

# PRAKTYKA LABORATORYJNA

TERESA KOCIK, BARBARA PORĘBSKA, MARIAN KRÓLAK

## Intensywność wzrostu standardowych szczepów leptospir na podłożach z surowicą króliczą, owczą i świńską

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

Przy namnażaniu i przechowywaniu leptospir powszechnie używane jest podłoże z dodatkiem surowicy króliczej. Ponieważ jest ono dość kosztowne, a ponadto nie wszystkie króliki dostarczają odpowiedniej surowicy (13, 19), wielu autorów podjęło w ostatnich latach badania nad opracowaniem nowego, bardziej doskonałego podłoża do hodowli leptospir. Prace te zmierzają w dwóch kierunkach: zastąpienia surowicy króliczej łatwiej dostępną surowicą innych zwierząt lub albuminą oraz opracowania podłoża syntetycznego.

Prace nad podłożami, w których surowicę króliczą zastąpiono surowicami innych zwierząt wykazały, że jedynie surowica owcza pozwala na pomyślne namnażanie i utrzymywanie leptospir (12, 13). Odnosnie stosowania surowicy bydłowej zdania są podzielone. Niektórzy autorzy z powodzeniem namnażali i przechowywali leptospiry na tym podłożu (5, 18). Natomiast inni uważają, że surowica bydła nie gwarantuje wzrostu wszystkich serotypów (13). W pożywkach z surowicami konia i cielęcia leptospiry zadowalająco namnażały się tylko w I pasażu, dalsze przesiewy na tych podłożach powodowały pogłębiający się spadek gęstości hodowli leptospir (13).

Na podłożach zawierających albuminę i Tween-80 uzyskiwano dobry wzrost i pomyślnie przechowywano leptospiry (2, 3, 4, 6, 9, 14, 19). Jednak zmienna wartość odżywcza albumin zmniejsza użyteczność tych podłoży do ogólnych badań (9).

Podłoża syntetyczne są ciągle w trakcie udoskonalania i wypróbowywania (10, 11, 15, 16, 17). Dotychczas nie opracowano żadnego syntetycznego podłoża, które zaspokajałoby wymagania odżywcze wszystkich szczepów leptospir (19). Ponadto leptospiry w chemicznych podłożach mogą tracić zdolność do syntezy antygenów w wyniku braku jakiegoś składnika do ich produkcji (1).

Obecnie w rutynowych badaniach diagnostycznych powszechnie stosuje się podłoża z surowicą króliczą, zapewniające zarówno obfity wzrost jak i pełną aktywność antygenową.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności surowicy świńskiej i owczej jako dodatku do podłoża dla hodowli leptospir.

### Materiał i metody

1. Szczepy. Doświadczenie wykonano z 13 standardowymi szczepami reprezentującymi 13 serotypów z kompleksu interrogans: RGA (*icterohaemorrhagiae*), Moskwa V (*grippotyphosa*), M 84 (*sejroe*), Perepelicin (*tarassovi*), Pomona (*pomona*), Hond Utrecht IV (*canicola*), Balico (*australis*), Hebdomadis (*hebdomadis*), Poi (*poi*), Zaroni (*zaroni*), 3522 C (*cynopteri*), Akiyami A (*autumnalis*), Van Tienen (*bataviae*). Dodatkowo włączono do badań saprofityczny szczep Patoc I (*patoc*) z kompleksu biflexa \*).

2. Podłoża. Z podłoża podstawowego Vervoorta w modyfikacji Wolffa przygotowano trzy warianty z dodatkiem 10% surowic: owczej, króliczej i świńskiej. Surowice pojedynczych zwierząt kontrolowano w aglutynacji mikroskopowej (AM) na obecność przeciwciał leptospirowych. Ujemne w AM surowice łącznie i przechowywano w stanie zamrożenia. Przed użyciem surowice rozmrażano, filtrowano przez sączki azbestowe EKS 2 i dodawano do sterylonego podłoża podstawowego.

Każdy wariant podłoża dzielono na dwie części: jedną część inaktywowano w łaźni wodnej w temp. 56°C przez 1,5 godz., drugą w temp. 68°C przez 1 godzinę.

3. Hodowla leptospir. Każdy z badanych szczepów pasażowano trzykrotnie w odstępach 7-dniowych na wszystkich wariantach podłoża. Inkubację przeprowadzano w termostacie w 28°C. Wielkość inokulum wynosiła 1/5 objętości podłoża, a gęstość około 4000 leptospir w polu widzenia przy powiększeniu 150×.

4. Określenia gęstości hodowli leptospir. Gęstość hodowli leptospir określano ilością leptospir w polu widzenia przy powiększeniu 150×. Przyjęto następujące kryteria oceny: hodowle o gęstości 3000-4000 leptospir w polu widzenia oznaczono symbolem ++++ = 100% wzrostu, 1000-2000 leptospir symbolem ++ = 50% wzrostu, 750-1000 leptospir w polu widzenia symbolem + = 25% wzrostu.

5. Surowice homologiczne. Surowice homologiczne przeciwko użytym w doświadczeniu serotypom leptospir przygotowano na królikach rasy mieszanej, obu płci, wagi około 3 kg. Króliki szczepiono dożylnie żywą hodowlą leptospir. Iniekcje przeprowadzano w odstępach trzydniowych, stosując następujące dawki antygeny: 0,2, 0,5, 0,9, 1,5, 2,0 ml. Króliki skrwawiano w tydzień po ostatniej dawce antygeny. Uzyskane surowice filtrowano, określano wysokość miana i liofilizowano.

6. Aglutynacja mikroskopowa. Test AM przeprowadzano według sposobu podanego w obowiązującej instrukcji (8).

\* W nawiasach podano nazwy serotypów. Szczepy otrzymano z Pracowni Leptospiroz ZHW Wrocław.

Wyniki i omówienie

Z uwagi na wysoką czułość i swoistość, aglutynacja mikroskopowa (AM) jest jak dotąd podstawową metodą diagnostyki serologicznej leptospiroz. Jednakże szereg parametrów dotyczących właściwości antygeny, takich jak gęstość i wiek hodowli, rodzaj podłoża użytego do namnażania leptospir jest ustalanych w sposób dowolny przez poszczególne pracownie, w związku z tym interpretacja i porównywanie wyników może budzić zastrzeżenia.

Tab. 1. Wpływ gęstości hodowli leptospir użytych jako antygen w AM na wysokość miana surowic homologicznych

Antygen	Gęstość antygenu	Rozcieńczenia surowicy										
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25000	1/50000	1/100000
RGA	wyjściowa *	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	0
	+++	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
	++	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	0
	+	0	0	0	50	100	100	100	100	100	100	0
Pomona	wyjściowa *	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	+++	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	25	100	100	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	25	100	100	0	0	0	0	0

Objaśnienia: \*) = wyjściowa gęstość antygenu — 6000 leptospir w p.w. przy pow. 150×; ++++ = gęstość antygenu — 3000—4000 leptospiroz w p.w. przy pow. 150×; ++ = gęstość antygenu — 1000—2000 leptospiroz w p.w. przy pow. 150×; + = gęstość antygenu — 750—1000 leptospir w p.w. przy pow. 150×; \*\*) = procent zaglutynowanych leptospir.

Zalecana przez grupę ekspertów WHO (20) gęstość antygenu do AM wynosi 100 mln/ml. Galton i wsp. (cyt. za 1), używają antygen o gęstości 175—225 mln/ml. Babudieri (1) uważa, że obie cytowane gęstości są zbyt wysokie i sugeruje stosowanie hodowli o gęstości 10 mln/ml. Nicolescu i Borsai (13) w pracy nad przygotowaniem wydajnego podłoża do produkcji antygenu leptospirowego przyjmowali jako zadowalającą gęstość 800—1000 leptospir w p.w. przy pow. 150×. Według Guščina (7) w

aglutynacji mikroskopowej używać należy kultury 5—10 dniowej o gęstości nie mniejszej niż 40 ruchliwych leptospir w polu widzenia przy pow. 300×. Zwierz (21) zaleca stosować jako antygen hodowlę zawierającą 50—100 leptospir w p.w. przy pow. 150×.

Ponieważ powyżej cytowane opinie na temat najbardziej odpowiedniej gęstości antygeny do AM są rozbieżne, postanowiono w badaniach wstępnych prześledzić zależność między gęstością hodowli leptospir użytej jako antygen w AM, a wysokością miana surowicy dodatniej. Wykazano, że przy użyciu bardzo gęstych antygenów możliwe jest uzyskanie miana nieznacznie zaniżonego (szczep RGA), natomiast bardzo rozcieńczone antygeny dają miano nieco wyższe (szczep Pomona). W niskich rozcieńczeniach badanych surowic antygeny o gęstości < 3000 leptospir w p.w. dawały strefę zahamowania aglutynacji tym rozleglejszą, im antygen zawierał mniej leptospir (tab. 1). W związku z tym przyjęto za przydatne jako antygeny w AM takie hodowle, których gęstość wynosiła co najmniej 3000—4000 leptospir w p.w. przy pow. 150× (wzrost 100%).

Sprawa gęstości antygenu wiąże się z doborem podłoża zapewniającego obfite namnażanie leptospir. Najlepszym z dotychczas opisanych wydaje się być podłoże z surowicą króliczą. Zdarzają się jednak surowice królicze nie nadające się do kultuwacji leptospir. Niektóre z nich zawierają związki natury lipidowej, nie dające się usunąć przez filtrowanie i uniemożliwiające rozwój leptospir (13). Z tego powodu Galton i wsp. (cyt. za 19) zalecają posługiwać się pulą surowic przynajmniej ze 100 królików, gdyż w ten sposób uzyskuje się rozcieńczenie odpowiedniej surowicy.

Tab. 2. Porównanie intensywności wzrostu leptospir na podłożach z dodatkiem surowic: króliczej, owczej i świńskiej

Szczep	Surowica																		
	królicza			owcza						świńska									
	temperatura inaktywacji																		
	55°C			68°C			56°C			68°C			56°C			68°C			
	pasaż																		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III				
Patoc I	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	7	21	>100	56	97	28	0	0	88	6	0	
RGA	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	74	52	>100	73	83	>100	24	0	>100	79	9	
Moskva V	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	93	37	>100	>100	91	>100	15	0	>100	>100	21	
M 84	>100	>100	>100	>100	>100	>100	90	46	9	>100	64	30	10	0	0	74	26	0	
Perepelicin	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	75	65	>100	88	17	44	5	0	54	11	24	
Pomona	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	80	64	37	0	0	36	0	0	
Hond Utrecht IV	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	30	0	>100	62	0	
Balico	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	70	9	>100	85	14	
Hebdomadis	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	75	>100	>100	24	>100	54	0	>100	72	7	
Poi	>100	>100	>100	>100	>100	>100	81	11	33	>100	55	2	82	65	24	>100	23	0	
Zanoni	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	98	>100	>100	19	0	>100	76	2	
3522 C	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	97	68	>100	>100	87	35	0	0	83	6	0
Akiyami A	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	99	>100	>100	0	0	>100	43	7	
Van Tienen	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	79	>100	>100	>100	88	24	1	>100	46	2	

Objaśnienie: \*) = gęstość hodowli określono w procentach, za 100% przyjęto 4000 bakterii w p.w. przy pow. 150×.

W naszym laboratorium także zaobserwowano pewne różnice w intensywności wzrostu leptospir na podłożach z dodatkiem surowic króliczych uzyskanych od pojedynczych osobników. Jako zasadę przyjęto więc łączenie surowic od wielu królików, tworząc zapas wystarczający na okres 6—12 miesięcy.

Porównanie intensywności wzrostu leptospir na podłożach inaktywowanych w temp. 56°C i 68°C, przygotowanych z użyciem surowicy świńskiej, owczej i króliczej pozwoliło ocenić przydatność tych surowic do kultywacji leptospir. Podłoże z surowicą króliczą, stanowiące układ odniesienia zapewniło wzrost wszystkich szczepów (gęstość > 100%) w trzech kolejnych pasażach, niezależnie od temperatury inaktywacji (tab. 2).

Na podłożu z surowicą owczą, inaktywowanym w temp. 56°C, pomyślnie kultywowano przez trzy pasaży 5 spośród 14 badanych szczepów leptospir (wzrost > 100%). W przypadku pozostałych 9 szczepów zauważono ograniczenie intensywności wzrostu w miarę ich pasażowania. Na tym samym podłożu, ale inaktywowanym w temp. 68°C, w pierwszym pasażu wszystkie szczepy leptospir namnażały się optymalnie, lecz w następnych pasażach nastąpiło ograniczenie intensywności wzrostu większości szczepów (tab. 2). Jakkolwiek podłoże z surowicą owczą inaktywowane w temp. 68°C zalecane jest przez Nicolescu i Borsai (13) jako szczególnie korzystne dla wzrostu i utrzymywania szczepów leptospir, to jednak powyższe dane wskazują, że może mieć ono ograniczone zastosowanie. Podobnie Todorova (18) uważa, że podłoże z surowicą owczą może znaleźć ewentualnie zastosowanie do jednorazowego namnażania dużej ilości leptospir np. przy produkcji szczepionek, czy przygotowywania wyciągów z leptospir.

Podłoże z surowicą świńską okazało się zupełnie nieprzydatne, gdyż już w I pasażu stwierdzono ograniczenie wzrostu wielu szczepów, a w pasażu III praktycznie wzrost leptospir został całkowicie zredukowany (tab. 2). Uzyskane wyniki potwierdzają spostrzeżenia Ryu (cyt. za 18), który uznał surowicę świńską za nieodpowiednią do hodowli leptospir.

Intensywność wzrostu Patoc I (saprofityczny), hodowanego na powyższych podłożach nie odbiegała zasadniczo od wzrostu szczepów reprezentujących kompleks interrogans.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że jako dodatek do podłoża namnażających i utrzymujących leptospiry najbardziej stosowna jest surowica królicza. Surowice królicze zawierają zwykle mniej aglutynin leptospirycznych niż surowice innych zwierząt, ponadto posiadają one najwyższe stężenie związanej witaminy B<sub>12</sub>, niezbędnej do namnażania leptospir. Mają również większą zdolność neutralizowania czynników hamujących, wprowadzanych z inokulum albo produkowanych w czasie wzrostu hodowli leptospir (19).

## Wnioski

1. Jako antygen w AM najbardziej przydatna okazała się hodowla leptospir o gęstości 3—4 tys. bakterii w polu widzenia przy powiększeniu 150 ×.

2. Najbardziej korzystne do hodowli leptospir okazało się podłoże z dodatkiem surowicy króliczej, niezależnie od temperatury inaktywacji. W kolejnych pasażach gęstość kultury utrzymywała się na tym samym poziomie.

3. Na podłożu z surowicą owczą, inaktywowanym w temp. 56°C i 68°C dobry wzrost wszystkich szczepów wystąpił tylko w I pasażu; w następnych pasażach zaobserwowano stopniowe zmniejszenie wzrostu większości badanych szczepów.

4. Podłoże z surowicą świńską, inaktywowane w 56°C i 68°C, okazało się nieprzydatne do hodowli leptospir, ponieważ już w I pasażu wystąpiło ograniczenie wzrostu niektórych szczepów, a w pasażach następnych wzrost większości szczepów uległ całkowitemu zahamowaniu.

## Piśmiennictwo

1. Babudieri B.: Bull. Wild Hlth Org. 44, 795, 1971.
2. Elinghausen H. C.: J. med. Microbiol. 6, 487, 1973.
3. Elinghausen H. C.: Ann. Microbiol. 124 B, 477, 1973.
4. Elinghausen H. C., McCullough W. G.: Am. J. vet. Res. 26, 39, 1965.
5. Finn M. A., Jenkin H. M.: Am. J. vet. Res. 34, 669, 1973.
6. Finn M. A., Jones R. H.: Appl. environ. Microbiol. 31, 134, 1976.
7. Guščin W. N.: Veterinarija, Moskwa 12, 106, 1973.
8. Instrukcja Nr 35 Ministerstwa Rolnictwa — Departamentu Weterynarii z dnia 25 maja 1974 r. w sprawie laboratoryjnego rozpoznawania leptospirozy u zwierząt.
9. Johnson R. C., Walby J., Henry R. A., Auran N. E.: Appl. Microbiol. 26, 118, 1973.
10. Kadis S., Pugh W. L.: Infect. Immunity 10, 793, 1974.
11. Kida H., Yanagawa R.: Jap. J. vet. Res. 18, 1, 1970.
12. Miller R. E., Miller N. G., White R. J.: J. Bact. 92, 502, 1966.
13. Nicolescu M., Borsai L.: Microbiologia Parazit. Epidem. 18, 365, 1973.
14. Schubert J. H., Sulzer C. R.: Hlth Lab. Sci. 10, 96, 1973.
15. Shenberg E.: J. Bact. 93, 1593, 1967.
16. Shenberg E., Torten M.: J. infect. Dis. 128, 642, 1973.
17. Staneck J. L., Henneberry R. C., Cox C. D.: Infect. Immunity 7, 886, 1973.
18. Todorova R.: VetMed. Nauki, Sof. 9, 65, 1972.
19. Turner L. H.: Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 64, 623, 1970.
20. WHO Expert Group: Bull. Wild Hlth Org. 32, 831, 1965.
21. Zwierz J.: Leptospirozy. PZWL 1964.

Adres autora: mgr Teresa Kocik, ul. Gdyńska 5E/1, 80-340 Gdańsk.

Кочик Т., Порембска В., Круляк М. — Интенсивность роста стандартных штаммов лептоспир на питательных средах с сывороткой кроликов, овец и свиней.

В настоящей работе сравнили рост 14 штаммов лептоспир на питательной среде Форфурта, модифицированной Вольффом, с прибавлением 10% сыворотки кроликов, овец и свиней, инактивированной в темп. 56°C и 68°C. Показали, что среда с сывороткой кроликов, независимо от температуры инактивирования, является наиболее подходящей для размножения и выращивания культур лептоспир. Среда с сывороткой свиней в обеих температурах инактивирования оказалась непригодной для разведения лептоспир. Понижение густоты культур обнаружили уже в 1 пассаже, в последующих пассажах рост большинства штаммов затормозился полностью. Немного лучшей оказалась среда с сывороткой овец, на которой получили хороший рост лептоспир в 1 пассаже. В после-

дующих пассажах отмечилось постепенное понижение интенсивности роста большинства штаммов. Эта среда может быть использована для разового размножения большого количества лептоспир. Кроме того показали, что наиболее пригодной в качестве антигена в АМ является культура с густотой 3000—4000 лептоспир в поле зрения при увеличении в 150 раз. При меньшей густоте антигена обнаружили зону заторможения агглютинации в более низких разведениях положительных сывороток.

Kocik T., Porębska B., Królak M. — **The rate of an increase of standard Leptospira strains on the media with rabbit, sheep or pig serum.**

Fourteen Leptospira strains were compared on Ver-voot's medium modified acc. to Wolff with the addition of 10% of rabbit, sheep or pig serum, inactiva-

ted at 56°C and 68°C. It was found that the medium with a rabbit serum, independently on temperature of inactivation, was most suitable for the propagation and storage of Leptospira cultures. The medium with a pig serum proved to be unsuitable. A decrease of the culture density was observed in the first passage and in the later passages most strains stopped to multiply at all. A little better results were obtained with the medium enriched with a sheep serum, in which a good growth was noticed in the first passage. In the next ones the number of bacterial cells decreased steadily. This medium might be used once for the propagation of a great number of bacterial cells. In addition, it was found that the most appropriate antigen was a culture of the density ranging from 3000—4000 cells seen under a microscope at the multiplication of 150x. In case of lower density of the antigen a zone of inhibition was found at lower dilutions of positive antisera.

JANUSZ WIERCINSKI

## Przygotowywanie prób a precyzja i dokładność w płomieniowej metodzie ASA.

### II. Oznaczanie Ca i Mg w surowicy krwi

Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

O dokładności pomiarów przy oznaczeniach Ca i Mg w surowicy krwi płomieniową metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej decydują inne czynniki, niż to ma miejsce przy określaniu zawartości Cu, Zn i Fe (21). Stosunkowo wysokie rozcieńczenie surowicy, wymagane przy analizie pierwiastków ziem alkalicznych, eliminuje wpływ jej właściwości fizycznych na wydajność rozpylenia. Odchylenie się wyników od wartości rzeczywistej jest głównie rezultatem interferencji składników chemicznych i zależy od sposobu przygotowawczego, jakiemu — przed zasadniczym pomiarem — są poddawane próby surowicy (9, 15, 16, 17, 22).

Precyzja pomiarów stężeń obu tych pierwiastków w surowicy jest wysoka i związana z dużą czułością oznaczeń Ca i Mg metodą ASA. Pogorszenie precyzji może mieć jednak miejsce w oznaczeniach, w następstwie czynności przygotowawczych, charakteryzujących się większym stopniem komplikacji.

Na zmianę wielkości sygnału absorpcyjnego Ca i Mg wpływają głównie czynniki chemiczne, przy czym w zdecydowanie większym stopniu dotyczy to wapnia. Duży wpływ na wartość absorpcji wywierają fosforany, mniejszy przejawiają — białko, siarczany, szczawiany, sód i potas (11, 12, 13, 15, 20, 22, 24).

Wpływ tych składników maleje wraz ze wzrostem temperatury stosowanego płomienia (7).

Działanie czynników interferujących można eliminować na drodze:

— dodania innych elementów obniżających wpływ przeszkadzającego składnika (5, 11, 13, 20, 22, 23, 24),

— usunięcia interferującego czynnika (18, 19),

— użycia standardów podobnych składem do oznaczonej próby (8, 24).

Interferencję wywieraną przez fosforany — obserwowaną głównie przy oznaczeniach Ca i manifestującą się obniżaniem sygnału absorpcyjnego — można wykluczyć przez dodanie innego kationu albo związku silniej kompleksującego z fosforanem lub oznaczanym pierwiastkiem. Stąd w różnych laboratoriach wykorzystuje się o takich właściwościach związki La, Sr, EDTA, glicerol, itp. (7, 13, 15, 18, 19, 22, 24). Dodatki te eliminują również wpływ siarczanów, szczawianów oraz białka (12, 15, 22). Samo białko można usunąć na drodze wytrącania z TCA (18, 19, 22).

Przy oznaczeniach Mg w płomieniu acetylen-powietrze nie spotyka się żadnych interferencji ze strony sodu, potasu i wapnia (4, 8, 17). Fosforany tylko w niewielkim stopniu obniżają sygnał absorpcyjny Mg, a zjawisko to eliminowane jest dodatkiem soli La, Sr lub EDTA (13, 15). Wzmocnienie sygnału Mg spowodowane obecnością białka obserwuje się, gdy surowicę rozcieńcza się jedynie wodą. Podobnie jak w przypadku fosforanów, domiesz-