

MARIA MICHAŁKIEWICZ, KAZIMIERZ ROSŁANOWSKI, TADEUSZ ŁOSIŃSKI, IRENA SZPRYNGIEL

Sporządzanie swoistych konjugat fluorescencyjnych i ich wartość w diagnostyce różniczkowej drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter*

Z Zakładu Profilaktyki Niepłodności Instytutu Weterynarii Oddział w Poznaniu

Odczyn immunofluorescencji (IF) polegający na reakcji znakowanych przeciwciał ze swoistym antygenem wykorzystany został również do wykrywania drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* (*Vibrio*) w rozmazach z wypłuczyn z napletka buhajów oraz do identyfikacji przecinkowców po uzyskaniu wzroście na podłożach sztucznych. Autorami pierwszych prac z tego zakresu byli Herschler (4), O'Bery (7) oraz Mellick i wsp. (6). W toku dalszych badań poszczególni autorzy w celu zmniejszenia niespecyficznego fluorescencji wprowadzili pewne modyfikacje w stosowanej do tego czasu metodzie. Zmiany te dotyczyły sposobu frakcjonowania gamma globulin (7), znakowania konjugaty (11), a także jej oczyszczania (8). Badacze ci stwierdzili, że krzyżowe reakcje dodatnie zachodzą pomiędzy swoistą surowicą znakowaną *Campylobacter fetus* a antygenami bakterii *Campylobacter fetus subsp. fetus* oraz *Campylobacter fetus subsp. intestinalis*, natomiast brak jest reakcji z antygenami *Campylobacter sputorum subsp. bubulus*.

Rutynowym wykrywaniem drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* w wypłuczynach z napletka buhajów oraz w śluzie pochwowym, materiale z biopsji u krów i owiec, przy pomocy fluoryzujących przeciwciał z równoczesnym wykorzystaniem metod hodowlanych, zajmowało się szereg autorów (5, 7, 9, 12, 13, 15).

Celem naszej pracy było zbadanie możliwości sporządzania dla potrzeb usługowo-badawczych z wzorcowych i terenowych szczepów *Campylobacter* konjugat fluorescencyjnych, ponadto ocena ich wartości diagnostycznej przy porównaniu uzyskanych wyników metodą immunofluorescencyjną z wynikami badań metodą hodowlaną.

Materiał i metody

Do sporządzania konjugat użyto wzorcowy szczep *Campylobacter fetus subsp. fetus* 5992 otrzymany z Czechosłowackiej Kolekcji Drobnoustrojów w Brnie oraz szczepy terenowe: *Campylobacter fetus subsp. fetus* 21 wyizolowany z wypłuczyn worka napletkowego buhaja, *Campylobacter fetus subsp. intestinalis* K wyizolowany z poronionego płodu owcy oraz 2 szczepy *Campylobacter sputorum subsp. bubulus* 880 i 861 wyizolowane z wypłuczyn z napletka buhajów. Szczepy te zostały sprawdzone przy pomocy testów biochemicznych wg Bergey'a (3).

Uodpornianie królików: swoiste surowice o odpowiednim mianie uzyskiwano przez uodpornianie królików. Podawano im dożylnie (żyła brzeżna ucha) wzrastające dawki zawiesiny bakterii w 0,85% roztworze NaCl z dodatkiem 0,03% formaliny. Zawiesziną stanowiła spłuczyna 3-dniowej, czystej hodowli danego szczepu na agarze z krwią, a gęstość zawiesiny odpowiadała 9×10^8 bakterii w 1 ml. Króliki szczepiono w odstępach 3-dniowych aż do uzyskania miana 1:5120. Po 5 dniach od ostatniego szczepienia skrwawiano króliki, a specyficzność surowic sprawdzano metodą absorpcji.

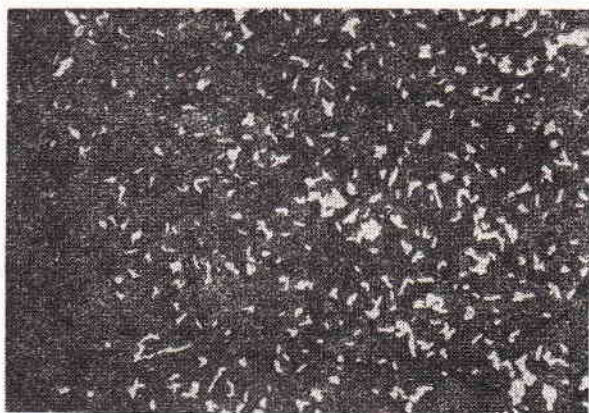
Znakowanie surowic: wysalanie odpowiedniej frakcji globulinowej w uzyskanych surowicach odpornościowych przeprowadzono wg Mellicka i wsp. (6) i Philippota (8) przy pomocy równej objętości 40% siarczanu amonu w ciągu 30 min. w łaźni lodowej na mieszalniku magnetycznym. Surowice po przetrzymaniu w temp. 4°C odwirowywano następnego dnia przez 30 min. przy 3000 obr./min., przemywano półnasyconym roztworem siarczanu amonu i ponownie wirowano. Otrzymany osad rozpuszczano w 0,15 M buforowym roztworze NaCl (ilość PBS stanowiła 1/3 wyjściowej objętości surowicy) i dializowano celem usunięcia soli amonowych, wobec tego samego buforu w temperaturze 4°C przez okres około 3 dni. W tak przygotowanym roztworze oznaczano stężenie białka i w razie potrzeby rozcieńczano PBS-em do koncentracji około 20 mg/ml. Roztwór białka zobojętniano 0,5 M buforem węglanowym o pH 9 i następnie dodawano stale mieszając na łaźni lodowej kroplami izotiocjanian fluoresceiny rozpuszczonej w niewielkiej ilości świeżo przygotowanego 2% NaHCO₃. Izotiocjanian fluoresceiny dodawano w ilości 0,035 mg na 1 mg białka. Mieszanie kontynuowano przez dalsze 30 min. stale w temp. 4°C. Celem usunięcia nadmiaru barwnika, roztwór sączono na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25 fine o słupie żelu długości 180 mm i średnicy 13 mm. Znakowany odczynnik wypłukiwano buforowym roztworem NaCl nadal w temp. 4°C. Zebraną, znakowaną globulinę po dodaniu mertiolatu do końcowego stężenia 1:10 000 rozlewano po 0,25 ml i przechowywano w temp. -15°C. W sporządzonych konjugatach stężenie barwnika wyrażone w mikrogramach, wynosiło około 5,0. Trwałość przechowywanej w ww. temperaturze konjugaty sięga co najmniej 12 miesięcy.

Przygotowanie i barwienie preparatów: badanie nieznanego antygenu przeprowadzono metodą bezpośrednią. Materiał przeznaczony do badań traktowano w zależności od jego rodzaju (wypłuczyny, śluz, materiał z biopsji, hodowla płynna) zgodnie z zaleceniami metodycznymi: wirowaniem, płukaniem, rozcieńczeniem (6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15). Utrwalony, materiał, nałożony w postaci rozmazu lub kropli na szkiełko przedmiotowe o grubości do 1 mm, pokrywane 1-2 kroplami swoistej znakowanej surowicy, rozcieńczonej PBS-em w stosunku 1:2. Preparaty przetrzymywano w komorze wilgotnej w temp. 37°C przez 25 minut, płukano kolejno po 5 minut w 3 zmianach PBS-u i suszono w temperaturze pokojowej. Na wysuszony preparat nakładano kroplę buforowego roz-

tworu glicerolu, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i oglądano w mikroskopie luminiscencyjnym „Zetopan-Reichert” (kondensator ciemnego pola, lampa Hg, HBO 200, filtry wzbudzające i odcinające FITC-3, OG-515). Widoczne w polu widzenia jasne, żółto-zielone świecące twory (przecinki, spirale, waliki) na czarnym lub czarno-zielonym tle świadczyły o obecności mętwików w badanym materiale.

Wyniki i omówienie

Konjugaty anty-Campylobacter fetus sporządzone zarówno w oparciu o wzorcowy szczep czeski 5992, jak i własne szczepy terenowe 21 i K, dawały świecące kompleksy antygen-przeciwciała z antygenami Campylobacter fetus subsp. fetus (ryc. 1.) i Campylobacter fetus



Ryc. 1. Campylobacter fetus w mikroskopowym obrazie IF (pow. 630x)

subsp. intestinalis o nieco zróżnicowanej intensywności. Konjugaty anty-Campylobacter sputorum subsp. bubulus sporządzone z własnych szczepów terenowych 880 i 861 nie dawały świecenia z żadnym z użytych szczepów gatunku Campylobacter fetus. Szczegółowe wyniki krzyżowego testowania surowic immunofluorescencyjnych w obrębie rodzaju Campylobacter zebrano w tab. 1. Konjugata 880 dawała reakcję fluorescencyjną z antygenem 5888, natomiast konjugata 861, choć skierowana również przeciwko szczepowi o potwierdzonej biochemicznie przynależności do podgatunku Campylobacter sputorum subsp. bubulus, reakcji tej nie wykazywała. Być może było to wynikiem

obecności innego antygeny ciepłochwiejnego u tego szczepu (2). Nie wykluczona jest również

Tab. 1. Krzyżowe testowanie surowic immunofluorescencyjnych dotyczące drobnoustrojów z rodzaju Campylobacter

Szczepy rodzaju Campylobacter	Konjugaty				
	5992	21	K	880	861
fetus subsp.* fetus - 5992	##	+	+	-	-
fetus subsp.* intermedius - 5993	+	+	##	-	-
fetus subsp.* intestinalis - 5882	+	##	##	-	-
sputorum subsp.* bubulus - 5888	-	-	-	##	-
fetus subsp.** fetus - 21	+	##	##	-	-
fetus subsp.** intestinalis - K	+	+	##	-	-
sputorum subsp.** bubulus - 880	-	-	-	##	-
sputorum subsp.** bubulus - 861	-	-	-	+	##

Objaśnienia: * = szczep z kolekcji Drobnoustrojów w Brnie CSRS; ** = szczep terenowy.

możliwość istnienia wśród szczepów tego podgatunku terenowych wariantów o niecałkowitym zdeterminowaniu ich kompleksowej swoistości antygenowej, na co wydają się wskazywać określone obserwacje szeregu krajowych laboratoriów rozpoznawczych.

Wszystkie konjugaty nie dawały świecenia z bakteriami z rodzaju Proteus, Pseudomonas, Diplococcus czy Micrococcus. Obecne w niektórych preparatach świecące żółto-zielone, drobne twory w postaci bryłek i strzępków nie stanowiły przeszkód interpretacyjnych. Taul i Kleckner (11) potwierdzają wcześniejsze dane o krzyżowym barwieniu konjugata Campylobacter fetus, bakterii Staphylococcus aureus, wskazując jednak, że formy morfologiczne tych drobnoustrojów są łatwe do odróżnienia nawet od kokoidowych form Campylobacter.

W tab. 2 przedstawiono porównawcze zestawienie wyników wykrywania drobnoustrojów z rodzaju Campylobacter w różnych materiałach biologicznych przy pomocy metod hodowli oraz IF. W 71 próbach pobranych z inkubowanych przez 3 dni pożywek Bartletta, na które uprzednio posiano odwirowane i przesączone wypluczyny z napletka buhajów, uzyskano zgodność wyniku metody hodowlanej z metodą IF we wszystkich przypadkach. Należy jednak

Tab. 2. Gatunkowa analiza różniczkowa rodzaju Campylobacter na tle wyników badań hodowlanych i metodą IF

Rodzaj materiału o stwierdzonej obecności drobnoustrojów rodzaju Campylobacter	Ilość prób badanych	Ilość wyników dodatnich								
		metoda hodowli						metoda IF		
		C. fetus subsp. fetus	C. fetus subsp. intestinalis	Razem	C. sputorum subsp. bubulus	Razem Campylobacter	C. fetus	C. sputorum subsp. bubulus	Razem Campylobacter	
Hodowle pierwotne z wypluczyn z napletka lub znastenia buhajów	71	21	-	21	50	71	21	50	71	
Szczepy liofilizowane wyhodowane z wypluczyn z napletka buhajów	31	26	-	26	-	26	31	-	31	
Wypluczyny z napletka buhajów	7	5	-	5	-	5	3	-	3	
Materiał z biopsji macicy u jałówek	12	3	-	3	-	3	11	1	12	
Śluz pochwy jałówek	3	nie badano						3	-	3

podkreślić, iż metoda hodowlana z zastosowaniem testów biochemicznych wg Bergey'a pozwala na szczegółowe zaszeregowanie wyizolowanych szczepów do odpowiednich gatunków i podgatunków, natomiast przy pomocy metody IF można jedynie stwierdzić lub wykluczyć przynależność tych szczepów do gatunku *Campylobacter fetus*. Zaletą metody IF jest jednak możliwość otrzymania wyniku w ciągu kilku godzin, podczas gdy określenie biotypu szczepu z rodzaju *Campylobacter* trwa około 10 dni. Uwzględniając praktyczny cel badań rutynowych w tym kierunku, zmierzający do wykrycia szczepów patogennych rodzaju *Campylobacter*, stwierdzić należy, że metoda IF w korelacji z hodowlą pozwala na szybkie rozgraniczenie szczepów gatunku *Campylobacter fetus* od gatunku *Campylobacter sputorum*, co praktycznie pozwala na obiektywną wypowiedź diagnostyczną w stosunku do większości prób podejrzanych o obecność patogennych drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter*.

Przy badaniu 31 liofilizowanych szczepów *Campylobacter* uzyskano w obu metodach zgodność wyników w 26 przypadkach. Metodą IF stwierdzono dodatkowo obecność drobnoustrojów *Campylobacter* również w pozostałych 5 próbach, które poddane badaniu metodą hodowlaną nie wykazały wzrostu tych bakterii. Wyniki te dowodzą, że metoda IF pozwala wykryć w badanym materiale bakterie z rodzaju *Campylobacter* nawet w tych przypadkach, gdy uległy one obumarciu, zachowując swoje cechy antygenowe i morfologiczne.

Stwierdzenie metodą IF drobnoustrojów *Campylobacter* bezpośrednio w wypluczynach z worka napletkowego buhajów, mimo trudności technicznych spowodowanych brakiem odpowiednich, metodycznie zalecanych urządzeń oraz wykrycie tych bakterii w śluzie pochwo- wym i w materiale z biopsji szyjki macicznej, dowodzi praktycznej przydatności tej metody.

Podobne badania porównawcze przy pomocy metody hodowlanej i immunofluorescencyjnej prowadzili między innymi Winter i wsp. (14), Philpott (9) oraz Andrews i Frank (15). Autorzy ci w pełni potwierdzili praktyczną wartość metody IF w diagnostyce metwika płodowego uważając, że stanowi ona cenne uzupełnienie metody hodowlanej.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Sporządzone wg opisanych metod konjugaty wykazały wystarczającą dla celów diagnostycznych swoistość gatunkową i intensywność w reakcjach immunofluorescencyjnych z drobnoustrojami z rodzaju *Campylobacter*.

2. Metoda IF umożliwia wykrycie drobnoustrojów z rodzaju *Campylobacter* w materiałach, w których na skutek obumarcia lub osłabienia zdolności życiowych tych bakterii, z powodzą rutynowe metody hodowlane.

3. Metoda IF w korelacji z hodowlaną pozwala na szybkie rozgraniczenie szczepów gatunku *Campylobacter fetus* od gatunku *Campylobacter sputorum*.

Piśmiennictwo

1. Andrews P. J., Frank F. W.: J. Am. vet. med. Ass. 165, 695, 1974.
2. Berg R. J., Jutila J. W., Firehammer B. D.: Am. J. vet. Res. 32, 11, 1971.
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1975.
4. Herchsler R. C.: cyt. O'Berry (7).
5. McLaren A. P. C., Wright C. L.: Vet. Rec. 101, 463, 1977.
6. Mellick P. W., Winter A. J., McEntee K.: Cornell Vet. 55, 280, 1965.
7. O'Berry P. A.: Am. J. vet. Res. 25, 1669, 1964.
8. Philpott M.: Vet. Rec. 82, 458, 1968.
9. Philpott M.: Vet. Rec. 82, 458, 1968.
10. Shires G. M. H., Kramer T. T.: J. Am. vet. med. Ass. 164, 398, 1974.
11. Taul L. K., Kleckner A. L.: Am. J. vet. Res. 29, 711, 1968.
12. Wilkie B. N., Winter A. J.: Canad. J. comp. Med. 35, 391, 1971.
13. Winter A. J., Dunn H. W.: Am. J. vet. Res. 23, 150, 1962.
14. Winter A. J., Samuelson J. D., Elkana M.: Am. J. vet. Res. 150, 499, 1967.
15. Zekov St., Rezaszka A.: Vet. Sbir. Sof. 12, 84, 1975.

Adres autora: doc. dr hab. Kazimierz Roslanowski, ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz k/Poznań.

Михалкевич М., Рослановский К., Лосинский Т., Шпрингель И. — Изготовление специфических конъюгатов флюоресценции и их значение для дифференциальной диагностики микроорганизмов рода *Campylobacter*.

Авторы вели сравнительные исследования в направлении вибриоза скота с помощью классического метода культуры и метода ИФ. Они пользовались конъюгатами, изготовленными ими самими, опираясь как на местные штаммы, так и из образцовой музейной коллекции. Конъюгаты показали достаточную чувствительность и селективную интенсивность свечения, независимую от происхождения употребленных для их изготовления штаммов. Метод ИФ в корреляции с культурой давал возможность быстрого отделения штаммов вида *Campylobacter fetus* от вида *Campylobacter sputorum*, что практически позволяло объективно высказываться относительно большинства проб, вызывающих подозрение в присутствии патогенного штамма из рода *Campylobacter*. Авторы на основе результатов исследований с помощью ИФ принимают возможность появления в местности среди штаммов подвида *Campylobacter sputorum subsp. bubulus*, вариантов с неполно детерминированным комплексом антигенного своеобразия.

Michałkiewicz M., Roslanowski K., Losiński T., Szpryngiel I. — Preparation of the specific fluorescent conjugates and their value in differential diagnosis of *Campylobacter* sp.

The authors have carried out a comparative studies in cattle vibriosis by the use of the classical microbiological examination and the IF method. They used conjugates prepared on the local strain and on the strains obtained from the museum collection. The conjugates revealed a sufficient sensitivity and a selective light intensity irrespective of the source of the strains used for their production. The IF method in comparison to the classical microbiological examination allowed a quick differentiation of the strains of the *Campylobacter fetus* from *C. sputorum*. On the basis of the results of the studies obtained by the IF method, the authors suggest the possibility of occurrence of variants of not fully determined complex of the antigenic specific among the strains of the subspecies *Campylobacter sputorum subsp. bubulus* in the local area.