

PRAKTYKA LABORATORYJNA

DANUTA ROMANOWSKA

Odczyn wiązania dopełniacza nastawiany przy pomocy mikropipety w 1/5 dawki

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie
Kierownik: dr habil. S. SAMOL

Zakłady Higieny Weterynaryjnej zobowiązane są do wykonywania odczynu wiązania dopełniacza (OWD) w kierunku brucelozы według instrukcji tymczasowej Ministerstwa Rolnictwa Dep. Wet. Nr 14 z dnia 1 października 1964 r.

Powyższa instrukcja podkreśla, że zasadniczo każdą badaną surowicę należy nastawiać w 4 kolejnych rozcieńczeniach (1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Przy badaniach masowych instrukcja dopuszcza jednak możliwość nastawiania surowicy tylko w jednym rozcieńczeniu (1:25).

Przy nastawianiu odczynu tylko w jednym rozcieńczeniu zakłada się z góry możliwość uzyskania pewnego procentu wyników błędnych — pozornie ujemnych. Jest to związane z występowaniem strefy nieswoistej hemolizy w pierwszych rozcieńczeniach (tzw. „prozone”), szczególnie w przypadku surowic o wysokim poziomie przeciwciał.

Dlatego też wskazane byłoby badanie każdej surowicy w 4 kolejnych rozcieńczeniach. Zwiększa to jednak, i tak już dużą, pracochłonność wykonywania OWD, oraz powoduje zwiększone zużycie odczynników, a głównie dopełniacza najdroższego z komponentów używanych przy OWD, co znacznie podwyższa koszty badania.

W celu zmniejszenia zużycia odczynników, oraz uproszczenia techniki wykonywania odczynu, Królak (2) stosuje nastawianie odczynu wiązania dopełniacza w 1/5 dawki przy pomocy specjalnie skalibrowanej mikropipety.

Praca niniejsza ma na celu porównanie błędów eksperymentalnego przy nastawianiu odczynu wg modyfikacji podanej przez Królaka (2), z błędem powstającym przy nastawianiu OWD w ćwierć dawkach, zgodnie z obowiązującą instrukcją.

Materiał i metody

Przebadano 78 surowic o różnych mianach, z tym, że wszystkie surowice zostały dobrane w taki sposób, aby ich miana zawarte były w granicach nastawianych rutynowo 4 rozcieńczeń (od 1:25 do 1:200). Zostało to podyktowane możliwościami technicznymi mikropipety. Miana wyższe zmuszają do nastawienia odczynu metodą klasyczną.

Z każdą surowicą nastawiono odczyn wiązania dopełniacza metodą podawaną przez instrukcję (w ćwierć dawkach), oraz przy pomocy mikropipety.

Każdą surowicę nastawiono w trzech powtórzeniach.

Sposób wykonywania odczynu metodą zalecaną przez instrukcję ilustruje tab. 1, a technikę z użyciem mikropipety — tab. 2.

Tab.1. Technika nastawiania OWD w ćwierćdawkach

Kolejne próbówki	K	1	2	3	4
Surowica w odpowiednim rozc.	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Płyn fizjologiczny	0,25	—	—	—	—
Dopełniacz	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Antygen	—	0,25	0,25	0,25	0,25
Łaźnia 20 minut					
Krwinki uczulone	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

K — kontrola antykomplementarnych właściwości badanych surowic.

Tab. 2. Technika nastawiania OWD w 1/5 dawki

Kolejne próbówki	K	1	2	3	4
Surowica badana (na dno suchych próbówek)	0,04	0,04	0,02	0,01	0,005
Płyn fizjologiczny	0,36	0,16	0,18	0,19	0,195
Dopełniacz	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antygen	—	0,2	0,2	0,2	0,2
Łaźnia 20 minut					
Krwinki uczulone	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

K — kontrola antykomplementarnych właściwości badanych surowic.

Całość doświadczenia wykonano używając stale tych samych pipet sprawdzonych metodą wagową.

Z wyjątkiem surowicy, wszystkie komponenty rozlewane były przy użyciu Dyspensera (Unipan typ 313) o dokładności rozlań do 0,005 ml.

W metodzie klasycznej surowicę pobierano, a następnie rozcieńczano pipetą o pojemności 1 ml z podziałką co 0,01 ml.

Przy nastawianiu odczynu w 1/5 dawki używano specjalnie skalibrowanej mikropipety z odłożonymi kolejno w kierunku od góry do dołu pipety wartościami: 0,04, 0,04, 0,02, 0,01 i 0,005 ml.

Dawki surowicy przy użyciu mikropipety rozlewano na dno suchych próbówek.

Po rozlaniu każdej surowicy pipety przepłukiwano trzykrotnie roztworem fizjologicznym NaCl i osuszano bibułą.

Przed rozlewaniem następnej badanej surowicy pipetę przepłukiwano dodatkowo surowicą i dopiero ponownie nabrałą surowicę rozlewano do probówek.

W doświadczeniu stosowano surowice niekonserwowane.

Używane szkło laboratoryjne myto środkami opartymi na detergentach (Mirax), płukano bardzo dokładnie wodą bieżącą, a następnie destylowano i suszono w temp. ok. 120°C.

Wszystkie komponenty używane do odczynu przygotowywano zgodnie z obowiązującą instrukcją.

Wyniki odczytywano natychmiast po wyjęciu z łaźni, w momencie, gdy układ kontrolny odczynu odpowiadał wymaganiom warunkom, tzn., gdy surowica kontrolna ujemna, kontrola surowicy odniesienia, oraz pierwsza i druga probówka „kontroli antygenu” wykazują pełną hemolizę, trzecia probówka „kontroli antygenu” pełne zahamowanie hemolizy, a surowica odniesienia uzyskała prawidłowe miano. Następowo to średnio w 15–20 min. po dodaniu krwinek uczulonych do układu bakteriologicznego.

Przy odczytywaniu wyników posługiwano się pomocniczą skalą — standardem hemolitycznym sporządzonym wg Wiśniowskiego i Królaka (3), obejmującym obowiązujące wg instrukcji stopnie związania dopełniacza (—, +, ++, +++, +++++). Odczytu dokonywano okiem nieuzbrojonym przy świetle dziennym.

Różnice między stopniem związania dopełniacza uzyskanym przy pomocy obu metod nie przekraczały wartości jednego plusa, a więc nie rzutowały na zmianę oceny miana poszczególnych surowic. Obie metody dawały jednakowo dokładne wyniki, gdyż, jak wynika z tab. 3, wartości F_0 były znacznie niższe od wartości granicznej F dla 5% poziomu istotności.

Wnioski

1. Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że żadna ze stosowanych metod nie wpływa w istotny sposób na wartość miana uzyskiwanego w OWD. Również dokładność obydwu metod jest taka sama.

2. Wykonywanie OWD przy pomocy specjalnie skalibrowanej mikropipety obniża znacznie czas nastawiania OWD (średnio o 1/4), oraz obniża zużycie dopełniacza, a tym samym zmniejsza koszty wykonywania badań.

Tab. 3. Zestawienie wyników

Miano	Liczebność prób	Średnie miana ± odchylenie standardowe		F_0 $F_{0,05}$	t_0
		Pipeta 1 ml	Mikropipeta		
1/25	19	3,31±0,68	3,33±0,75	1,095<2,23	0,28*
1/50	20	6,71±1,17	6,78±1,29	1,092<2,16	0,54*
1/100	24	10,65±0,78	10,68±0,78	1,00<2,01	0,00*
1/200	16	13,38±0,32	13,36±0,28	1,136<2,41	0,50*

* wszystkie wartości t_0 są mniejsze od każdej wartości funkcji t mniejszej niż 0,5.

Uzyskane wyniki przeliczano na dane cyfrowe przy pomocy następującego klucza:

++++	4,0	++	2,0
++++(++)	3,6	++(+)	1,6
+++(++++)	3,3	+(++)	1,3
+++	3,0	+	1,0
+++(+++)	2,6	±	0,6
++(++++)	2,3	±	0,3

Wysokość mian uzyskanych obydwoi metodami dla poszczególnych grup surowic sprawdzono testem t Studenta, a dokładność obu technik testem istotności dla różnicy dwóch wariancji.

Wyniki

Badane surowice podzielono na 4 grupy (A, B, C, D) w zależności od miana uzyskanego przy pomocy metody zalecanej przez instrukcję. Do grupy A zaszeregowano 19 surowic o mianie 1:25, do grupy B — 20 surowic o mianie 1:50, do grupy C — 24 surowice o mianie 1:100, a do grupy D — 16 surowic o mianie 1:200.

Wyniki uzyskane przy pomocy obu metod wykazały daleko idącą zbieżność. Średnie miana uzyskane obydwoi metodami były identyczne lub bardzo zbliżone. Różnice pomiędzy mianami były nieistotne, nawet przy poziomie ufności równym 0,5 (wartości t_0 są mniejsze od $t_{0,5}$) (tab. 3).

Piśmiennictwo

1. Anczykowski F., Murat P.: Medycyna Węł. 22, 418, 1966.
2. Królak M.: Pol. Arch. wet. 13, 3, 1970.
3. Ministerstwo Rolnictwa Departament Wet.: Przepisy o zwalczaniu brucelozy zwierząt, PWRiL, 1968.
4. Wiśniowski J., Królak M.: Pol. Arch. wet. 9, 4, 1966.

Adres autora: lek. wet. Danuta Romanowska, Warszawa, ul. Mickiewicza 34/36 m. 8.

AUBAIDI J. M., FABRICANT J.: Właściwości i klasyfikacja mykoplazm izolowanych od bydła. (Characterization and classification of bovine mycoplasma). Cornell Vet., 41, 490–518, 1971 (3).

Autorzy oznaczyli właściwości biochemiczne, hodowlane i serologiczne 128 szczepów mykoplazm izolowanych od bydła z układu rozrodczego, mleka, płynu stawowego krwi i węzłów chłonnych. Na podstawie zdolności fermentowania glukozy, redukcji soli tetrazolu, dekarboksylacji argininy opracowano nową klasyfikację mykoplazm. Wśród badanych szczepów wyosobniono 13 serotypów. Opracowany podział mykoplazm oparto na zdolności fermentowania węglowodanów, pobudzaniu wzrostu przez dodatek surowicy do podłoża wzrostowego, hemolizowaniu krwinek barana wrażliwości na różną kwasowość środowiska, charakter wzrostu w obecności 0,02% błękitu metylenowego, redukcji błękitu metylenowego, wzrostu w temperaturze 25 i 42°, hamującego działania 3% stężenia soli kwasów żółciowych, wrażliwości na antybiotyki i chloroform. Nie stwierdzano reakcji krzyżowych pomiędzy wyizolowanymi szczepami mykoplazm i *M. mycoides* var. *mycoides*, *M. mycoides* var. *capri* i *M. agalactiae*.

Z.