

dorośle poddaje się narkozie eterowej (około 1—1,5 g eteru do narkozy). Jako wyniki dodatni próby biologicznej przyjmuje się wystąpienie typowych dla zgnilca złośliwego zmian anatomo-patologicznych, stwierdzenie obecności zarodników w preparatach mazanych z obumarłych larw pszczołach oraz uzyskanie z nich czystej hodowli *Bac. larvae*. Przeprowadzenie próby biologicznej na pszczołach jest jednak kłopotliwe i pracochłonne i dlatego też nie jest ona stosowana w rutynowej diagnostyce.

## Piśmiennictwo

1. Azuma R., Kitaoka S.: Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 5, 138, 1965.
2. Bailey L., Gibbs A. J.: J. Gen. Microbiol. 28, 385, 1962.
3. Bailey L., Lee D. C.: J. Gen. Microbiol., 29, 711, 1962.
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ed. VII, 1957.
5. Foster J. W., Hardwick W. A., Guirard B.: J. Bact. 59, 463, 1950.
6. Gliški Z.: Annals UMCS, s. DD. 1967 w druku.
7. Gochmayer T. A.: Bee World 36, 101, 1955.

8. Gochmayer T. A.: Proc. X. Int. Congr. Entomol. Montreal, 1991, 1956.
9. Holst E. C., Sturtevant A. P.: J. Bacteriol. 40, 723, 1940.
10. Holst E. C.: Amer. Bee J. 86, 14, 1946.
11. Kitznelson H., Lochhead A. G.: Sci. Agr. 24, 474, 1944.
12. Kirkor S.: Choroby pszczoł. PWRiL, 1953.
13. Krasikow W. J.: Pezielowodstwo, 33, 43, 1956.
14. Lancefield F.: J. Exp. Med. 47, 12, 1928.
15. Lochhead A. G.: Sci. Agr. 9, 80, 1928.
16. Lochhead A. G.: Canad. J. Res. 15, 79, 1937.
17. Lochhead A. G.: J. Bacteriol. 44, 185, 1942.
18. Mwtzger J., Chauncey F., Smith W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 903, 1962.
19. Morgenthaler O.: Schweiz. Bienen Ztg. 71, 293, 1948.
20. Poltiew W. I.: Boliezni Peziel, Leningrad, 1964.
21. Smirnow I. J.: Wietrinarija, 5, 100, 1966.
22. Smith R. L., Beck J. W., Anderson B. J.: J. Bacteriol. 57, 213, 1949.
23. Steinhilber E. A.: Insect Pathology, Acad. Press, NY, London, 1963.
24. Stoilova V.: Zent. f. Bakt. II Abt. 99, 124, 1936.
25. Tarr H. L. A.: Ann. Apl. Biol. 25, 633, 1938.
26. Trilenko W. A.: Sbornik Robot. Ken. Wet. Institut. 25, 1963.
27. White G. F.: US. Dep. Agr. Bull. Entomol. Tech. Sci. 14, 50, 1966.
28. White G. F.: Science 49, 362, 1919.
29. White G. F.: US. Dep. Agr. Bull., 809, 1920.
30. Zahaczewska M., Furwicz A.: Medycyna Wet. 12, 739, 1964.

Adres autora: dr Zdzisław Gliški, Lublin, ul. Akademicka 11.

JERZY MIERZEJEWSKI

## Porównanie odczynu immunofluorescencji i metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek duru mysiego

Ośrodek Naukowo-Badawczy Służby Weterynaryjnej

Wykrywanie pałeczek rzekomodurowych za pomocą odczynu immunofluorescencji (if) było przedmiotem wielu badań (2—9, 11—13). Początkowo w latach 1957—62 w zasadzie wszyscy autorzy przyjmowali że odczyn if może z powodzeniem zastąpić dotychczasowe klasyczne metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek rzekomodurowych. Nowsze prace z tej dziedziny a szczególnie praca Michajłowa i Persa (8) wskazują na mniejsze możliwości użycia w tym celu odczynu if, ze względu na powiązania antygenowe w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*.

W dotychczasowych pracach autorzy nie porównali czułości odczynu if i obecnie stosowanej metody posiewów przy wykrywaniu pałeczek rzekomodurowych, zmieszanych z bakteriami saprofitycznymi. Większość badań nad oceną odczynu if prowadzono na jednorodnych hodowlach pałeczek rzekomodurowych. Tymczasem w praktyce laboratoryjnej spotyka się bardzo często hodowle mieszane, w których obok pałeczek rzekomodurowych wyrastają inne bakterie często zupełnie saprofityczne. Wzrost tych ostatnich może być tak znaczny, że na pożywkach stałych zupełnie nie stwierdza się kolonii pałeczek rzekomodurowych, mimo że w badanym materiale mogły one występować. Przypadki takie zdarzają się szczególnie często przy badaniu materiału nieświeżego, w którym namnaża się postronna flora bakteryjna i „zagłusza” wzrost bakterii chorobotwórczych.

W związku z tym w badaniach własnych

postanowiono porównać odczyn if i metodę posiewów przy wykrywaniu pałeczek duru mysiego, które mieszano w odpowiednich ilościach z hodowlami bakterii saprofitycznych namnożonych z próbek mięsa.

### Materiał i metody

Do badań użyto: 1. Surowicę diagnostyczną poliwalentną „HM” i grupową „OB” dla pałeczek rzekomodurowych produkcji Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

2. Antyglobulinę króliczą oznakowaną (Fluorescein-conjugated anti-rabbit globulin goat GARY-FITC) produkcji Instytutu Surowic i Szczepionek w Pradze Czeskiej „Sevac”.

3. Hodowle 24-godzinne bakterii z próbek mięsa namnożone na pożywce z zielenią brylantową pochodzące z Laboratorium Weterynaryjnej Inspekcji Sanitarnej (WIS) w Puławach.

4. Nieoznaczony szczep pałeczek duru mysiego wyizolowany z próbki mięsa wieprzowego.

Hodowle 24-godzinne z próbek mięsa uznane przez Laboratorium WIS jako niechorobotwórcze zakażano nieoznaczonym szczepem pałeczek duru mysiego. W zależności od doświadczenia na 1 ml hodowli dawano określoną liczbę pałeczek od  $10^4$  do  $10^7$  w formie zawiesiny w płynie fizjologicznym. Zawiesinę tę przygotowywano ze spluczyn 24-godzinnej hodowli agarowej i ustalano gęstość według skali McFarlanda. W próbkach hodowli zakażonych wykrywano pałeczki duru mysiego za pomocą odczynu if oraz metody posiewów. Jednocześnie dla kontroli metod przeprowadzono takie same badania pewnej liczby hodowli niezakażonych pałeczkami.

Odczyn if nastawiano następująco: robiono rozmazy na szkiełkach podstawowych, utrwalało się płomieniem, zalewano surowicą diagnostyczną „HM” lub „OB” rozcieńczoną 1:4, przetrzymywano przez 30 min. w komorze wilgotnej, po czym płukano wodą i zalewano oznakowaną antyglobuliną króliczą też

rozcieńczoną 1:4. Po 30 minutach przetrzymywania w komorze wilgotnej preparat płukano, dawano na niego kroplę zbuforowanej gliceryny, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i oglądano w mikroskopie luminescencyjnym ML-2, stosując filtry FC-1-4, CZC-7-2, BC-82, okular 5x i obiektyw 90x.

Posiewy przeprowadzono według przepisów obowiązujących w laboratoriach WIS. Hodowle na pożywcze z zielenią brylantową i laktozą przesiewano na agar z zielenią brylantową i laktozą oraz na podłoże Sołtysa. Kolonie pałeczek Gram ujemnych nie rozkładające laktozy badano za pomocą próby serologicznej oraz posiewano na rzędy barwne cukrów i alkoholi w kierunku na pałeczki rzekomodurowe\*.

Ogółem nastawiono 8 doświadczeń, z czego w doświadczeniach 1—4 użyto surowicę „HM” a w doświadczeniach 5—8 surowicę „OB”. W każdym doświadczeniu badano po 40 hodowli, z których część była zakażona pałeczkami duru mysiego.

Wyniki uzyskane za pomocą odczynu if i metody posiewów poddano statystycznej analizie posługując się testem  $\chi^2$  (wg 10)\*\*.

Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane we wszystkich 8 doświadczeniach przedstawione są w tabeli 1.

Tab. 1. Wyniki wykrywania pałeczek duru mysiego za pomocą odczynu if i metody posiewów

Surowica	Nr dośw.	Ilość pat. w 1 ml	Ilość próbek	W tym zakaż.	Wynik dodatni					
					odczynem if			met. posiewów		
					poprawny	mylny	test $\chi^2$	poprawny	mylny	test $\chi^2$
„HM”	1	10 <sup>7</sup>	40	22	15	—	6	22	—	0
	2	10 <sup>6</sup>	40	40	40	—	0	40	—	0
	3	10 <sup>5</sup>	40	18	14	6	0,4	12	—	6
	4	10 <sup>4</sup>	40	21	11	3	3,27	7	—	14
„OB”	5	10 <sup>7</sup>	40	17	16	3	0,3	14	—	3
	6	10 <sup>6</sup>	40	22	16	—	6	21	—	1
	7	10 <sup>5</sup>	40	20	12	—	6,4	19	—	1,5
	8	10 <sup>4</sup>	40	20	20	—	0	20	—	0

Wartość krytyczna t  $\chi^2 = 3,84$ .

Jak wynika z tabeli 1 stosując odczyn if z użyciem surowicy „HM” udało się zweryfikować statystycznie prawdopodobieństwo wykrywania pałeczek duru mysiego we wszystkich doświadczeniach z wyjątkiem pierwszego, w którym było bardzo dużo pałeczek (10<sup>7</sup> w 1 ml). W pozostałych doświadczeniach 2—4 wartości testu  $\chi^2$  były mniejsze od wartości krytycznej 3,84, a więc mieściły się w granicach statystycznej wiarygodności. Wyniki badań metodą posiewów zweryfikowano tym samym testem okazały się gorsze w przypadku mniejszej liczby bakterii. Zarówno w doświadczeniu 3 jak i 4 wobec liczby pałeczek rzędu 10<sup>4</sup> i 10<sup>5</sup> w 1 ml wartości testu były większe od wartości krytycznej.

Ujemne wyniki oznaczeń uzyskane w doświadczeniu 1 i 4 za pomocą odczynu if można

próbować tłumaczyć właściwością namnożonej flory bakteryjnej do hamowania odczynu łączenia się przeciwciał zawartych w surowicy diagnostycznej z pałeczkami duru mysiego. Analiza składu postronnej flory bakteryjnej w próbkach hodowli wykazała obecność bakterii z rodziny *Pseudomonadaceae* oraz z grupy *E. coli*. Być może, że te ostatnie wpływają ujemnie na powstawanie odczynu if, ze względu na bliskie antygenowe pokrewieństwo z pałeczkami rzekomodurowymi.

Gorsze wyniki w odczynie if uzyskano posługując się surowicą grupową „OB” (doświadczenia 5—8). Do grupy tej należy użyty w badaniach szczep pałeczek duru mysiego. W doświadczeniach 6 i 7 wobec liczby pałeczek rzędu 10<sup>6</sup> i 10<sup>7</sup> wyniki nie dały się zweryfikować statystycznie (wartość testu 6 i 6,4 wobec wartości krytycznej 3,84). (Wyniki uzyskane przy użyciu surowicy „OB” potwierdzają spostrzeżenia Haglunda i wsp. (2), którzy podkreślali, że przy użyciu przeciwciał somatycznych „O” do identyfikacji pałeczek duru mysiego uzyskuje się więcej wyników ujemnych.

W doświadczeniach 3 i 4 z użyciem surowicy „HM” do wykrywania 10<sup>4</sup> i 10<sup>5</sup> pałeczek w 1 ml hodowli i w doświadczeniach 5 z użyciem surowicy „OB” do wykrywania największego stężenia tj. 10<sup>7</sup> pałeczek w 1 ml uzyskano kilka wyników błędnych. Preparaty zrobione z samych hodowli saprofitycznych zostały uznane za zakażone pałeczkami duru mysiego. Można w tym przypadku zastosować następującą próbę tłumaczenia: albo w tych hodowlach wystąpiły bakterie mające powiązania serologiczne z pałeczkami duru mysiego albo bakterie mające właściwości fluoryzujące poprzez wytwarzanie barwników, jak w przypadku rodziny *Pseudomonadaceae*.

Z przedstawionych badań własnych wynika, że klasyczne metody wykrywania pałeczek duru mysiego wymagające dużo czasu są stosunkowo mało czułe w porównaniu do odczynu if. Odczyn ten z zastosowaniem surowicy poliwalentnej „HM” można polecić do orientacyjnej diagnostyki zakażeń produktów spożywczych. Prawdopodobieństwo wykrycia pałeczek przy zastosowaniu odczynu if będzie wzrastało szczególnie w tych przypadkach, w których ilość pałeczek w zakażonych produktach (przynajmniej mięsnych) będzie niewielka lub wystąpią jednocześnie saprofityczne bakterie namnożone intensywnie. Jak wiadomo pałeczki duru mysiego są jednymi z najczęściej występujących pałeczek rzekomodurowych w zakażeniach mięsa i innych produktów żywnościowych. Prawdopodobnie odczyn if mógłby okazać się przydatny przy orientacyjnym wykrywaniu i innych pospolitych szczepów pałeczek rzekomodurowych.

Należy więc dążyć do stopniowego wdrażania tego odczynu do praktyki laboratoryjnej,

\*) Posiewy i odczyty posiewów przeprowadziła lek. wet. A. Kossakowska (Instytut Weterynarii — Puławy).  
\*\*) Obliczenia statystyczne wykonał dr M. Dąbek (Katedra Statystyki Matematycznej UMCS — Lublin).

by wykrywać orientacyjnie możliwe jak najwcześniej zakażenia produktów spożywczych pałeczkami rzekomodurowymi.

#### Piśmiennictwo

1. Diakow S. J., Orieczkina M. L.: *Woj. Medyczn. Żurn.* 143, 55, 1966.
2. Haglund J. R., Ayres J. C., Paton A. M., Kraft A. A., Quinn L. I.: *Appl. Microb.* 12, 447, 1964.
3. Iwanowa S. P.: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 11, 25, 1960.
4. Kuźmin N. A.: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 26, 23, 1962.
5. Łarionow A. P., Kuźmin N. A.: *Wietierinarija*, 36, 68, 1959.
6. Łarionow A. P., Zalewskij L. P., Kuźmin N. A.: *Wietierinarija*, 37, 85, 1960.
7. Michałłow I. F., Li Li: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 22, 10, 1958.
8. Michałłow J. F., Pers I. F.: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 42, 97, 1965.
9. Miroljubowa L. B., Dwurieczinska G. S.: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 33, 3, 1962.
10. Mc Nemar Q.: *Psychological Statistics* — J. Wiley — N. York, 1949.
11. Osipowa I. W.: *Żurn. Mikrob. Epid. Immun.* 33, 77, 1962.
12. Thomason B. M., Cherry W. B., Moody M. D.: *J. Bact.* 74, 525, 1957.
13. Thomason B. M., Cherry W. B., Edwards P. R.: *J. Bact.* 77, 478, 1959.

Adres autora: dr Jerzy Mierzejewski, Puławy, Al. Partyzantów 8/18.

Межеевски Е. — Сравнительная оценка метода иммунофлуоресценции и метода посевов в диагностике палочек *Salmonella typhimurium*.

Установили что требующий много времени метод культивирования является с сравнением с реакцией иммунофлуоресценции мало чувствительным. Вероятность установления палочек *Salmonella typhimurium* методом иммунофлуоресценции возрастает особенно там где палочек мало.

Mierzejewski J. — The comparison of immunofluorescence test and smear techniques in the *Salmonella typhimurium* detection.

Immunofluorescence test (IF) was compared with smear technique in *Salmonella typhimurium* detection. It was stated that smear technique occupies a great deal of time and is less sensitive than IF test. The probability of *Salmonella* detection by the use of IF test with HM serum will increase especially in places where there is a small number of *Salmonella*.

ROMAN BOCHDALEK, JÓZEF WASILEWSKI

## Zastosowanie próbek silikonowanych w odczynie hemaglutynacji (OHA) przy gruźlicy

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynarii WSR  
we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr T. SOBIECH

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynarii WSR  
we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr G. ZAŁUCKI

Na wysokość mian w odczynach hemaglutynacji (OHA) i hemolizy (OHL), określających poziom przeciwciał w przypadkach zmian gruźliczych zarówno u ludzi jak i u zwierząt, może mieć wpływ szereg czynników.

Jednym z ważnych komponentów przy wykonywaniu tych odczynów jest dobór odpowiedniego antygeny, warunkującego czułość i swoistość reakcji (6, 8, 13), oraz dobór właściwych adsorbentów: krwinki różnych gatunków zwierząt, kolodium, kaolin, lateks, oraz komórki drobnoustrojów saprofitycznych (*Serratia marcescens*). Modyfikacja powierzchni krwinek poprzez zmianę ich własności fizyko-chemicznych przez zastosowanie takich fermentów jak: trypsyna, pepsyna, papaina czy inulina, oraz adsorbenty o powierzchni bardziej jednolitej pod względem budowy chemicznej niż krwinki nie pozostają też bez znaczenia. Gęstość zawiesiny krwinek uczulonych stanowi również ważny element w reakcji hemaglutynacji. Birn (1) podaje, że obniżenie koncentracji krwinek powoduje wzrost miana. Sposób inaktywacji surowic (fizyczny lub chemiczny), ich absorpcja względnie jej pominięcie, czas i warunki w jakich przeprowadza się uczulanie krwinek i wykonuje właściwy odczyn, oraz pH płynów buforowych decydują też o wynikach. Wg Sobiechę i wsp. (9) wysokość miana w OHA zależy od rodzaju tuberkuliny, różnych adsorbentów, krwinek różnych gatunków zwierząt, oraz innych często subtelnych różnic natury techniczno-laboratoryjnej. Odgrywają też rolę różnice serologiczne między prątkiem zakażającym, a prątkiem z którego sporządzono antygen. Poziom przeciwciał może być zależny wreszcie od postaci schorzenia i stopnia zaawansowania zmian (2, 5, 13).

Założeniem niniejszej pracy było wykazanie ewentualnych różnic w zachowaniu się mian surowic w OHA wykonywanym w próbkach

pokrytych emulsją silikonową, czyszczonych i mytych wyłącznie w wodzie destylowanej, oraz w wodzie zwykłej.

#### Materiał i metody

Badania wykonano na 100 surowicach bydłowych, przy czym w każdej z nich poziom hemaglutynin oznaczano w 3 różnych wariantach. OHA wykonywano wg metody Heina (6) z użyciem krwinek baranich trypsynowanych tuberkuliną PPD ssaków w rozcieńczeniu surowic od 1:2 do 1:512. Do badań użyto 3 rodzaje próbek. Probówki czyszczone i myte w wodzie zwykłej — wariant I; w wodzie destylowanej — wariant II; oraz hydrofobizowane emulsją silikonową — wariant III. Probówki przeznaczone do hydrofobizacji po bardzo starannym oczyszczeniu i odtłuszczeniu płukano kolejno w wodzie gorącej, zimnej i destylowanej i wstawiano do suszarki. Po wysuszeniu przeprowadzono silikonowanie ich wewnętrznej powierzchni przez kilku — minutową kąpiel w wodnej emulsji oleju metylo-silikonowego — Aquasil F 33% (ITS) — seria I, oraz w silikonie Dow Corning (DC) 200 Fluid o lepkości 350 cP, w 2% roztworze toluenowym — seria II. Silikon po нанесieniu na hydrofilną wewnętrzną powierzchnię próbek szklanych osuszano w temp. pokojowej, gdzie rozpuszczalnik wyparowywał całkowicie, nie pozostawiając żadnych zanieczyszczeń powierzchniowo aktywnych. Następnie probówki umieszczano w piecu muflowym na 30 minut w temp. 200°C, celem wyprażenia powłoczek silikonowych, co warunkowało ich trwałość.

#### Wyniki badań i omówienie

Zbadano łącznie 100 surowic w 2 seriach i poszczególnych wariantach. Otrzymane miana każdej surowicy porównano wariantami ze so-