

HANNA LEWKOWICZ, HANNA NAWRATIL

Modyfikacja techniki wykonania odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM) w kierunku leptospirozy

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Grunwaldzka 250, 60-956 Poznań 47

Dla bieżącej kontroli sytuacji epizootycznej trzody chlewnej w chlewniach zarodowych i dużych fermach prowadzone są masowe badania laboratoryjne, spośród których najczęściej wykonywane i najbardziej uciążliwe są serologiczne badania w kierunku leptospirozy (2, 7). Prowadzone są one w ZHW za pomocą aglutynacji mikroskopowej (OAM). Wykonanie OAM zgodnie z obowiązującą instrukcją (4) jest bardzo pracochłonne, co skłania zainteresowanych do poszukiwania łatwiejszej techniki badania (1, 3, 8) przy co najmniej równej lub większej wartości diagnostycznej.

Celem podjętych badań było opracowanie modyfikacji techniki wykonania OAM w kierunku leptospirozy z zachowaniem jej pełnej wartości diagnostycznej przy równoczesnej oszczędności pracy i antygenów.

Materiał i metody

Badania prowadzono na 7337 próbach krwi pochodzącej od świń z ferm przemysłowych i hodowlanych, przysyłanych do rutynowych badań serologicznych, z uwzględnieniem partii prób pochodzących z gospodarstw ze stwierdzoną leptospirozą.

Modyfikacja dotychczasowej metody polegała na zbiorczym rozcieńczeniu kilku surowic i ich wstępnym testowaniu odpowiednimi serotypami leptospir. Równolegle z nastawianiem testu OAM wg obowiązującej metody (4), postępowano w sposób następujący: do rzędu probówek rozlewano najpierw po 0,9 ml rozcieńczalnika, który stanowiła przegotowana i przefiltrowana woda, a następnie do każdej probówki dodawano po 0,02 ml surowicy z pięciu kolejnych prób. W przypadku partii prób niepodzielnych przez 5, ostatnie zbiorcze rozcieńczenie wykonuje się z pozostałych surowic, uzupełniając je do objętości 0,1 ml ostatnią z badanych surowic lub znaną surowicą ujemną. Uzyskiwano w ten sposób rozcieńczenia zbiorcze o wartości 1/50 dla każdej wchodzącej w jego skład surowicy. Z kolei z każdej probówki przenoszono po jednej kropli na 6 szkiełek podstawowych, w celu wykonania preparatów do mikroaglutynacji

z 6 różnymi serotypami leptospir: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. sejroe*, *L. tarassovi*, *L. pomona*, *L. canicola*. Przez dodanie równej objętości antygenów uzyskiwano ostatecznie rozcieńczenia 1/100 każdej surowicy, dodawanej w ilości 0,02 ml.

Dalsze postępowanie tzn. czas inkubacji i sposób mikroskopowej oceny preparatów, było identyczne w obu metodach. Jeśli przy metodzie dotychczas obowiązującej stwierdzono odczyn dodatnie w mianie 1/00, wykonywano dalsze rozcieńczenia badanej surowicy — 1/400, 1/800, 1/1600. Natomiast w przypadku pozytywnej reakcji w próbie zbiorczej, wykonywano od nowa 5 rozcieńczeń od 1/100 do 1/1600 oddzielnie dla każdej z pięciu surowic i następnie z kolejnych rozcieńczeń przygotowywano preparaty z antygenem, wyjątkowo więcej niż z jednym, dającym aglutynację w preparacie zbiorczym.

Wyniki i omówienie

Odczyn aglutynacji mikroskopowej z żywymi szczepami uważany jest nadal za najbardziej czuły i swoisty test serologiczny w rozpoznawaniu leptospirozy (1, 4, 5, 6), aczkolwiek jak każda metoda serologiczna obarczony jest pewnym błędem (3, 5, 6). Wykonanie badań z zastosowaniem proponowanej modyfikacji błędu tego nie zwiększa, gdyż ostateczne wyniki testowania surowic w obu metodach były identyczne. Na zbadanych obu sposobami 7337 surowic — sposobem obowiązującym — jako ujemne, bez potrzeby kontynuowania badania, oceniono 6291 prób. Natomiast metodą proponowaną tylko 5668. Pozostałą liczbę 623 ujemnie reagujących surowic wyselekcjonowano z prób zbiorczych dopiero po miareczkowaniu pojedynczych surowic, uzyskując jednakową liczbę 1046 pozytywnych reakcji w zakresie rozcieńczeń od 1/100 do 1/1600 dla obu sposobów badania (tab. 1). W żadnym przypadku nie odnotowano sytuacji, aby przy ujemnych wynikach, w preparacie zbiorczym z 5 surowic, uzyskano pozytywne wyniki wykonując próby wg o-

Tab. 1. Kształtowanie się sumarycznych wyników OAM w trakcie wykonywania odczynu 2 porównanymi sposobami

Sposób wykonania odczynu	Liczba prób	1 etap badania			Liczba prób do dalszych badań	2 etap badania (próby pojed.)			
		Wyniki				Wyniki w rzędzie nastawianym:			
		ujemne	dodatnie o wys. miana 1/100			1/400—1/1600		1/100—1/1600	
			próby pojed.	próby zbiorcze		ujemne	dodatnie	ujemne	dodatnie
Obowiązujący	7337	6291	109 *	—	937	270	667	—	—
Proponowany	7337	5668	—	358 *	1669	—	—	623	1046

Objaśnienie: * — aglutynacja wystąpiła z 1 lub więcej antygenami.

bowiązującej metody. Natomiast odwrotnie w 7 preparatach zbiorczych stwierdzono aglutynaty, które nie potwierdziły się przy badaniu pojedynczych surowic. Przyczyną pojawienia się aglutynatów jedynie w próbach zbiorczych może być większa ilość surowicy — 0,1 ml zamiast 0,02 ml z równoczesnym sumowaniem się aglutynin o niższym poziomie występujących jednocześnie w kilku próbach. Fakt ten wskazuje na większą czułość proponowanej metody, co przy masowych badaniach należy uznać za zjawisko korzystne. Przy badaniu prób, wśród których stwierdzono 14,2% surowic dodatnio reagujących, proponowaną technikę wykonano około 5-krotnie mniej preparatów do oceny mikroskopowej i tyleż krotnie mniej było zużycie antygenów. Wykonano także prawie dwukrotnie mniej rozcieńczeń badanych surowic (tab. 2).

Tab. 2. Porównanie liczb wykonanych rozcieńczeń surowic i preparatów do oceny mikroskopowej oraz zużycia antygenów przy 2 sposobach badania

Sposób wykonania odczynu	Próby	Oceniono preparatów	Wykonano rozcieńczeń	Zużyto antygenu w ml
Obowiązujący	7337	90870	17485	4543,50
Proponowany	7337	17238	9773	861,90

Oszczędność pracy, szkła i antygenów przy zastosowaniu proponowanej modyfikacji odczynu jest odwrotnie proporcjonalna do liczby stwierdzanych wyników dodatnich. W krańcowych przypadkach, gdyby wszystkie surowice reagowały z jednym z antygenów, liczba preparatów do oceny mikroskopowej nawet nie będzie dwukrotnie mniejsza. Natomiast, gdy wszystkie wyniki są ujemne, oszczędność jest dziesięciokrotna.

Biorąc pod uwagę oszczędność w zakresie nakładu pracy i używanych komponentów, a także obiektywność wyników, można uznać proponowany sposób wykonania odczynu za godny polecenia do szybkiego wdrożenia, zwłaszcza w masowych rutynowych badaniach serologicznych, stosowanych w rozpoznawaniu leptospirozy.

Piśmiennictwo

- Górska L., Kocik T., Porębska B., Królak M.: *Medycyna Wet.* 35, 469, 1979.
 - Konarska D., Polewczak G., Sozańska T., Babicz J., Zwierzchowski J.: *Zesz. Dolnośląskiego Zespołu ds. zoonoz* 1, 37, 1978.
 - Lewkowicz H., Nawratil H.: *Przegląd prac ZHW Poznań* 2, 55, 1979.
 - Min. Rol. Dep. Wet. — Instrukcja 35 z dn. 25.5.1974 (wraz z załącznikiem).
 - Sramkova L., Vanista J., Cervovo H., Polakova L.: *Cas. Lek. Ces.* 12, 368, 1977.
 - Strilingne-Mocsy M.: *Magy. Allatorv. Lap.* 33, 35, 1978.
 - Turner L. H.: *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 62, 880, 1968.
 - Weber B.: *informacje ustne (Cottbus NRD)* 1978.
- Adres autora: dr Hanna Lewkowicz, ul. Słowackiego 38 m 7, 60-825 Poznań

Левкович Г., Навратиль Г. — Модификация подготовки реакции микроскопной агглютинации относительно лептоспироза.

Предложенная модификация обязывающей техники реакции микроскопной агглютинации при серологическом распознавании лептоспироза касается вступительного разбавления исследуемых сывороток. Через подготовку сборных препаратов из 5 сывороток значительно экономят труд и антигены. Показано притом, что предлагаемая модификация не вызывает по сравнению с прежней понижения чувствительности реакции.

Lewkowicz H., Nawratil H. — **Modification of microscopic agglutination test towards leptospirosis.**

The modification of the test concerns the preliminary dilution of sera under study. Using collective preparations consisting of five sera one may save time and the quantity of antigens. The modification proposed does not cause a decrease of the test sensitivity.

BUDDLE J. R., JONES J. E. T., PASS D. A., ROBERTSON J.: Izolacja *Streptococcus suis* typ II od świń z zapaleniem opon mózgowych. (The isolation of *Streptococcus suis* type II from a pig with meningitis). *Aust. vet. J.*, 57, 437—438, 1981 (9).

Od 8-tygodniowego prosięcia z fermy liczącej 300 macior wyosobniono *Streptococcus suis* typ II. Na fermie tej występowały u prosiąt zaburzenia ze strony układu oddechowego, brak koordynacji ruchów, ataksja, porażenie i padnięcia. U części chorych prosiąt występowało zaczerwienienie skóry kończyn. Badanie sekcyjne padłego prosięcia wykazało włóknikowe zapalenie opłucnej, osierdzia, otrzewnej, opon mózgowych i stawów. Zmiany mikroskopowe wskazywały ostre ropne zapalenie opon mózgowych, zapalenie miedniczek nerkowych i odoskrzelowe zapalenie płuc. *S. suis* typ II jest również patogenny dla ludzi, u których może wywoływać zapalenie opon mózgowych i posocznice.

G.

TAYLOR T. K., WILKS C. R., MC QUEN D. S.: Izolacja *Mycobacterium paratuberculosis* z mleka krów z chorobą Johnego. (Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with John's disease). *Vet. Rec.*, 109, 532—533, 1981 (24).

Próbki mleka pochodzące od 26 krów z objawami klinicznymi choroby Johnego badano na obecność *Mycobacterium paratuberculosis*. Równocześnie przebadano w tym samym kierunku kał oraz przeprowadzono badania serologiczne krwi w odczynie wiązania dopełniacza z użyciem zabitego ogrzewaniem *M. avium* jako antygeny. *M. paratuberculosis* wyosobniono z mleka 9 z 26 badanych krów na podłożu Herrolda. Występowanie *M. paratuberculosis* w mleku wskazuje na udział mleka w przenoszeniu zakażenia na cielęta. *M. paratuberculosis* wyosobniono również z 16 na 21 badanych próbek kału. Ponadto wyizolowano go również z nadwymieniowych węzłów chłonnych trzech krów oraz z głębokich tkanek wymienia dwóch krów. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio z surowicami 81% zakażonych krów w mianie od 8 do 128.

G.