

# MEDYCyna WETERYNARYJNA

D A W N I E J :  
PRZEGLĄD WETERYNARYJNY 1886 I WIADOMOŚCI WETERYNARYJNE 1919

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

I. KOCOWICZ, A. RATOMSKI, J. WIŚNIEWSKI

### Terenowa aglutynacja szkiełkowa z kroplą krwi przy pulerozie

Państwowy Instytut Weterynaryjny  
Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Krakowie  
Kierownik: dr A. RATOMSKI

Ogólnie przyjętą skuteczną metodą w walce z pulerozą (białą biegunką piskląt) jest usuwanie z hodowli drobiu nosicieli *Salmonella pullorum*, rozpoznanych w powtarzającym okresie badaniu serologicznym (odczyn zlepnny).

Dotychczas stosowany u nas odczyn zlepnny próbkowy, w związku z ogromnym rozwojem gospodarstw drobiowych, stwarza przy badaniach masowych duże trudności, które obciążają zarówno fermę drobiową jak i pracownię rozpoznawczą. W fermach konieczne jest znakowanie i sporządzanie list drobiu, pobieranie od drobiu znacznej ilości krwi (1—2 ml), przesyłanie prób posłańcem do laboratorium i ponowny uciążliwy przegląd dla wysegregowania sztuk reagujących po badaniu laboratoryjnym. Od pobrania prób krwi do uzyskania wyniku badania pocztą z laboratorium upływa około tygodnia, co niewątpliwie epizootologicznie jest niekorzystne wobec możliwości rozsiewania w tym czasie zarazków przez nosicieli. Równocześnie przy niewyrównanym fachowo poziomie obsługi ferm szereg czynności jest wykonywany niedokładnie i stwarza znaczne możliwości błędów (opuszczenie niektórych sztuk, mylne, niewyraźne i zatarte znakowanie, zbitcie próbek, zhemolizowanie lub przerośnięcie próbek krwi itp.). Praca w laboratorium również wymaga znacznego zużycia czasu dla wykonania szeregu kolejnych czynności, absorbujących większą ilość pracowników przy właściwym badaniu i dodatkowych czynnościach (mycie, wyjaławianie, korkowanie i wysyłka próbek, wypełnianie list badań itp.). Stosowanie więc aglutynacji próbkowej wymaga zatrudnienia większej ilości pracowników, większego zużycia czasu, materiałów i kosztów, przy dużych możliwościach pomyłek, które mogą spowodować pozostawienie w hodowli pewnego odsetka nosicieli, a przez to zmniejszać wartość całego badania.

Próby usprawnienia akcji zwalczania pulerozy przez zastosowanie szybkich metod rozpoznania serologicznego, początkowo drogą aglutynacji z antygenem niebarwionym, później z antyge-

nem barwionym różnymi barwnikami anilinowymi, datują się od przeszło 20 lat. W Polsce pierwsze doniesienia i badania doświadczalne z antygenem barwnym i surowicą względnie krwią zawdzięczamy pracom Marka, Nawrockiego i Szafarskiego (1949, 1953). W roku 1953 Wiśniewski zastosował własny antygen do odczynu szkiełkowego z surowicą, barwiony trójfenylochlorem tetrazolu. W końcu 1952 roku pojawiła się tymczasowa instrukcja Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, wprowadzająca równorzędnie z odczynem zlepnym próbkowym odczyn zlepnny szkiełkowy (płytkowy) z surowicą krwi i antygenem barwionym, oraz terenowy odczyn zlepnny szkiełkowy (płytkowy) z pełną krwią i antygenem barwionym — jako prostsze i łatwiejsze w wykonaniu. Jakkolwiek szybkie metody szkiełkowe znane są od lat zagranicą i znalazły szerokie zastosowanie praktyczne, jednakże włączenie ich do obowiązujących metod rozpoznawczych w Polsce wymagało porównawczego opracowania stosowanych prób w naszych warunkach na większym materiale — i to jest celem naszej pracy. Zajmiemy się tylko aglutynacją terenową, gdyż opracowanie całości aglutynacji szkiełkowej laboratoryjnej z surowicą wziął na siebie Wydział Rozpoznawczy PIW (Dr Grycz). Nie omawiamy swoistości i czułości szkiełkowej próby zlepnnej, gdyż jest ona w istocie modyfikacją ogólnie uznanego odczynu zlepnego próbkowego.

Antygen barwiony do aglutynacji szkiełkowej przygotowywał Wydział Rozpoznawczy PIW ze szczepu węgierskiego *Salmonella gallinarum*, wykazującego cechy szczepu gładkiego; 48—62 godzinne hodowle we flaszczkach Roux na agarze o pH = 7,4 splukuje się ok. 40 ml roztworu o składzie: 15 g cytrynianu sodu i 26 ml formolu 4%-ego na 1000 ml roztworu fizjologicznego NaCl. Spluczynę, sprawdzoną na czystość i obecność form gładkich, przesącza się w warunkach jałowości przez watę lub bibułę i sprawdza się z surowicami normalnymi i surowicami O — IX (XII), notując szybkość wystą-

pienia odczynu i charakter aglutynacji. Przesąc przypominający wyglądem mleko, wolny od grudek, winien posiadać gęstość 50-krotną wzorca nefelometrycznego 0,75 Mc Farlanda. Do sporządzenia antygeny barwnego dodaje się na każde 100 ml zawiesiny bakteryjnej 3 ml roztworu wodnego barwnika (1%owy fioletu krystalicznego przy badaniu krwi, albo 1%owy zieleni brylantowej lub malachitowej przy badaniu surowicy).

Ze względu na poczynione spostrzeżenia praktyczne omówimy obszerniej również i w y k o n a n i e t e c h n i c z n e. Do wykonania prób w terenie używaliśmy następującego zestawu:

1) 1—2 płyty szklane z 20 owalnymi wgłębieniami (w 2 rzędach po 10)

2) 1—2 szpatułki (czerpaki) do nabierania i mieszania krwi

3) kroplomierz (pipetka pasteurowska ze smoczkim) do rozdzielania antygeny (0,03 ml)

4) antygen barwny terenowy (40 ml na 1000 prób)

5) 2 igły do nakłuwania żyły

6) 4%owy formol do przemywania szpatułki i igieł

7) wata, lignina, ścierki — do wycierania igieł, szpatułki i odczytanych prób

8) zegarek lub sekundomierz

9) termofor napełniany gorącą wodą w zimnej porze roku (ciepłota dla wykonania odczynu wynosi + 16° do + 18° C).

W skład ekipy wyjazdowej wchodzi lekarz wet. — drobiarz i laborant. Gospodarstwo drobiowe przetrzymuje drób na czczo, przygotowuje 20 numerowanych skrzynek — klatek (zwykle gniazd zatraskowych ustawionych w 2 rzędach (piętro) po 10 i dostarcza odpowiedniej liczby ludzi (3—6), którzy przed rozpoczęciem badania zganiają drób do przyległego małego pomieszczenia (paszarka lub szczelnie odgradzona siatką czy płachtami część kurnika), a przynajmniej część drobiu od razu umieszczają w dużych pakach, donoszonych na miejsce badania. Stół z przyborami do badań ustawia się pod oknem w części kurnika oswobodzonej od drobiu (mniej korzystne jest elektryczne oświetlenie lampy biurkowej); przy stole ustawia się krzesła (taborety dla lekarza i pobierającego krew, oraz paki (skrzynie) z drobiem. Zasadniczo zbędne jest prowadzenie szczegółowej listy badań, jednakże dla ewidencji zbadanego drobiu odnotowuje się każdą zbadaną dziesiątkę oraz numery skrzydłowe sztuk reagujących dodatnio. W większych fermach 2 osoby z obsługi fermy stale łapią i donoszą w skrzyniach drób do stołu (czynność ta odpada o ile drób jest w całości uprzednio umieszczony w skrzyniach, co jest bardzo wskazane i wybitnie ułatwia pracę), 2 osoby kolejno podają sztuki ze skrzyni osobie nakłuwającej żyłę, 1 osoba odnosi sztuki po pobraniu krwi do

klatek, a po zbadaniu każdej dziesiątki wybiera na polecenie lekarza sztuki reagujące i zamyka je w osobnej pacie, wypuszczając pozostałe na wybieg. Zależnie od szybkości pracy, lekarz bądź sam wykonuje i odczytuje odczyn zlepną płytki bądź, porucza pewne czynności laborantowi (rozdzielenie antygeny, nabieranie krwi na szpatułkę, pilnowanie porządku, kolejności i usuwania sztuk reagujących, niekiedy pobieranie krwi z żyły — o ile personel fermy nie potrafi sam pobrać).

Krew otrzymaną przez nakłucie żyły skrzydłowej przenosi się szpatułką na płytę i miesza z kroplą antygeny (0,03 ml), rozlanego uprzednio kroplomierzem do 10 wgłębien. Krew w ilości odpowiadającej jednej kropli pobiera się dotykając płaską stroną szpatułki miejsce nakłucia. Mieszanie krwi z antygenem winno następować szybko dla uniknięcia skrzepów. Wskazane jest również częste przechylanie płyty dla dokładnego mieszania i szybszego wystąpienia odczynu. Igłę i szpatułkę przeciera się za każdym razem 4%owym formolem. Przy dobrym tempie pracy lekarz wykonuje odczyn zlepną w 10 górnych wgłębieniach płyty w ciągu 2—3 minut, a wykonawszy odczyn w następnych 10 dolnych wgłębieniach płyty ma już całkowicie gotowy obraz do odczytania i odnotowania uprzednich 10 prób górnych. Wydrążenia płyty winny być znaczone (dermatografem) kolejnymi numerami, odpowiadającymi kolejnej numeracji klatek (gniazd zatraskowych) z badanym drobiem. Po odczytaniu wyników 1 rzędu lekarz poleca niezwłocznie usunąć drób reagujący do specjalnej paki lub osobnego pomieszczenia, skąd po ukończeniu badań całości kierownictwo gospodarstwa zabiera sztuki na ubój lub do fermy towarowej. Sztuki niereagujące są od razu po odczytaniu wyniku wypuszczane z klatek na wybieg, a do oswobodzonych klatek wkłada się kolejno nowe sztuki po pobraniu od nich kropli krwi. Po odczytaniu wyników odnośny rząd prób wyciera się ligniną, potem ligniną lub watą zwilżoną wodą, wreszcie wyciera na sucho.

Zaznaczyć należy, że czas potrzebny na pobranie kropli krwi jest prawie dwukrotnie krótszy, niż czas potrzebny na pobranie 1—2 ml krwi do aglutynacji próbowkowej, a krwawienie z drobnej ranki jest mniejsze w porównaniu z krwawieniem po pobraniu krwi do probówek (większe uszkodzenie żyły).

Zwróciliśmy uwagę na organizację i metodykę badań, gdyż czynności te winny być dokładnie przestrzegane i sprawnie przeprowadzone przez cały zespół — ekipę i personel fermy. Rekordy szybkości nie są wskazane. W ciągu godziny można zbadać w fermie wolnej od pulerozy około 200 sztuk, w fermie silnie zakażonej przynajmniej 100 sztuk.

O d c z y t y w a n i e w y n i k ó w. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i badań porów-

nawczych z aglutynacją próbkową doszliśmy do wniosku, że obowiązują wyniki odczytywane w ciągu 3 minut od chwili zmieszania krwi z antygenem. Po dodaniu do fioletowo zabarwionego antygenu kropli krwi, jednorodna mieszanina przybiera barwę brudno-fioletową, która w próbach ujemnych, przy braku grudek, utrzymuje się do końca. Przy odczynach dodatnich powstają fioletowo-niebieskie, początkowo drobne, później średnio- i grubo-ziarniste grudki aglutynatów, które przy przechyleniu płyty do i od siebie osadzają się wyraziście zwłaszcza na brzegu kropli, tworząc rodzaj ciemno-niebieskiego pierścienia. Nasilenie odczynu płytowego, analogicznie do próbkowego, oznaczaliśmy + + +, + +, i +, wyróżniając następujące zasadnicze typy przebiegu odczynu: 1. odczyn płytowy + + + (100 % aglutynacja) rozpoczyna się z reguły w pierwszej minucie (czasem po kilku sekundach) i osiąga szczytowe nasilenie w pierwszej lub drugiej minucie; 2. odczyn + + (ponad 50% aglutynacja) rozpoczyna się w pierwszej lub drugiej minucie i osiąga szczytowe nasilenie w pierwszej lub drugiej minucie; 3. odczyn + + niekiedy występuje w drugiej minucie i osiąga szczytowe nasilenie dopiero w trzeciej minucie; 4. odczyn + (poniżej 50 % aglutynacja) wyłącznie drobnoziarnisty występuje w drugiej lub trzeciej minucie i nie nasila się.

Odczyny płytowe typu 1 i 2 są z reguły dodatnie, odczyny typu 3 są przeważnie dodatnie, odczyny typu 4 są z reguły ujemne w aglutynacji próbkowej (w obowiązującym rozcieńczeniu 1/25). Za wyniki dodatnie uznawaliśmy w odczynie próbkowym (w rozc. sur. 1/25) nasilenie + + + i + +, a w odczynie płytowym (jak to wynika z cytowanych wyżej typów reakcji) również nasilenie + + + i + + występujące do 3 minut. Ze względów praktycznych nie uwzględnialiśmy wyników wątpliwych.

Badania porównawcze terenowo-laboratoryjne wykonywaliśmy już w sezonie 1952/53 r. na stosunkowo małej ilości drobiu w 2 gospodarstwach (1390 szt.); nie uwzględniamy ich jednak w obliczeniach ze względu na niecisłe ujęcie czasu obserwacji.

W sezonie 1953/54 przeprowadzono badanie 8 drobnych gospodarstw (po kilkanaście do kilkudziesięciu sztuk drobiu — łącznie 251 sztuk), oraz 14 dużych ferm drobiowych (po kilkaset do 2 tysięcy sztuk drobiu — łącznie 11352 sztuk). W tych środowiskach dwa gospodarskie kurniki (46 sztuk) i jedną fermę (909 sztuk) oceniono na podstawie obu zgodnie przebiegających odczynów za wolne od pulorazy. Większość zbadanego pogłowia stanowiły kury, a tylko w 2 gospodarstwach (645 + 30 sztuk) — indyki.

Razem przebadano 11603 sztuk w 22 gospodarstwach. Wyniki uzyskane w odczynie zlepnym próbkowym i terenowym z kroplą krwi zebrałe są schematycznie w tabeli.

Poz.	Aglutynacja		Ilość sztuk	Razem sztuk	%
	próbkowa	terenowa			
1	—	—	9943	9943	85,6
2	+++	+++	1147	1453	12,5
	+++	++	84		
	++	+++	163		
	++	++	59		
3	++, +++	-, +	48	48	0,4
4	-, +	++, +++	159	159	1,3

Z zestawienia (poz. 1, 2) wynika, że na 11603 sztuk otrzymano 9943 (85,6 %) wyników zgodnie ujemnych, 1453 (12,5 %) zgodnie dodatnich, czyli całkowita zgodność obu odczynów wynosiła 98,2%. W 48 przypadkach (0,4%) otrzymano w odczynie zlepym terenowym wyniki fałszywie ujemne (poz. 3), a w 159 przypadkach (1,3%) wyniki fałszywie dodatnie (poz. 4) — w stosunku do aglutynacji próbkowej. Analogicznie przeliczając uzyskane dane w odniesieniu wyłącznie tylko do prób reagujących pozytywnie próbkowo (1501), otrzymamy następujące odsetki: — zgodność odczynu terenowego i próbkowego wynosi 96,8 %, a wyników fałszywie ujemnych uzyskano w odczynie terenowym 3,1 %. Przy tego rodzaju zestawieniu wyniki przez nadmiar uzyskane w odczynie terenowym stanowią 10,5 % prób pozytywnych w odczynie próbkowym (poz. 4 w stosunku do poz. 2+3).

Należy podkreślić, że w przebadanych 3 gospodarstwach wolnych od pulorazy (955 sztuk drobiu) zarówno odczyn zlepny próbkowy jak i płytowy terenowy wypadły zgodnie ujemnie. Zaistniałe odsetki rozbieżności wyników w gospodarstwach zakażonych nie są naszym zdaniem wysokie. Wyniki przez niedomiary (fałszywie ujemne) w aglutynacji płytowej uzyskano w 0,4% przy obliczaniu odsetka względem całości badań, względnie w 3,1% przy odniesieniu odsetka wyłącznie do prób dodatnich w odczynie zlepym próbkowym. Przyczyny możnaby się dopatrywać bądź w częściowej odmienności szczepów użytych do odczynu terenowego i próbkowego, bądź w wykonaniu technicznym. Wyników przez nadmiar (fałszywie dodatnich) w aglutynacji płytowej uzyskano stosunkowo więcej, bo 1,3% zbadanego pogłowia, a 10,5% ilości sztuk reagujących próbkowo. Tłumaczyć to można prawdopodobnie nieco większą czułością metody płytowej, przy której stosowane rozcieńczenie jest znacznie niższe (krew + antygen w równych częściach), i która jest przeto w stanie wykazać obecność aglutynin we krwi w ilości mniejszej, niż ilość obowiązująca do uznania odczynu próbkowego jako dodatniego (rozc. 1/25). Jeżeli-

by część tych wyników była nieswoista, to mylne wyeliminowanie nawet 159 sztuk na przeszło 11 tysięcy sztuk drobiu nie posiada większego znaczenia gospodarczego.

Reasumując omówienie wyników, i zakładając, że podstawą do oceny jest odczyn próbówkowy, można przyjąć, że rozbieżności zaistniałe w odczynie terenowym nie są istotne i nie umniejszają wybitnych zalet praktycznych aglutynacji terenowej.

Stosowana od dwu lat dla odciążenia laboratoriów rozpoznawczych metoda aglutynacji szkiełkowej (płytkowej) z surowicą i antygenem barwionym zielenią brylantową nie posiada naszym zdaniem tylu stron dodatnich, co aglutynacja płytowa z kroplą krwi. Wyniki jakie otrzymaliśmy w sezonie 1953/54 r. przy badaniach porównawczych 11603 prób metodą aglutynacji próbówkowej i płytowej z surowicą są naogół zbliżone do omówionych powyżej wyników badań z kroplą krwi z tym, że rozbieżności zachodzą czasem nie tylko względem odczynu próbówkowego, lecz także między odczynem lepym szkiełkowym terenowym z kroplą krwi, a szkiełkowym laboratoryjnym z surowicą. Aglutynacja szkiełkowa z surowicą częściowo ułatwia pracę i to tylko w laboratorium, podczas gdy wszystkie czynności terenowe pozostają nadal takie same jak przy aglutynacji próbówkowej. Szereg wyliczonych na wstępie trudności technicznych, większe zużycie materiałów, czasu i sił roboczych oraz względy epizootologiczne przemawiają za stosowaniem przynajmniej w większych gospodarstwach drobiowych metody aglutynacji szkiełkowej (płytkowej) z kroplą krwi w terenie, zamiast aglutynacji próbówkowej lub szkiełkowej z surowicą w laboratorium.

#### Piśmiennictwo

1. Czarnowski A., Grycz E., Łosiński T., Szafarski J.: Instrukcja tymczasowa P.I.W. w sprawie badań na pulorozę. 1952. 2. Katona J.: Dyssertacja doktorska, Budapeszt. 1934. 3. Kolmer J. A., Boerner F.: Appro-

ved Laboratory Technic Appleton-Century Co. New York, 1945. 4. Marjek K., Nawrocki J., Szafarski J.: Med. Wet. 1949, 1. 5. Nawrocki J.: Med. Wet. 1953, 2. 6. Wiśniowski J.: Med. Wet. 1953, 3.

И. КОЦОВИЧ, А. РАТОМСКИ, Ю. ВИСЬНЁВСКИ

### КРОВЯНОКАПЕЛЬНЫЙ МЕТОД АГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ ПУЛЛОРОЗЕ

Диагностика боциллоносительства пуллороза методом лабораторной агглютинации с сывороткой встречает значительные затруднения при массовых исследованиях. Применяя местную агглютинацию с каплей крови и антигеном окрашенным кристалливиолетом, авторы сопоставляют полученные этим методом результаты с сывороточной агглютинацией в лаборатории.

В 22 хозяйствах исследовано 11603 птиц, с которых 1453 шт. реагировали положительно в пробирочной агглютинации. Сходные (положительные и отрицательные) результаты в кровянокапельной и пробирочной агглютинации получено в 98,2%, избыток кровянокапельной 1,3%, а ошибочно отрицательных 0,4% по отношению к целости проб.

Ряд технических затруднений, больше употребление материалов, времени и рабочей силы, а также эпизоотологические взгляды выступают в пользу применения, по крайней мере в больших фермах, метода пластинчатой кровянокапельной агглютинации в место пробирочной или пластинчатой с сывороткой в лаборатории.

I. KOCOWICZ, A. RATOMSKI, J. WIŚNIOWSKI

### SLIDE AGGLUTINATION TEST WITH ONE DROP OF BLOOD IN THE DIAGNOSIS OF WHITE DIARRHEA OF CHICKS

According to methods approved abroad (whole blood test), the authors examined 11603 samples of fowls in 22 farms. Each hen was examined with the slide and tube-agglutination test. In both tests were obtained the same results in 98,2 per cent. The slide agglutination test gives false positive results in 1,3 per cent, and false negative in 0,4 per cent.

The authors suggest that the whole blood test with the stained antigen (Cristalliviolet) have a great practical value in the mass diagnosis.

LEON ŻEBROWSKI

## Porównanie metody hemaglutynacji i metody posiewu na zarodkach kurzych w pośmiertnym rozpoznawaniu rzekomego pomoru drobiu

Z Zakładu Wirusologii P.I.W.  
Kierownik: lekarz wet. LEON ŻEBROWSKI

Wykazanie w tkankach zdrowych zwierząt substancji hamujących hemaglutynację wywołaną przez wirusy grupy grypy wyjaśniło w znacznym stopniu wysoki odsetek ujemnych wyników badań diagnostycznych wykonywanych metodą hemaglutynacji (Ha) na padłych kurach podejrzanych klinicznie, epizootologicznie i sekcyjnie o rzekomy pomór drobiu. Wychodząc z założe-

nia, że najważniejszym momentem dla rozpoznawania choroby zakaźnej jest wyizolowanie czynnika wywołującego, postanowiono przekonać się o porównawczej wartości rozpoznawczej metody hemaglutynacji i metody posiewu badanego materiału na zarodkach kurzych.

Oдноśne badania wykonywano w dwóch etapach. W etapie pierwszym, stanowiącym część