

JERZY WIŚNIEWSKI, JAN CHWALIBÓG, POLA GRAJEWSKA, MIROSLAW URBAŃSKI

Badanie mleka w oborze zakażonej brucelozą w świetle wyników serologicznych krwi

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Puławach, Oddział w Bydgoszczy

Kierownik: doc. dr J. WIŚNIEWSKI

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gorzowie

Kierownik: dr J. CHWALIBÓG

W końcowym etapie zwalczania brucelozy u bydła stosuje się zazwyczaj coraz bardziej swoiste i czule metody rozpoznawcze bez względu na ich koszt i trudności techniczne, gdyż przypadków jest coraz mniej, a znaczenie możliwe najbardziej wszechstronnej diagnozy wzrasta. Także w naszych warunkach krajowych można już zaobserwować taką tendencję uwidaczniającą się np. w serodiagnostyce. Zwiększa się ilość stosowanych odczynów serologicznych, ale niekiedy również i one zawodzą (2, 16, 23, 24). Z tego względu w przyszłości stosowane będą w szerszym niż dotąd zakresie także badania bakteriologiczne.

Z własnej praktyki kazuistycznej wiadomo, że przy badaniu przypadków brucelozy stwierdzonej klinicznie na podstawie wywiadu, stosując odpowiedni zestaw podłoża uzyskuje się znaczny odsetek pozytywnego rozpoznania sięgający 46% (4). Ponieważ prócz narządów rodnych krowy, wymię posiada także wybiórczą wrażliwość i podatność na zakażenie, dlatego mleko pochodzące od krów zakażonych często zawiera brucele i może być źródłem rozprzestrzeniania się choroby. Badanie mleka w tym kierunku jest więc jak najbardziej celowe.

Postanowiono przekonać się czy te same podłoża i metody hodowli, które dawały dobre rezultaty przy badaniu płodów i popłodów (4) będą nadawać się do badania mleka. Z epizootycznych względów badanie bakteriologiczne mleka ma tę wyższość nad badaniem poronionych płodów, że może być stosowane do wykrywania brucelozy klinicznie utajonej, a więc postaci szczególnie niebezpiecznej w końcowej fazie walki z tą chorobą. Wydaje się, że wyłączenie serologiczne badanie mleka jest w tym przypadku mniej przydatne, gdyż zdaniem niektórych autorów jedynie w ok. 50% przypadków dodatniej aglutynacji wskazuje ona na siewstwo (2,5). Inni jak *Janowsky, Mach, Potoćek i Růha* (12) wykazali, że w mleku pozytywnie reagującym w aglutynacji, w 65% można było stwierdzić brucele. Autorzy nie stwierdzili ścisłego związku między wysokością miana a siewstwem, ale z ich doświadczeń wynikało, że im wyższe było miano aglutynacyjne tym większe było prawdopodobieństwo siewstwa. Dalej badacze ci doszli do wniosku, że pomimo wysokiego miana aglutynin w mleku lub surowicy krwi, może nie zachodzić siewstwo z mlekiem, i przeciwnie przy ujemnym wyniku badania surowicy krwi w oborach zakażonych można było stwierdzić brucele w 50% przypadków. *Doyle, Bechet i Hayes Barger* (6) wykazali w oborach zakażonych, że siewstwo z mlekiem niekiedy o 3—8 miesięcy wyprzedza wystąpienie aglutynin. Zdaniem *Jepsena i Vindekilde* (13) zakażenie wymienia i siewstwo mogą przy brucelozie zawsze wystąpić. Brucele mogą się usadowić nawet w wymieniu jeszcze nierozwiniętym u niecielnich jałówek. Dlatego niekiedy dodatnie miano aglutynacji z mlekiem jest niezależne od miana krwi. *Hökl i Stepanek* (8) także badali zależność miana aglutynacyjnego w mleku i krwi u krów zakażonych, a siewstwo określali na świnkach morskich. Zdaniem autorów, im miano aglutynacji było wyższe tym wyższy był procent pozytywnych stwierdzeń biologicznych. Nie można było jednak ustalić, że takie lub inne miano można uznać za dowód siewstwa. Wahania miana mleka są tak samo spotykane, jak wahania miana krwi. Siewstwo przy brucelozie może być stałe albo trwać bardzo krótko. Dla przykładu, autorzy notowali przypadki gdy krowa tylko 1 dzień wydalała z mlekiem taką ilość bruceli, którą już można było

wykryć. Autorzy podają też, że np. *Houdin.ère* stwierdził u krowy siewstwo z mlekiem w 7 lat po poronieniu.

Badaniom serologicznym mleka poświęcono wiele prac, jednak zagadnienie ewentualnej zależności występowania aglutynin anty-*Brucella* w mleku od dokładnie określonego stanu sekrecji gruczołu mlekowego, jak wynika z dostępnej nam literatury, nie zostało szerzej naświetlone. Wiadomo jest bowiem, że przy *mastitis* istnieje zwiększona możliwość przenikania z krwioobieg do mleka m. in. specyficznych przeciwciał, i że zdaniem niektórych autorów (5) w ocenie wyników badania serologicznego mleka przydatne jest rozpoznanie ewentualnego stanu zapalnego gruczołu. Postanowiono więc badać też mleko na zawartość leukocytów i obecność najczęściej spotykanych bakterii chorobotwórczych dla wymienia, jako miarodajnych wskaźników stanu sekrecji wymienia.

Materiał i metody

Kompleksowe badania wykonano dwukrotnie w odstępie półrocznym. Materiałem do badań było mleko i krew krów znajdujących się w oborze szczegółowo przez nas obserwowanej od 1959 r. (20). W oborze tej, wolnej od gruźlicy, wybuchły w okresie obserwacji dwie fale poronień na tle potwierdzonej laboratoryjnie brucelozy. Pierwsza fala dotknęła 22 krów, które poroniły, a miała miejsce przed 6 laty w stosunku do obecnie opisanych badań, druga dotyczyła 9 poronień, które wystąpiły na kilka miesięcy przed rozpoczęciem tych badań. W oborze — w okresie obecnych badań — przebywało nadal kilka krów, które poroniły w czasie pierwszego wybuchu brucelozy. W oborze tej zgodnie z przepisami dokonywano także szczepień S-19.

Wykonano następujące badania mleka: 1) bakteriologiczne na brucelozę (4), 2) bakteriologiczne na *mastitis* (3, 21), 3) serologiczne na brucelozę (9), 4) biologiczne na brucelozę (11), 5) cytologiczne na *mastitis* (21), 6) kliniczne na *mastitis* (21), a ponadto 7) serologiczne badanie krwi na brucelozę: a) aglutynacją (9, 19), b) odczynem wiązania dopełniacza (10, 22).

Do badania bakteriologicznego próby mleka wlewano, ze śmietanki i osadu sporządzono preparaty mikroskopowe, barwione następnie metodą Kozłowskiego. Poszczególne próby mleka (w ilości ok. 10 ml) wlewano do pożywki namnażającej (90 ml) o składzie: bulion z 1% glukozy oraz fioletem gorczycki i zielenią malachitową w stężeniach ustalonych eksperymentalnie. Namnażanie w t. + 37° trwało 96 godzin — po czym wysiewano materiał à 3 oczka czy na: a) agar ziemniaczany z 2% gliceryny, b) agar krwawy z 10% krwi końskiej. Wszystkie podłoża były skontrolowane na zdolność wzrostu bruceli (szczepu terenowego i S-19). Posiane płytki (2 komplety) inkubowano w t. + 37° w warunkach tlenowych i beztlenowych przez 9 dni, kontrolując wzrost kolonii bakteryjnych makroskopowo, mikroskopowo i serologicznie (aglutynacją).

Zbadano w ten sposób w pierwszej serii 46 krów, w drugiej tylko wybrane, tj. te, które na podstawie wyników serii pierwszej wykazały najbardziej typowe reakcje serologiczne charakterystyczne dla zakażenia, względnie reakcje wzbudzające silne podejrzenie o zakażenie. Łącznie przebadano 279 prób mleka z poszczególnych ćwiartek wymienia.

Wyniki

Na podstawie badania serologicznego krwi oceniono zgodnie z przyjętym schematem (19), że 22 krów reaguje typowo dla zakażenia brucelozą, 3 krowy są silnie podejrzane o zakażenie, 5 krów reaguje jak po szczepieniu S-19, a 16 reaguje ujemnie.

W preparatach mikroskopowych i posiewach bakteriologicznych mleka w żadnym wypadku bruceli nie wykazano. Z mlekiem 4 krów zakażonych, wybranych losowo, wykonano próbę biologiczną. W jednym przypadku zaszczepiona świnka morska wykazała po 6 tygodniach dodatni odczyn aglutynacyjny (1:200). Sekcyjnie i hodowlanie u zaszczepionych świnek brucelozy nie wykazano.

Badania serologiczne mleka wykazały — w oparciu o komentarz Hilla (7), że w 67 próbach u 18 krów znajdowały się aglutyniny (wykazano duże różnice w wysokości mian) wskazujące na podejrzenie brucelozy wymienia. Wśród tej grupy krów, u 17 sztuk reakcje z surowicą krwi były typowe dla zakażenia, u jednej miały charakter reakcji poszczepiennej.

Zestawione wyniki badania serologicznego mleka i krwi na brucelozę z uwzględnieniem stanu sekrecji gruczołu młecznego* przedstawia tabela 1. Stwierdzono (lecz nie ujęto w tabeli) wysoką zgodność zaburzeń sekrecji określonych zwiększoną ilością leukocytów z obecnością w mleku bakterii patogennych dla wymienia (88,5%), natomiast nie udało się wykażać ścisłego związku między chroniczną względnie podkliniczną formą zapalenia gruczołu młecznego i obecnością specyficznych dla brucelozy aglutynin w mleku (poz. 4 i 6 tab. 1) u krów zakażonych.

Zwiększoną ilość komórek w mleku wykazano u 29 krów, w tym u 14 zakażonych brucelozą. W grupie tej obejmującej krowy z róż-

nymi formami stanów zapalnych wymienia (bez ostrych przypadków klinicznych) aglutyniny w mleku wykazano tylko u 10 krów. U 9 z nich badanie serologiczne krwi wskazywało na zakażenie, u jednej na reakcję poszczepienną. Na uwagę zasługuje fakt, że u 8 krów uznanych za zakażone, pomimo braku jakichkolwiek zaburzeń w obrębie gruczołu młecznego, wykazano obecność aglutynin w mleku. Z kolei u 5 krów również uznanych za zakażone pomimo stwierdzanych cytologicznie znacznych odchyśleń od normy a nawet klinicznych zmian w mleku i gruczole młecznym (3 krowy) w badanym mleku aglutynin nie wykazano. Ponadto w grupie krów zakażonych, u których stwierdzono stan zapalny obejmujący jednocześnie wszystkie ćwiartki wymienia, aglutyniny wykrywano przeważnie (80%) w mniejszej ilości ćwiartek. Na 17 ćwiartek wymienia (u 7 krów zakażonych), w których stwierdzono zmiany kliniczne na tle zapalnym, tylko u 12 z nich wykryto przeciwciała aglutynujące; w 5 pozostałych ćwiartkach przeciwciała nie wykazano.

Badania powtórne, przeprowadzone u 24 krów po upływie 6 miesięcy od pierwszego badania, wykazały stosunkowo znaczną stałość utrzymywania się aglutynin w mleku w poszczególnych ćwiartkach wymienia. Mianowicie, u 19 krów w obu badaniach aglutyniny wykazano w tych samych ćwiartkach wymienia danej krowy, natomiast u 6 krów odchylenia w obu kierunkach. Należy zaznaczyć, że badania powtórne wykazały u dwu krów zakażonych, u których w pierwszym badaniu próby serologiczne z mlekiem wypadły negatywnie obecność przeciwciał aglutynujących: u jednej w 2 u drugiej w 4 ćwiartkach.

Porównując wyniki obu badań w sensie wysokości miana, wykazano jednak wahania w poziomie aglutynin w mleku w zakresie 1—2° rozcieńczenia.

*) Badania kliniczne wykonał dr H. Grajewski.

Tab. 1. Wyniki badania serologicznego mleka i krwi w kierunku brucelozy z uwzględnieniem stanu sekrecji gruczołu młecznego

Badania krwi aglutynacją (agl.) i odczynem wiązania dopełniacza	Ilość krów	Badanie mleka						Ilość krów
		Agl. dodatnia*) w co najmniej 1 ćw. wymienia		Ilość krów	Agl. ujemna we wszystkich ćw. wymienia			
		Zaburzenia sekrecji w co najmniej 1 ćw. wym.**)	Brak zaburzeń w sekre- cji		Zaburzenia sekrecji w co najmniej 1 ćw. wym.	Brak zaburzeń w sekre- cji		
1	2	3	4	5	6	7	8	
wyniki ujemne	16	—	—	—	11	5	16	
wyniki dodatnie wskazujące na reakcję poszczepienną	5	1	—	1	3	1	4	
wyniki dodatnie wskazujące na zakażenie lub podejrzenie zakażenia	25	9	8	17	5	3	8	
Razem	46	10	8	18	19	9	28	

*) miana od 1:12,5 do 1:100 (najwyższe)

**) stwierdzane cytologicznie (TOK).

Omówienie

Uwzględniając wieloletnie obserwacje nad przebiegiem brucelozy w opisywanej oborze zakażonej, ocenia się pozytywnie przede wszystkim zespół metod służących do badania serologicznego krwi. Stanowisko to znajduje pośrednie potwierdzenie w niedawno opublikowanych badaniach Rickarda (15), który posługiwał się podobnym zestawem testów do tego jaki zastosowano w naszej pracy, oraz w pracy Nicoletti'ego i wsp., (14) którzy w ocenie różnych metod diagnostycznych stosowanych przy brucelozie, za najbardziej wartościowy w swoich warunkach pracy uznali odczyn wiązania dopełniacza.

Przeprowadzone przez nas badanie serologiczne mleka wykazało we wszystkich przypadkach pozytywne wyniki w aglutynacji mleka u tych krów, u których badanie serologiczne krwi wypadło dodatnio. O podobnych wynikach pisze Diernhofer (5), który stwierdza, że nigdy nie spotkał pozytywnej aglutynacji z mlekiem, a negatywnej aglutynacji z surowicą, dość często natomiast obserwował stosunki odwrotne.

Często przy pozytywnym mianie aglutynacyjnym w surowicy, w mleku nie stwierdza się aglutynin w żadnej z 4 ćwiartek. Wg Trauma i wsp. (17) zdarza się to u 7—12% krów. Diernhofer (5), podaje 10—30%, w naszych badaniach analogiczne wyniki uzyskano u 32% krów zakażonych. W grupie krów reagujących tak jak po szczepieniu S-19 — za wyjątkiem 1 krowy — nie wykazano w mleku aglutynin. Szybkie zanikanie mian aglutynacyjnych w mleku po upływie ok 3 miesięcy od daty szczepienia S-19 opisywali m.in. Wilkowa (18), Traum i wsp. (17). Bürki (1) podaje, że po szczepieniu S-19 aglutyniny w mleku utrzymują się dłużej niż 3 miesiące, a u ok. 9% szczepionego pogłowia aglutyniny w mleku nie pojawiają się w ogóle.

Podkreślana przez Diernhofera (5) i innych okoliczność (którą należałoby uwzględnić przy interpretacji wyników), że przy stanie zapalnym gruczołu mlecznego następuje zwiększone przenikanie białek, a więc m. in. przeciwiał z krwi do mleka nie znalazło w naszych warunkach pełnego potwierdzenia, z zaznaczeniem, że nie było w badanym przez nas materiale przypadków ostrego zapalenia wymienia. Mianowicie, w grupie 25 krów reagujących w badaniu serologicznym krwi typowo dla zakażenia, u 5 sztuk, pomimo stwierdzonych zaburzeń w obrębie gruczołu mlecznego stwierdzanych cytologicznie, a ponadto w 3 przypadkach klinicznie), aglutynin w mleku nie wykazano w żadnej ćwiartce. I odwrotnie u 17 krów zakażonych, aglutyniny w mleku występowały zarówno przy stanie zapalnym wymienia (9 krów), jak i bez stanu zapalnego (8 krów). Ponadto wydaje się ciekawe to, że

w grupie krów zakażonych, u których wykazano zaburzenia sekrecji w obrębie całego gruczołu mlecznego, aglutyniny w mleku występowały na ogół nie we wszystkich ćwiartkach.

Z wielu prac wynika, że badania bakteriologiczne mleka na brucelozę mają stosunkowo dużą wartość. Opinii tej nie negujemy pomimo ujemnych rezultatów tegoż badania w naszych warunkach pracy, nie pozwalających na zastosowanie pełnego zestawu podłoża. Chodzi tu przede wszystkim o wartościowe podłoże Kuzdasa i Morse'a, nieosiągalne z uwagi na brak odpowiednich odczynników na rynku krajowym, która to okoliczność w konsekwencji ogranicza możliwości diagnostyczne pracowni. Ponieważ stosowane przez nas podłoża dawały dobre wyniki przy badaniu innych materiałów (np. łożysko od roniących krów), uzyskane negatywne wyniki w badaniu bakteriologicznym mleka wskazują na szczególne trudności diagnostyczne w odniesieniu do tego właśnie materiału oraz zawodność badań tego typu w warunkach pracowni rozpoznawczej.

Wnioski

Kontrolując uzyskane wyniki z wieloletnimi własnymi obserwacjami epizootycznymi, poczynionymi w oborze zakażonej brucelozą dochodzi się do wniosku, że w przypadku jednorazowego badania pogłowia zakażonego, najbardziej wartościowe rozpoznanie zapewniają odczyny serologiczne krwi. Natomiast jednorazowe badanie serologiczne mleka, które zresztą można przeprowadzić tylko u krów mlecznych, wydaje się mniej miarodajne w diagnostyce indywidualnych krów.

Badanie bakteriologiczne mleka — w warunkach jakie opisano — zawodzi. Stąd przed pracownikami rozpoznawczymi WZHW staje potrzeba — wobec trudności w zaopatrzeniu ustalenia na drodze eksperymentalnej najodpowiedniejszego zestawu podłoża przydatnych do wykrywania bruceli w mleku.

Nie stwierdzono uchwytnej zależności między występowaniem aglutynin w mleku a chroniczną względnie podkliniczną formą zapalenia gruczołu mlecznego.

Piśmiennictwo

1. Bürki F.: Schweiz. Arch. f. Tierheilk., 1958, 100, 439.
2. Bürki F.: Wien. tierärztl. Mschr. 1961, 48, 1.
3. Chodkowski A.: Annales UMCS, S, DD, 1954, IX, 47.
4. Chwałtóg J.: w opracowaniu do druku.
5. Diernhofer K.: Wien. tierärztl. Mschr., 1956, 43, 396.
6. Doyle et al.: cyt. wg (8).
7. Hill W. H. W.: Zbl. Vet.-med., 1963, B, 10, 127.
8. Hökl J., Stepanek M.: „Hygiene der Milch und Milcherzeugnisse“ Veb Gustav Fischer Verlag Jena 1965.
9. Instrukcja wykonywania aglutynacji w WZHW, 1964.
10. Instrukcja wykonywania odczynu wiązania dopełniacza w WZHW, 1964.
11. Instrukcja wykonywania badań bakteriologicznych w kierunku brucelozy w WZHW, 1964.
12. Janowský et al.: cyt. wg (8).
13. Jepsen i Vendekilde: cyt. wg (8).
14. Nicoletti P., Muraski T. F.: Amer. J. Vet. Res., 1966, 27, 689.
15. Rickard B. F.: New Zealand veterin. J., 1965, 13, 72 (streszczenie).
16. Seelemann M., Börger K., Mayer A.: Mh. Tierheilk., 1961, 13, 192.
17. Traum et al.: cyt. wg (1).
18. Wilkowa G.: Medycyna Wet., 1960, 16, 140.

19. Wiśniowski J.: *Medycyna Wet.*, 1964, 20, 641.
 20. Wiśniowski J., Drożdżyński W.: *Medycyna Wet.*, 1961, 17, 565.
 21. Wiśniowski J., Grajewski P., Grajewski H.: *BTN*, 1963, A, nr 4.
 22. Wiśniowski J., Królik M.: *Pol. Arch. Wet.*, 1966, 9, 637.

23. Wiśniowski J., Romaniukowa K., Drożdżyńska M.: *Medycyna Wet.*, 1964, 20, 327.
 24. Wiśniowski J.: *Medycyna Wet.*, 1966, 22, 472.

Adres autora: doc. dr Jerzy Wiśniowski, Bydgoszcz, Sułkowskiego 67 m. 34.

KRYSTYNA MALIK

Zastąpienie u gronkowców próby na koagulazę odczynem aglutynacji w postaci grudek

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Krakowie
 Dyrektor Stacji: doc. dr M. BILEK

Od dawna stwierdzono, że szczepy gronkowców wyosobnione z przypadków chorobowych, wytwarzają kilka czynników związanych z ich potencjalną chorobotwórczością. Do tych czynników należy hemolizyna, leukocydyna, fibrynolizyna, enterotoksyna, koagulaza itp. Już w 1903 r. Loeb stwierdził, że gronkowce wyosobnione z przypadków chorobowych, a następnie inkubowane w plazmie powodują jej krzepnięcie. Również Much (1908) zauważył, że gronkowce zanurzone w plazmie natychmiast powodują wytworzenie się agregatów grudekwo-kłaczkowych. Champan (1944), oraz Halman (1961) uważają wytwarzanie koagulazy za kryterium chorobotwórczości gronkowców. Cadnes — Graves i wsp. (1943) ustalili, że gronkowce wytwarzają 2 postaci koagulazy, a to koagulazę związaną, którą można wykryć za pomocą metody szkiełkowej („slide test”), oraz koagulazę wolną, którą można wykryć metodą próbówkową. Obie koagulazy są tą samą substancją białkową, różnią się tylko mechanizmem działania. Koagulaza związana działa bezpośrednio na fibrynogen (niektórych zwierząt) i powoduje natychmiast zlepianie się (clumping) drobnoustrojów. Natomiast wolna koagulaza działa na protrombinę (niektórych zwierząt) zmieniając ją na substancję trombino podobną. Aktywator (protrombina) dla wolnej koagulazy gronkowców występuje tylko w plazmie ludzkiej i w plazmie zwierzęcej królika, konia. Na działanie związanej koagulazy najbardziej wrażliwa jest plazma człowieka, królika, psa, oraz myszy, średnio wrażliwa plazma pochodzenia krowiego i końskiego, a plazma barania i świnia morskiej jest całkowicie niewrażliwa.

Celem niniejszej pracy jest stwierdzenie, czy można zastąpić odczyn koagulazy wykonanej metodą próbówkową odczynem aglutynacji grudekwo-kłaczkującej w plazmie ludzkiej cytrynianowej i w plazmie króliczej.

Materiał i metody

Materiałem do badań były szczepy gronkowców złocistych i szczepy gronkowców białych wyosobnione z artykułów żywności pochodzących z przypadków zatruczeń pokarmowych i z artykułów żywności pochodzących z obrotu, przysyłanych do zbadania do Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Krakowie, w celu oceny przydatności do spożycia.

Ogółem przebadano 750 szczepów gronkowców w tym 500 szczepów gronkowców złocistych koagulazo-dodatnich i 250 szczepów gronkowców białych koagulazo-ujemnych. Wyizolowane szczepy pochodziły z artykułów żywności, a mianowicie mleka i przetworów mlecznych, mięsa i przetworów mięsnych, przetworów cukierniczych, ryb i przetworów rybnych. Materiał do badań wysiewano na płynną pożywkę namnażającą i po 48-godzinnym okresie inkubacji w 37° przesiewano na pożywkę stałą Chapmana. Po 48 godzinach inkubacji w 37° na pożywkę tej zaobserwowano wzrost kolonii okrągłych, wypukłych, nieprzejrzystych, o gładkiej błyszczącej powierzchni, o zabarwieniu przejściowym od koloru białego do żółtożółtego. Kolonie gronkowców przesiewano następnie

na płytkę agarową z dodatkiem 5% krwi baraniej w celu znaczenia hemolizy, barwnika, jak również w celu wykonania odczynu na koagulazę. Odczyn na koagulazę nastawiano z hodowli 24 godzinnej, w ten sposób, że rozcieńczoną plazmę króliczą w stosunku 1:5 w roztworze fizjologicznym NaCl i rozcieńczoną plazmę ludzką cytrynianową w stosunku 1:25 w bulionie zwyczajnym i w roztworze fizjologicznym NaCl w stosunku 1:5 rozlewano jałowo do probówek o średnicy 1 cm w ilości 0,5 ml. i rozcierano w nich eż badane szczepy.

Przy każdorazowym nastawianiu odczynu uwzględniano kontrolę dodatnią i ujemną w celu sprawdzenia plazmy. Przy każdej serii oznaczeń sprawdzano każdą partię plazmy ludzkiej cytrynianowej na obecność inhibitorów koagulazy, które mogą hamować przebieg reakcji. Probówki z nastawionym odczynem wstawiano do termostatu o temperaturze 37°. Wynik odczytywano po 3 i po 24 godzinach. Za szczepy koagulazododatnie uznawano szczepy, które w ciągu 3—24 godzin ścinały plazmę króliczą i plazmę ludzką cytrynianową. Szczepy gronkowców nieścinających plazmy króliczej i plazmy ludzkiej cytrynianowej rozcieńczonej w bulionie zwyczajnym i roztworze fizjologicznym NaCl, uważano za koagulazo-ujemne.

Oprócz odczynu na koagulazę wykonanego metodą próbówkową nastawiano również odczyn aglutynacji kłaczkującej w postaci grudek na szkiełkach podstawowych dla wykrycia koagulazy związanej. Na szkiełku odtłuszczonym i nieodtłuszczonym umieszczano eż (o średnicy 2 mm) po jednej kropli wody destylowanej. Następnie materiał z każdego badanego szczepu gronkowców rozcierano w kropli wody destylowanej na jednym i na drugim szkiełku podstawowym, nie opalając ezy przy przenoszeniu materiału z pierwszego szkiełka podstawowego na drugie szkiełko podstawowe, tak aby otrzymać jednolitą zawiesinę gronkowców o zmętnieniu odpowiadającym zawiesinie przynajmniej 100×10⁹ *E. coli* w cm³. Następnie wyjałowioną eż o średnicy 1 mm nakładano świeżą cytrynianową plazmę ludzką na kroplę wody destylowanej z gronkowcami umieszczonymi na nieodtłuszczonym szkiełku podstawowym. Około 10 sekund wprowadzano szkiełko podstawowe w ruch kolisty. Jeżeli nastąpiło skupienie gronkowców w plazmie ludzkiej cytrynianowej, wynik oceniano jako dodatni. Skupienie gronkowców Cruickshank (1965), Duthie (1954) tłumaczą obecnością czynnika kłaczkującego („clumping factor”) powodującego wytrącenie się fibrynogenu na powierzchni komórki drobnoustroju. Rozmaz na drugim szkiełku podstawowym barwiono metodą Grama, w celu potwierdzenia obecności gronkowców.

Wyniki badań i ich omówienie

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 1 i 2.

Jak widzimy z powyższych danych gronkowce złociste wykazują dodatni odczyn próbówkowy na koagulazę wolną w 100% przy użyciu