odczynu wiązania dopełniacza oraz testu Burneta (1947, 1949, 1952). Kocowicz, Ratomski i Wiśniewski (1952) na podstawie opracowanego dużego materiału uważają badanie każdej próbki obydwoma odczynami za dalece uzupełniające się.

Stroną techniczną wykonania aglutynacji szkiełko-

wej przy brucelozie zajmowało się wielu badaczy. Najbardziej rozpowszechnioną i znaną niejako klasyczną jest metoda Huddlesona (1932, cyt. wg książki tego autora z r. 1943). Własne modyfikacje tej metody przeprowadzili Florinskij i Bogolepowa (1930), Kaitmazowa (1943), Elkeles (1950), Kujungiev i Christophorov (1950). Wszystkie te prace były pewnymi usprawnieniami, ale zajmowały się wyłącznie badaniem surowicy zwierząt i ludzi w laboratorium.

Ocenę wartości modyfikacji Florinskij'ego i Bogolepowa przeprowadził Rozenberg (1934), wykonując badania porównawcze z odczynem próbkowym na 1669 próbach surowicy bydłowej. Burmakin (1950) i Juskowicz (1952) w pracach poglądowych szeroko omawiają zalety metody szkiełkowej, jeden z punktu widzenia medycyny, drugi weterynarii. Obaj autorzy podkreślają prostotę, szybkość i czułość tego odczynu, który ich zdaniem przewyższa aglutynację próbkową.

Moriakowa (1948), Pankratow (1950) i Iljin (1951) przeprowadzali badania nad przydatnością metody płytowej z kroplą pełnej krwi, krów, owiec, kóz i świń, przyczym Moriakowa wykonała wstępne badania z krwią eksperymentalnie zakażonych *Br. abortus* świnek morskich, owiec, świń i cieląt. Wg zdania tych autorów, metoda ta wykonywana w terenie jest bardzo wartościowa w praktyce. Pankratow uzyskał zgodność wyników z agl. próbkową w 96,7%. Sprawą swoistości metody Huddlesona w modyfikacji Kaitmazowej zajmowała się Gusman (1949), która przebadła dużą liczbę surowic ludzi chorych na inne niż brucelozą schorzenia zakaźne i wykazała, że metoda szkiełkowa jest swoista dla brucelozy, tj. nie daje wyników pozytywnych w przebiegu innych schorzeń. Nie sposób w ramach tego doniesienia cytować wszystkich spostrzeżeń i dawać opis technicznych usprawnień różnych autorów — wspomniemy tylko o najbardziej charakterystycznych.

W metodzie klasycznej Huddleson, a później Florinskij z Bogolepowym stosowali badanie surowicy w różnych rozcieńczeniach (1/25 — 1/500) na specjalnej płycie umieszczonej na pudle wewnątrz oświetlanym. Antygen podbarwiali fioletem goryczki i zielenią brylantową, bakterie zawieszali w 12% roztw. NaCl, a zawiesinę gotowali na siatce azbestowej przez 10 minut. Wg zdania Florinskij'ego i Bogolepowa to gotowanie powoduje koagulację niektórych substancji powodujących nieswoiste reakcje. Elkeles zaleca ogrzewanie badanych surowic w t. 55° przez 20 minut dla powstrzymania zjawiska zahamowania agl., ponadto stosowanie aparatu wiracyjnego Kline'a do mieszania płyt, a przy podgrzewaniu płyt użycie komory wilgotnej. Elkeles przeprowadzał odczytywanie wyników pod mikroskopem. Autor ten podkreśla również, że świeże surowice posiadają częściej własność hamowania aglutynacji, niż starsze.

Notowane są i inne próby przyspieszenia serologicznego rozpoznania brucelozy i tak np. Krage i Knobloch (1942) opisują modyfikację aglutynacji próbkowej, przy której wyniki otrzymuje się już po około 3-ch godzinach, Castaneda (1950)

zaleca swoją metodę bibułkową, a Blake i wsp. (1952) opracowali met. płytową do badania mleka.

Mimo dużego zainteresowania się wielu badaczy odczynem zlepnym płytowym i zgodnej u wszystkich autorów opinii co do jego wartości, dotychczas ta metoda nie przyjęła się w Polsce. Prawie równolegle z badaniami nad wartością metody płytowej, rozwijały się prace badawcze nad próbą pierścieniową (ABR), której pierwowzór podał Fleischhauer (1937). Podobnie żywe zainteresowanie jak klasyczną metodą Huddlesena, cechowały liczne badania i modyfikacje metody Fleischhauera. Tak jak jedna metoda zaabsorbowała raczej badaczy radzieckich, tak druga znowu opracowywali raczej badacze krajów zachodnich (Dania, Szwecja, Niemcy, USA). Metoda ABR służąca do wykrywania w mleku aglutynin swoistych dla *Br. abortus*, zainteresowała oczywiście tylko weterynarię. Jako metoda prosta i łatwa w wykonaniu terenowym znalazła również wielu zwolenników o czym świadczy przegląd piśmiennictwa. Ukazały się nie tylko prace poglądowe (Kaplan 1950), omawiające wartość tej metody z punktu widzenia przydatności jej w zwalczaniu brucelozy u bydła, ale i bardzo liczne doniesienia zajmujące się modyfikacją strony technicznej jak i badaniami porównawczymi, oceniającymi czułość i swoistość (Hermann 1937, 1938, Smitmans 1938, Seeleman i Mantovani 1940, Dahmen 1942, Klimer i Schönberg 1942, Norell i Olson 1943, Winther i Hansen 1943, Seit i Jorgensen 1944, Bruhn 1944, 1948, Darnell 1945, Christiansen 1948, Roepke i wsp. 1948, 1950 Wood, 1948, 1950, Van Drimmelen 1948, 1951, Bendtsen 1950, Hamilton i Hardy 1950, Bremer 1950, Holm i wsp. 1950, Jepsen 1951, Moore 1951, Bryan 1951, Rossi i Dutilloy 1951, Trylenko 1951).

W Polsce sprawę stosowania tego odczynu poruszyli Runge i wsp. (1951), a Łosiński (1951) przygotował antygen. Duże trudności techniczne nastęcza barwienie antygenu hematoksyliną, które zostało rozwiązane w bardzo dobry sposób przez Bendtsena (1950) i Wooda (1950), ponadto, próba ABR nie nadaje się do rozpoznawania indywidualnego i nie może być stosowana u buhaja; jałówek i krów zasuszonych. To są prawdopodobnie przyczyny, dla których i ten odczyn nie został wprowadzony do obowiązujących w Polsce metod rozpoznawczych. Praca, której wyniki poniżej przedstawiamy, może będzie pomocą wyjścia z impasu, wynikającego z naszego, poniekąd konserwatywnego ustosunkowania się do nowszych metod rozpoznawczych, gdyż jak to już podkreśliliśmy, ani odczyn płytowy ani ABR nie znalazły w Polsce dotychczas zastosowania.

Metoda opisana przez nas w tej pracy jest pewną kompilacją odczynu szybkiej aglutynacji płytowej, z którego przyswoiliśmy zasadę przeprowadzenia próby, z drugiej strony testu pierścieniowego (ABR), z którego zastosowaliśmy antygen barwiony solami tetrazolu wg Bendtsena (1950). Praca nasza jest doniesieniem nie wykazującym w pełni wartości metody płytowej, gdyż wykonana została w pracowni i ze surowicą krwi. W obecnych warunkach wskutek pewnych trudności technicznych (brak samochodu

w poszczególnych WZHW, brak etatu epizootjologa), nie jest do pomysłenia przeprowadzenie badań terenowych z pełną krwią, chociaż oczywistym jest, że dopiero wówczas spełniłaby metoda płytowa swoje zadanie. Podanie wyników, uzyskanych w naszej pracy, miało na celu nie tylko przypomnienie o nowych, wypróbowanych co do wartości metodach (dlatego cytowany obszernie przegląd piśmiennictwa), ale i w dostosowaniu się do obecnych warunków, pewne usprawnienie pracy rozpoznawczej. Rozwój gospodarczy stawia naukę przed dużymi zadaniami, którym sprostać może tylko w oparciu o najnowsze jej zdobycze. Tak jak z jednej strony leczenie zwierząt posługuje się nowoczesnymi metodami leczenia i lekami, jak zootechnika przyjęła rewolucyjne zasady wychowu czy karmienia, tak i dział rozpoznawczy służby wet. chcąc sprostać ożywionej i powszechnej działalności terenowej służby wet., musi nadążać usprawniając swoje metody. Cyfry rocznych badań rozpoznawczych poszczególnych WZHW jako aparatu laboratoryjno-rozpoznawczego, wzrastające w porównaniu z latami ubiegłymi o 100 i 200%, są najlepszym dowodem rozwoju profilaktyki i lecznictwa. Nie mając narazie możliwości wielokrotnienia placówek rozpoznawczych, wprowadzmy usprawnienia w technice rozpoznania. Najlepszym tego przykładem niech będzie projekt wprowadzenia metody płytowej przy masowych badaniach serologicznych drobiu na pulorozę. Być może więc, że i w masowych serol. badaniach bydła na brucelozę, szybka metoda płytowa znajdzie zastosowanie i pozwoli na odciążenie pracowni, umożliwiając równocześnie wywiązanie się WZHW i z innych jeszcze stawianych im zadań.

#### Badania własne

Badania wykonywano z próbkami surowicy bydła, nadsyłanymi do WZHW w Krakowie i Stalinogrodzie w ramach normalnej akcji zwalczania brucelozy, w okresie jesienno-zimowym 1952 — 53. Przebadano próbki 5658 sztuk bydła, pochodzącego z 106 obór (4533 sztuk) i 64 spółdzielni produkcyjnych (1055), oraz prywatnych drobnych posiadaczy (70 sztuk). Ponadto badania wstępne wykonano z 494 próbkami surowicy. Ogółem więc przebadano 6152 próbek.

#### Metodyka

Każdą próbkę surowicy badano: 1) odczynem zlepym próbówkowym (technika i antygen PIW), 2) odczynem zlepym płytowym (technika i antygen własne). Za podstawowy w ocenie wyników uznawano odczyn nr 1. W wypadku stwierdzenia rozbieżności w wynikach pomiędzy odczynami nr 1 i 2, kontrolowano wyniki przez ich powtórne wykonanie i ponadto przeprowadzano badanie uzupełniające. 3) odczynem wiązania dopełniacza (technika i antygen PIW).

Odczyn nr 1 i 2 przeprowadzano tego samego dnia, ewentualny odczyn nr 3 w dniach następnych (z różnicą 1 — 2 dni), z tym że badane surowice były pobierane na kilka dni przed wykonaniem badań laboratoryjnych. Przy wykonywaniu odczynu nr 2 używano dwóch antygenów: antygenem nr 1 przeba-

dano mniej więcej połowę materiału, antygenem nr II pozostaje próby. Antygen nr I sporządzono ze szczepu amerykańskiego 119-3, a antygen nr II ze szczepów amerykańskiego i duńskiego „Krotz“ w równych ilościach. Szczepy otrzymane z Wydz. Rozp. PIW (Grycz) przywiózł z Danii i udzielił nam informacji o ich pochodzeniu Tekliński. Oba szczepy są starymi laboratoryjnymi hodowlami używanymi do produkcji antygenów do agl. próbowkowej w wymienionych krajach.

### Technika wykonania odczynów i sporządzania antygenów

#### 1. Odczyn zlepekny próbowkowy.

Wykonanie: surowica czynna w rozc. od 1/12,5 do 1/100, rozcieńczalnik (fizjol. roztw. NaCl) z dodatkiem 0,25% fenolu, w sumie objętość 1 ml + 1 kropla antygeny PIW (tj. około 1/24 ml). Antygen złożony ze szczepów amerykańskiego i duńskiego (Grycz), o gęstości (oznaczonej met. Mc Farlanda) odpowiadającej około 5.625.000.000 bakterii w 1 ml. Czas przetrzymania próby w cieplarni 37° przez około 20 godzin i w t. pokojowej przez ok. 2 godz. Ocena wyników przeprowadzona w świetle dziennym, gołym okiem, w sali od 3 plus, przez 2 i 1 do minus, zależnie od nasilenia odczynu. Za nasilenie krytyczne uznawano odczyn 2 plus, uznając to nasilenie jeszcze za reakcję pozytywną. Dodatni wynik danej próbki surowicy uznawano przy mianie 1/50, wątpliwy 1/25. (Nasilenie krytyczne odczynu przyjęte przez nas — nie jest przewidziane instrukcją).

#### 2. Odczyn zlepekny płytowy

Wykonywano na płytach szklanych z wydrążonymi owalnymi zagłębieniami (płyty do badań na pulorzę). Surowicy (pełnej), czynnej dawano mikropipetą (lub odpowiednio skalibrowanym kropłomierzem) — 0,01 ml, antygeny barwnego własnej produkcji (gęstość około 15.000.000.000 bakt/ml) — 0,1 ml. W tych proporcjach rozcieńczenie surowicy wynosiło 1/10. Składniki mieszano b. dokładnie prętym szklanym, później przez kilkunastokrotne przechylenie płyty doprowadzano do jeszcze dokładniejszego zmieszania. Płyte z próbkami wstawiano do cieplarki 37° na 20 — 30 min., a po wyjęciu jeszcze kilkanaście razy przechylając płytę mieszano składniki. Wyniki odczytywano wśród stałego nachylenia płyty (przelewający się płyn łatwiejszy do rozpoznania), nad białym tłem, w świetle dziennym, gołym okiem. Nasilenie odczynu oznaczano, wzorując się na poprzednikach, od 1 do 4 plus, zależnie od procentu zlepionych bakterii. Za wynik dodatni uznawano każde wystąpienie grudek zlepionych bakterii, nawet o sile odczynu 1 plus (umotywowanie tego podajemy w omówieniu wyników). Nie wyróżnialiśmy wyników wątpliwych.

#### 3. Odczyn wiązania dopełniacza

Wykonywano przy sumie składników 1,25 ml, ze surowicą nieczynną (ogrz. 30 — 56°) w rozcieńczeniach 1/25 — 1/50 — 1/100 tj. w dawkach 0,05, 0,025 i 0,0125 ml. Stosowano antygen PIW, kom-

plement konserwowany i układ hemolityczny (amboceptor PIW) w stałych dawkach. Układ badany ogrzewano na łaźni wodnej 37° przez 20 min., a z układem hemolitycznym dalszych 15 min. Ocena wyników w skali, zależnie od stopnia hemolizy, od 4 plus przez 3,2,1 plus do minus, przy uznanym nasileniu krytycznym 3 plus. Wynik dodatni przyjmowano dla miana 1/25. Ten sposób oceniania wyników jest niejako tradycyjny, gdyż nie jest dotychczas wogóle uwzględniony w obowiązującej instrukcji.

#### Sporządzenie antygeny barwnego

Szczepy jak podano wyżej, agar o pH 7,2, glicerynowo-cukrowy (1% glicerolu i 1% dekstrozy), czas hodowania w warunkach tlenowych w cieplarni 37° przez 4 — 5 dni. Płyn do zmywania hodowli i rozcieńczania o składzie: roztw. fizjol. NaCl + 1% glicerolu. Konserwacja fenolem (0,5%), ustalenie gęstości metodą Mc Farlanda. Zabicie hodowli, przeznaczonej do pomiarów gęstości, przez ogrzewanie na łaźni wodnej o t. 70° przez 30 min. Barwienie przyżyciowe (mechanizm i wartość tego rodzaju barwienia podany w Med. Wet. 1953,3-Wiśniowski) solami tetrazolu, preparatem f-my Light, England, oznaczonym jako 2-3-5 Triphenyl tetrazolium chloride. Czas barwienia 20—24 godzin w cieplarni 37°.

Wykonanie: Namnożone na agarach skośnych szczepy Br. abortus, po kontroli czystości i jakości wzrostu (dobra zawieszalność, homogenna zawiesina) wysiewa się na flaszki Roux. Po uzyskaniu obfitego wzrostu, zalewa się flaszki opisanym płynem, po około 20 ml na flaszkę. Kontroluje się czystość i jakość wzrostu, odrzucając flaszki wzbudzające podejrzenie przewagi form szorstkich, sączy się zawiesinę przez gazę. Część zawiesiny przeznaczona jest na próbkę do ustalenia gęstości, a pozostała część poddaje się barwieniu. Na każde 500 ml żywej zawiesiny dodaje się 1 g barwnika i po 10-15 minutowym mieszaniu dla dokładnego rozpuszczenia się barwnika, wstawia się do cieplarki. Zawiesina przybiera barwę intensywnie wiśniową, co następuje dopiero po około 20 godz. Zawiesina pozostaje żywa. Zależnie od gęstości, rozcieńcza się ją pewną ilością rozcieńczalnika, do którego od razu dodaje się taką ilość fenolu, by jego osłateczne stężenie w całej objętości gotowego antygeny wynosiło 0,5%. Tak sporządzoną zawiesinę kontroluje się na czystość ze względu na duże możliwości zanieczyszczenia przy technice obróbki i barwienia barwnikiem niebakteriobójczym. Zawiesinę pozostawia się przez kilka dni w t. pokojowej i kontroluje zabicie bakterii. Podkreślić należy dużą ostrożność, gdyż ma się do czynienia ze słabo działającym środkiem, (konserw.) który w gęstej zawieszynie może dopiero po paru dniach doprowadzić do zabicia wszystkich komórek. Dlatego uważamy za celowe przeprowadzenie dwukrotnego badania na niezwytność, z tym że drugie badanie negatywne dobrze jest wykonać po rozlaniu antygeny w mniejsze flaszeczki. Antygen przechowuje się w chłodni, przed użyciem dobrze wstrząsa. Gęstość używanego antygeny wynosiła około 15.000.000.000 bakterii w 1 ml.

c. d. n.