

MARIA SŁUŻEWSKA, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Badania nad zastosowaniem próby aglutynacji płytowej do diagnostyki salmonelozы świń

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

W związku z rozwojem przemysłowej produkcji trzody chlewnej konieczne jest opracowywanie szybkich i prostych technicznie metod diagnostycznych, które mogą być masowo wykonywane w warunkach terenowych. Dzięki nim możliwe jest bowiem tworzenie zdrowych stad podstawowych oraz kontrola stanu zdrowotności pogłównia całej fermy. To zaś stanowi warunek opłacalności tego rodzaju produkcji zwierzęcej.

Mając powyższe na względzie wykonano doświadczenia, które zmierzały do zaadoptowania do diagnostyki salmonelozы świń próby aglutynacji płytowej — powszechnie stosowanej w diagnostyce serologicznej pulorozы drobiu. Wiadomo, iż głównym czynnikiem etiologicznym salmonelozы świń jest *S. choleraesuis* (2, 4, 5). Drobnoustroj ten tworzył zatem badane zawiesiny aglutynacyjne.

Celem obecnej pracy był dobór szczepu *S. choleraesuis*, odpowiedniego do produkcji antygeny aglutynacyjnego. W związku z tym wykonano doświadczenia nad zjadliwością dla świńek morskich oraz w podwiązanej pętli jelitowej świń — kilka szczepów wymienionego drobnoustroju. Z najbardziej chorobotwórczych spośród nich sporządzono zawiesiny aglutynacyjne do odczynu aglutynacji płytowej. Przy użyciu tej próby badano surowice królicze anti-*S. choleraesuis* jak też od świń zakażo-

nych eksperymentalnie *S. choleraesuis* oraz szczepionych przeciw salmonelozie szczepionką, zawierającą atenuowany szczep *S. choleraesuis*. Równolegle wykonywano badania, stosując próbę aglutynacji próbówkowej, która stanowiła test odniesienia.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto: *S. choleraesuis* var. kuzendorf nr 1236 oraz *S. yolo* nr 1237, otrzymane z Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Anglia, *S. thompson*, uzyskany z Ośrodka Salmonella Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku, *S. choleraesuis* nr 6 z Farm Livestock Research Centre Stock, Ingatston, Anglia, *S. choleraesuis* — Ivanovice z Bioveta Ivanovice w Czechosłowacji, *S. choleraesuis* nr 60, 90, 91 i 964 — szczepy izolowane z padłych świń z terenu kraju.

Zwierzęta doświadczalne. Chorobotwórczość szczepów badano na świnkach morskich obu płci wagi 250 g, pochodzących z Hodowli Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Weterynarii w Puławach. W celu uzyskania surowic odpornościowych anti-*Salmonella* użyto króliki o ciężarze ciała około 3 kg, rasy krajowej. Pochodziły one również z Hodowli Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Weterynarii. Zjadliwość szczepów w podwiązanej pętli jelitowej badano na 1 prosięciu 11-tygodniowym rasy wielka biała polska (WBP) wg metodyki podanej uprzednio (6). Takie same prosięta użyto do zakażenia szczepami *S. choleraesuis* oraz jako sztuki kontrolne, niezakażone. Świnie zakażano doustnie w dawce 15 ml zawiesiny szczepu *S. choleraesuis* 964 o gęstości 1, 5 lub 10 miliardów drobnoustrojów w 1 ml wg metody podanej uprzednio (3). Spośród świń zaszczypanych w warunkach tuczu prze-

Tab. 1. Właściwości chorobotwórcze dla świńek morskich *S. thompson* i kilku szczepów *S. choleraesuis*

Symbol szczepu	Liczba świńek	Gęstość szczepionki	Dawka	Drogi zakażenia	Dni po wprowadzeniu zarazki (liczba zwierząt padłych)																	
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>S. thompson</i>	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2			dotrzewnowo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. choleraesuis</i> 1236	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-		
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2			dotrzewnowo	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. choleraesuis</i> 964	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-		
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2			dotrzewnowo	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. choleraesuis</i> 6	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
	2			dotrzewnowo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i> 61	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2			dotrzewnowo	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i> 90	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2			dotrzewnowo	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i> 91	2	5 × 10 ⁷	1 ml	podskórnie	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2			domięśniowo	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2			dotrzewnowo	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrola	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Objaśnienia: *) = liczby wskazujące na upadki świńek morskich po określonej liczbie dni od momentu zakażenia.

mysłowego szczepionką przeciw salmonelozie, zawierającą szczep atenuowany *S. choleraesuis*, wybrano losowo po 14 dniach od szczepienia 20 sztuk, od których pobrano krew do badań przy pomocy aglutynacji płytowej. Jako antygen służył szczep *S. choleraesuis* nr 964 lub 1236.

Zawiesiny bakteryjne O i H do immunizacji królików. Zawiesiny dla antygeny Co uzyskano ze spluczyny 24-godzinnej hodowli na agarze zwykłym szczepów *S. choleraesuis* nr 964, 1236 a także *S. thompson*. Zawiesiny te trzymano w ciągu 2,5 godz. w temperaturze 112°C w autoklawie. Gęstość zawiesin ustalono na odpowiadającą 24-godzinnej hodowli na bulionie zwykłym *S. paratyphi* B. Do pierwszej iniekcji użyto gęstość równą 1/4 gęstości wspomnianej uprzednio hodowli bulionowej. Do każdej następnej iniekcji sporządzano gęstość podwójną w stosunku do poprzedniej. Króliki otrzymały w sumie po 9 iniekcji a 1 ml, co 5 dni. Zawiesinę H 1,5 stanowiła 24-godzinna hodowla bulionowa szczepu *S. choleraesuis* nr 1236, a zawiesinę Hc taka sama hodowla szczepu *S. yolo*. Po zakończeniu okresu inkubacji dodawano 0,6% formaliny. Króliki szczepiono co 5 dni 4-krotnie następującymi dawkami: 0,5, 2, 3 i 3 ml. Po 8 dniach od zakończenia szczepień wykonano próbę na obecność swoistych aglutynin w surowicy i w przypadku wykazania wystarczających mian skrwawiano króliki po 10 dniach od zakończenia uodparniania.

Antygeny barwione do próby aglutynacji płytowej. Do ich otrzymania użyto szczepu *S. choleraesuis* 964 lub 1236. Posłużono się techniką produkcji antygeny Pullognost (1). Szczepy wymienione hodowano na agarze zwykłym w butelkach Roux przez 48 godzin. Następnie splukiwano uzyskaną hodowlę płynem buforowym o pH 6,5 w ilości 20 ml na 1 butle Roux. Do 100 ml tego rodzaju spluczyny dodawano 200 ml alkoholu absolutnego. Po 72 godzinach osad odwirowywano i zawieszano w buforze o pH 6,5 z dodatkiem glicerolu w ilości 10% i 3%-owego alkoholowego roztworu fioletu krystalicznego w ilości 1%. Końcową gęstość ustalono tak, by wynosiła 2,5% komórek bakteryjnych.

Próby serologiczne. Aglutynację próbówką wykonano wg ogólnie przyjętych zasad, używając antygeny o gęstości odpowiadającej 2 próbówce skali Mc Farlanda. Aglutynację płytową przeprowadzono na płycie z plexiglasu, mieszając 1 kroplę surowicy z 1 kroplą barwionego antygeny. W teście aglutynacji płytowej za reakcję dodatnią uważano aglutynację gruboziarnistą, dobrze zaznaczoną, występującą w ciągu 15—30 sekund (++++) lub drobnoziarnistą, występującą z opóźnieniem 1—2 minut, ale po tym czasie już dobrze zaznaczoną (++++).

Wyniki i omówienie

Celem doświadczeń zawartych w tab. 1 było określenie chorobotwórczości dla świnek morskich szczepów *S. thompson* i *S. choleraesuis* nr 6, 90, 91, 964 i 1236.

Jak wynika z tab. 1 najmniej chorobotwórcze okazały się szczepy *S. thompson* i *S. choleraesuis* nr 6. W przypadku *S. thompson* padła tylko jedna świnka szczepiona dootrzewnowo, a w przypadku *S. choleraesuis* nr 6 — 1 świnka szczepiona dootrzewnowo i 1 świnka domięśniowo. Szczepy 61, 90, 91, 964 i 1236 wykazały zbliżone właściwości chorobotwórcze. Wszystkie nimi zakażone świnki morskie, niezależnie od drogi wprowadzenia zarazka, padły między 4—12 dniem od zakażenia.

Szczepy użyte w uprzednim doświadczeniu, a ponadto szczep atenuowany *S. choleraesuis*-Ivanovice badano na zdolność rozszerzania

podwiązanej pętli jelitowej prosięcia. W próbie tej pewną zdolność do rozszerzania podwiązanej pętli jelitowej wykazały szczepy *S. choleraesuis* 61, 90, 91, 964 i 1236. Szczep Ivanovice nie rozszerzał natomiast podwiązanej pętli jelitowej. Wyniki te były zatem analogiczne do uzyskanych na świnkach morskich. Wskazywały też na właściwości enteropatogenne niektórych szczepów *S. choleraesuis*.

W wyniku powyższych badań produkcję antygenów barwionych, używanych w próbie aglutynacji płytowej, oparto na szczepach *S. choleraesuis* nr 964 i 1236, które znajdowały się w fazie S i były najbardziej zjadliwe spośród wszystkich badanych.

Przy użyciu wymienionych antygenów określono poziom aglutynin anti-O i anti-H kilku surowic królików, uodparnianych *S. choleraesuis*. Chodziło o wykazanie jakie najniższe miana, wykazane za pomocą aglutynacji próbówkowej, są wykrywalne przy użyciu wymienionych antygenów w aglutynacji płytowej. Wyniki tych prób przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Wyniki badania surowic króliczych — anty *S. choleraesuis* za pomocą prób aglutynacji próbówkowej i płytowej

Symbol surowicy	Najwyższe miano w aglutynacji próbówkowej	Antygen barwiony ze szczepu <i>S. choleraesuis</i> 1236									
		Miano w aglutynacji próbówkowej *) surowicy rozcieńczonej oraz odpowiednie natężenie odczynu w aglutynacji płytowej **)									
		4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	płyn fizjolog.
anty-O 964	4096	##	##	##	##	##	+	-	-	-	-
anty-O 1236	4096	##	##	##	##	##	##	-	-	-	-
anty-H1,5 1236	1024			##	##	##	##	##	-	-	-
anty-Hc 1237	512				+	+	+	+	-	-	-
anty-O thompson	2048		##	##	##	+	-	-	-	-	-
anty-R Ivanovice	512				±	-	-	-	-	-	-
		Antygen barwiony ze szczepu <i>S. choleraesuis</i> 964									
anty-O 964	4096	##	##	##	##	##	+	-	-	-	-
anty-O 1236	4096	##	##	##	##	##	+	-	-	-	-
anty-H1,5 1236	1024			##	##	##	##	##	-	-	-
anty-Hc 1237	512				+	+	+	+	-	-	-
anty-O thompson	2048		##	##	##	+	-	-	-	-	-
anty-R Ivanovice	512				±	-	-	-	-	-	-

Jak wynika z tab. 2 we wszystkich surowicach badanych, z wyjątkiem anty-Hc 1237 i anty-R Ivanovice, stwierdzono silny odczyn w aglutynacji płytowej (++++) przy mianie 512, wykazanym w aglutynacji próbówkowej. Taki sam odczyn wystąpił dodatkowo w surowicy anty-H 1,5 1236 do miana aglutynacji próbówkowej 128. Z surowicą tą wykazano odczyn o natężeniu +++ w mianie 64, stwierdzonym przy pomocy aglutynacji próbówkowej. Wynik ten wystąpił zarówno przy użyciu antygeny barwionego, sporządzonego ze szczepu homologicznego (1236) jak też ze szczepu 964.

Celem kolejnych doświadczeń, których wyniki przedstawiono w tab. 3, było określenie mian w aglutynacji próbówkowej i dodatnich odczynów w aglutynacji płytowej u świń zakażonych doświadczalnie *S. choleraesuis*. W skład antygenów diagnostycznych do obu prób wchodził szczep *S. choleraesuis* 964. Użyto go też do zakażenia świń.

Tab. 3. Poziom przeciwciał dla antygeny somatycznego „O” w aglutynacji próbówkowej i płytowej w surowicach kilku prosiąt zakażonych różnymi dawkami zawiesiny szczepu *S. choleraesuis* 964

Nr prosięcia	Dawka zakażająca	Miano w aglutynacji próbówkowej przed zakażeniem	14 dni po zakażeniu		21 dni po zakażeniu		28 dni po zakażeniu	
			miano w aglutynacji próbówkowej	odczyn w aglutynacji płytowej (x)	miano w aglutynacji próbówkowej	odczyn w aglutynacji płytowej (xx)	miano w aglutynacji próbówkowej	odczyn w aglutynacji płytowej (xxx)
2	1 ml/ml	8 *	512	64 +	128	-	128	
3	1 ml/ml	16	256	64 +	256	-	128	
4	5 ml/ml	16	1024	64 ++	512	128 ++	256	128 +
5	5 ml/ml	8	512	64 ++	256	128 ++	256	128 ++
6	10 ml/ml	8	1024	64 ++	512	128 ++	256	128 ++
7	10 ml/ml	8	1024	64 ++	512	128 ++	256	128 ++

Objaśnienia: x = jako antygeny użyto zawiesiny szczepu *S. choleraesuis* 964; xx = odczyn w aglutynacji płytowej przy rozcieńczeniu surowic 2-7 do miana 64 w aglutynacji próbówkowej; xxx = odczyn w aglutynacji płytowej przy rozcieńczeniu surowic 2-7 do miana 128 w aglutynacji próbówkowej; xxxx = odczyn w aglutynacji płytowej przy rozcieńczeniu surowic 4-6 do miana 128 w aglutynacji próbówkowej.

Jak wynika z tab. 3 najwyższy poziom aglutynin wykazano po 14 dniach od zakażenia. Stwierdzono też, iż w próbie aglutynacji płytowej wykazuje się odczyn dodatni (++) do miana 64, określonego na podstawie próby aglutynacji próbówkowej. Po 21 i 28 dniach od zakażenia świń nastąpił spadek miana ich surowic z tym, iż w aglutynacji płytowej uzyskano odczyn dodatni przy mianie 128, ustalonym próbą aglutynacji próbówkowej. Z przedstawionych danych wynika, iż próba aglutynacji płytowej wykrywa zwierzęta, które posiadają przeciwciała anty-*S. choleraesuis* o mianach co najmniej 64, jeśli zakażenie miało miejsce przed 14 dniami. Jeżeli natomiast okres od zakażenia do badania wynosi 21 lub 28 dni dodatni wynik w aglutynacji płytowej (++) uzyskuje się przy mianie 128, wykazanym w aglutynacji próbówkowej. Aglutynacja płytowa może zatem stanowić test, w którym zostaną wykryte zwierzęta, wykazujące raczej wyższy poziom aglutynin. Są nimi osobniki o podostrym lub przewlekłym przebiegu choroby oraz latentnie zakażeni nosiciele i siewcy zarazka. Wydaje się zatem, iż jako próba orientacyjna do wykrywania salmonelozy w stadzie może być ona stosowana w okresowych badaniach świń.

Badania surowic świń, szczepionych szczepionką przeciw salmonelozie ze szczepem *S. choleraesuis*-Ivanovice, wykonane przy pomocy próby aglutynacji płytowej w 14 dni od szczepienia nie wykazały w żadnym przypadku dodatnich odczynów. Wyniki te wskazują zatem, iż próba aglutynacji płytowej wykrywa się jedynie świnię zakażoną *S. choleraesuis* a nie zwierzęta szczepione. Fakt ten przemawia na korzyść omawianej próby diagnostycznej.

Wnioski

1. Przy pomocy próby aglutynacji płytowej z antygenem *S. choleraesuis* wykrywa się świnię, u których stwierdza się na podstawie aglutynacji próbówkowej miano 128 lub wyższe.

2. Próba aglutynacji płytowej nie daje wyników dodatnich u świń szczepionych 14 dni od badania szczepionką przeciw salmonelozie ze szczepem atenuowanym *S. choleraesuis*-Ivanovice.

3. Aglutynacja płytowa może stanowić przydatny test do wykrywania świń zakażonych *S. choleraesuis* jako orientacyjna próba stadna.

Piśmiennictwo

1. Marek K., Truszczyński M., Służewska M., Różńska M.: *Medycyna Wet.* 24, 333, 1968.
2. Służewska M., Truszczyński M.: *Medycyna Wet.* 26, 455, 1970.
3. Służewska M., Truszczyński M.: *Pol. Arch. wet.* 16, 447, 1973.

4. Smith H. W., Halls S.: *J. Hyg. Camb.* 64, 357, 1966.

5. Smith H. W.: *J. Hyg. Camb.* 63, 117, 1965.

6. Truszczyński M., Pilaszek J.: *Res. vet. Sci.* 9, 539, 1968.

Adres autora: dr Maria Służewska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

Служевска М., Трущынський М. — Исследования по применению пластинчатой агглютинации для диагностики сальмонеллеза свиней.

Целью исследований был выбор штамма *S. choleraesuis* пригодного для продукции агглютинационного антигена для пластинчатой агглютинации на предметном стекле, применяемой для обнаружения антител *S. choleraesuis* в сыворотках крови свиней. Исследования провели при помощи сывороток крови свиней экспериментально инфицированных *S. choleraesuis*, а также вакцинированных против сальмонеллезу вакциной, содержащей аттенуированный штамм *S. choleraesuis*-Ivanovice. Сравнительным тестом была реакция пробирочной агглютинации. В результате проведенных исследований установили, что при помощи пластинчатой агглютинации с антигеном *S. choleraesuis* можно обнаружить свиней, у которых титр, определенный методом пробирочной агглютинации, равняется 1:128 и выше. Установили тоже что пластинчатая агглютинация не дает положительных результатов у свиней, вакцинированных 14 дней назад вакциной против сальмонеллеза аттенуированным штаммом *S. choleraesuis*-Ivanovice. Авторы приходят к выводу что пластинчатую агглютинацию можно применять в качестве ориентировочной реакции для установления заражения стада *S. choleraesuis*.

Służewska M., Truszczyński M. — Investigations on the use of the plate agglutination test for the diagnosis of salmonellosis in pigs.

The purpose of these investigations was to select a *S. choleraesuis* strain suitable for the production of antigen used in the plate agglutination test to detect *S. choleraesuis* antibodies in pigs. Sera of pigs infected experimentally with *S. choleraesuis* or injected with a vaccine containing attenuated *S. choleraesuis* strain were examined by the plate agglutination test. The same sera were tested also by the tube agglutination test, used as the reference test. It has been found that the plate agglutination test performed with *S. choleraesuis* antigen enabled to detect specific antibodies in pigs in which the tube agglutination test yielded a titre of 128 or higher. The plate agglutination test did not yield positive results in pigs for 14 days after injecting them with the vaccine containing the attenuated *S. choleraesuis* — Ivanovice strain. Finally, it has been stated that the plate agglutination test may be successfully used as the approximate herd test for the detection of *S. choleraesuis* infection in pigs.