

ченное методом Коха. Помимо некоторых статистически существенных разниц средние числа бактерий, получаемые разными методами при исследовании того же самого материала, располагались всегда в том же самом логарифмическом интервале.

Radkowski M., Kafel S. — **Comparative examinations on the drop and Koch's plate method in determining the number of bacteria in food**

The number of bacterial cells was determined in

naturally infected milk and meat, and in broth cultures of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* by means of surface seed on agar media, drop method, and drop method modified. It was found that the both drop methods gave results reflecting the state of infection noted by Koch's method. Mean numbers of bacterial cells, independently upon the technique used, were in the same log intervals, though there were some statistical differences among them.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

MARIAN KRÓLAK, ANDRZEJ STRYSZAK

Zasady oraz aktualny schemat serodiagnostyki brucelozy zwierząt w Polsce

Pracownia Badania Brucelozy Instytutu Weterynarii, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk-Oliwa

Znaczny postęp w zwalczaniu brucelozy był w latach 70-tych umożliwił uznanie Polski za kraj urzędowo wolny od brucelozy w końcu 1980 roku (12). W masowych badaniach serologicznych na brucelozę stosowano przez wiele lat równoległe dwa odczyny, określane jako podstawowe, tzn. odczyn aglutynacji (OA) i odczyn wiązania dopełniacza (OWD) (3, 4, 6). W końcowym okresie walki z brucelozą wprowadzono dwa dodatkowe odczyny aglutynacyjne, tzn. odczyn antyglobulinowy (OAG) i odczyn z 2-merkaptotetanolem (OME) (14, 19, 26), za pomocą których weryfikowano swoistość dodatnich reakcji w OA.

Przez następne 4 lata, po uznaniu kraju za wolny od brucelozy, w badaniach okresowych nadal stosowano OA i OWD oraz dodatkowo OAG i OME. Przyczyniło się to niewątpliwie do spadku liczby seroreagentów wykrywanych w ciągu roku, a mianowicie, z 0,03% w roku 1980 do 0,001% w roku 1984, wśród 3,5—4 milionów zwierząt badanych w ciągu roku.

W 1985 r. zmieniony został schemat okresowych badań kontrolnych na brucelozę. Podstawą tych badań stał się odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP), stosowany jako odczyn skринingowy (10). Wymienione wyżej odczyny podstawowe (OA, OWD) oraz dodatkowe (OAG, OME) stosowane są w tym schemacie dla weryfikowania dodatnich wyników OKAP oraz, niezależnie od OKAP, w sytuacjach uzasadnionych względami epizootycznymi.

Wcześniej opublikowano prace na temat wartości diagnostycznej odczynów podstawowych i dodatkowych (21) oraz wartości OKAP (22).

Ten ostatni odczyn został szczegółowo przebadany w ramach pracy doktorskiej (23). Poniższe opracowanie zawiera zasady standary-

zacji i kontroli czułości stosowanych w Polsce odczynów serologicznych oraz aktualny schemat okresowych badań kontrolnych zwierząt na brucelozę.

Zasady standaryzacji i kontroli odczynów serologicznych

Odczyn aglutynacji probówkowej (OA) wykonywany jest techniką standardową z 1964 r. (4). Jako rozcieńczalnik stosuje się 5% roztwór NaCl z dodatkiem 0,5% fenolu. Antygen produkowany przez Zakłady „Biowet” w Puławach stanowi zawiesinę zabitych komórek *Brucella abortus*, szczep S-19, barwionych przyżyciowo TTC (1) i standaryzowaną do takiej gęstości roboczej, która zapewnia z drugim Międzynarodowym Standardem Surowicy anty-*Brucella abortus* (ISAbS-II) miano 1:500⁺⁺. Ponieważ 1 cm³ ISAbS-II zawiera 1000 międzynarodowych jednostek aglutynin (mja_{gl}), wynika stąd mnożnik 2 (1000:500) który służy do przeliczania mian OA na liczbę mja_{gl} w 1 cm³ badanej surowicy (tab. 1). Kontrolę aglutynabilności każdej serii antygeny wykonuje się przy pomocy Krajowego Standardu Surowicy anty-*Brucella abortus* do aglutynacji (KSSaBa-OA), który pod względem zawartości aglutynin odpowiada ISAbS-II. Liofilizowany KSSaBa-OA podlega raz w roku kontroli wobec ISAbS-II. W laboratoriach rozpoznawczych czułość OA kontrolowana jest przy pomocy Roboczego Standardu Surowicy anty-*Brucella abortus* do aglutynacji (RSSaBa-OA). Liofilizowany RSSaBa-OA posiada miano 1:50⁺⁺, co odpowiada 1/10 aktywności ISAbS-II. W laboratoryjnej ocenie wyników badań bydła i świń stosuje się od 1964 (4) następujące kryteria roz-

Tab. 1. Przeliczenie mian OA na jednostki międzynarodowe aglutynin (mjagl)

Rozcieńczenie surowicy w OA 1:	Ilość plusów	Ilość mjagl/cm ³
6,25	+	10,47
	++	12,50
	+++	14,53
	++++	16,56
12,5	+	20,94
	++	25,00
	+++	29,06
	++++	33,12
25	+	41,88
	++	50,00
	+++	58,13
	++++	66,25
50	+	83,75
	++	100,00
	+++	116,25
	++++	132,50
100	+	167,50
	++	200,00
	+++	232,50
	++++	265,00
200	+	335,00
	++	400,00
	+++	465,00
	++++	530,00
400	+	670,00
	++	800,00
	+++	930,00
	++++	1060,00

Tab. 2. Przeliczenie mian OWD na międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz (mjpwd)

Rozcieńczenie surowicy w OWD 1:	Ilość plusów	Ilość mjpwd/cm ³
2,5	+	8,38
	++	10,00
	+++	11,63
	++++	13,25
5	+	16,75
	++	20,00
	+++	23,25
	++++	26,50
10	+	33,50
	++	40,00
	+++	46,50
	++++	53,00
20	+	63,00
	++	80,00
	+++	93,00
	++++	106,00
40	+	134,00
	++	160,00
	+++	186,00
	++++	212,00
80	+	268,00
	++	320,00
	+++	372,00
	++++	424,00
160	+	536,00
	++	640,00
	+++	744,00
	++++	848,00

poznawcze : miano $\geq 1:50^{++}$ — wynik dodatni, $1:25^{++}$ — $1:50^{+}$ — wynik wątpliwy, $\leq 1:25^{+}$ — wynik ujemny. W badaniu owiec i kóz obowiązują od 1978 r. (18) następujące kryteria: miano $\geq 1:25^{++}$ — wynik dodatni, $1:12,5^{++}$ — $1:25^{+}$ — wynik wątpliwy, $\leq 1:12,5^{+}$ — wynik ujemny.

Odczyn wiązania dopełniacza (OWD) wykonywany był do 1981 r. techniką 100% lizy (3). Jak wykazano w badaniach porównawczych (24), stosowane w tym okresie kryteria rozpoznawcze zbliżone były do kryteriów zalecanych przez Komitet Ekspertów FAO/WHO ds brucelozy (2). Od 1982 r. odczyn wykonywany jest standardową techniką 50% lizy (7). Jako rozcieńczalnik stosowany jest bufor barbitalowy w tabletkach o pH 7,3—7,4 z dodatkiem jonów Mg i Ca (16). Inkubacja I i II fazy prowadzona jest w łaźni wodnej o temp. 37°C przez 30 minut. W układzie hemolitycznym stosuje się 2% zawiesinę owczych erytrocytów i hemolizynę w ilości 5 jednostek, określonych metodą 100% lizy. Dopełniacz (C') stosuje się w ilości 3 jednostek (3C'H₅₀). Jako antygen stosuje się zawiesinę komórek *Brucella abortus*, szczep S-19, produkowaną przez Zakłady „Biowet” w Puławach. Liofilizowana zawiesina o gęstości 10 vol/% standaryzowana jest do gę-

stości roboczej, która zapewnia z ISAbS-II miano $1:250^{++}$. Ponieważ 1 cm³ ISAbS-II zawiera 1000 międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz (mjpwd), wynika stąd mnożnik 4 (1000:250), który służy do przeliczania mian OWD na liczbę mjpwd w 1 cm³ badanej surowicy (tab. 2). Kontrolę aktywności każdej serii antygeny wykonuje się przy pomocy Krajowego Standardu Surowicy anty-*Brucella abortus* do OWD (KSSaBa-OWD), który pod względem zawartości mjpwd odpowiada ISAbS-II. Liofilizowany KSSaBa-OWD podlega raz w roku sprawdzeniu wobec ISAbS-II. W laboratoriach rozpoznawczych czułość OWD kontrolowana jest przy użyciu Roboczego Standardu Surowicy anty-*Brucella abortus* do OWD (RSSaBa-OWD). Liofilizowany RSSaBa-OWD posiada miano $1:5^{++}$, co odpowiada $1/50$ aktywności ISAbS-II. W laboratoryjnej ocenie wyników badania wszystkich gatunków zwierząt domowych nie szczepionych oraz zwierząt laboratoryjnych obowiązują od 1982 r. (8) następujące kryteria rozpoznawcze: miano $\geq 1:5^{++}$ — wynik dodatni, $1:2,5^{++}$ — $1:5^{+}$ — wynik wątpliwy, $\leq 1:2,5^{+}$ — wynik ujemny.

Odczyn antyglobulinowy (OAG) wykonywany jest techniką standardową z 1978 r. (26) w

celu stwierdzenia aglutynin niekompletnych, niewykrywalnych w OA (21). Po odczytaniu wyników OA, antygen zawarty w probówkach, w których brak aglutynacji, przemywa się kilkakrotnie w 0,85% roztworze NaCl, droga wirowania przy 2500 g przez 20 minut. Uzyskany osad bruceli zawiesza się w 1 cm³ surowicy antyglobulinowej (SAG). Robocze rozcieńczenie SAG (handlowy Antybowiglobin) określa się w drodze mianowania w układzie: antygen do OA uczulony Wzorcowa Surowica anty-*Brucella* do OAG (WSAB-OAG) o mianie 1:320⁺⁺⁺ (25, 26). Inkubacja i odczyt wyników wykonywana jest analogicznie jak w OA. W laboratoriach rozpoznawczych czułość OAG u bydła kontrolowana jest przy użyciu liofilizowanej surowicy wzorcowej (WSAB-OAGB) o mianie 1:320⁺⁺⁺. W ocenie wyników badań przyjmuje się za podstawę stopień przewyższenia miana OAG nad miano OA (13, 26): przewyższenie $\geq 3^\circ$ — wynik dodatni, 2° — wynik wątpliwy, $\leq 1^\circ$ — wynik ujemny.

Odczyn z 2-merkaptotanołem (OME) wykonywany jest techniką standardową z 1979 r. (14) w celu wykrycia aglutynin klasy IgG, charakterystycznych dla czynnego zakażenia brucelami (21). Badanie w OME wykonuje się równoległe z badaniem w OA. Zawarte w surowicy badanej aglutyniny klasy IgM redukuje się przy użyciu 2-merkaptotanolu (2-ME). Następnie zredukowaną surowicę rozcieńcza się, dodaje antygeny, inkubuje i odczytuje wyniki w sposób analogiczny jak w OA. W ocenie wyników bierze się pod uwagę poziom aglutynin (miano) przed i po redukcji w 2-ME, niezależnie od wielkości miana stwierdzonego w OA: brak redukcji aglutynin — wynik dodatni, częściowa redukcja — wynik wątpliwy, całkowita redukcja — wynik ujemny.

Odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) wykonywany jest techniką standardową z 1984 r. (10) jako badanie skriningowe. Kroplę surowicy badanej (0,03 cm³) łączy się z kroplą antygeny (0,03 cm³) na białej płycie i po 4 minutach mieszania składników, na specjalnym mieszadle OKAP, odczytuje się wynik. Każdy ślad aglutynacji przyjmuje się za wynik dodatni, brak aglutynacji za wynik ujemny. Kategorii wyników wątpliwych nie stosuje się. Jako antygen stosuje się zawiesinę *Brucella abortus*, szczep S-19, barwioną różem bengalskim, o pH 7,3—7,6. Antygen produkowany jest przez Zakłady „Biowet” w Puławach w postaci zawiesiny 6—8 vol/%, standaryzowany przy użyciu KSSaBa-OA; antygen rozcieńczony 1:20 w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0 zapewnia z KSSaBa-OA miano 1:600⁺⁺ (17). W laboratoriach rozpoznawczych czułość OKAP kontrolowana jest przy użyciu RSSaBa-OA. Z roboczym rozcieńczeniem tej surowicy, wykazującym w OA miano 1:50⁺⁺, uzyskuje się w OKAP wynik dodatni.

Aktualny schemat okresowych badań zwierząt na brucelozę

Przez wiele lat stada bydła w gospodarstwach uspołeczniionych badane były dwukrotnie w ciągu roku (5). Od 1983 r. wojewódzki lekarz weterynarii może zmniejszyć częstotliwość tych badań do jednego badania w roku (9). Do 1985 r. zanim wprowadzono skriningowe badania przy pomocy OKAP (10), okresowe badania kontrolne zwierząt na brucelozę wykonywane były przy użyciu OA i OWD (6). Dodatkowo, od 1979 r., zwierzęta reagujące dodatnio tylko w OA badane były przy użyciu OAG i OME (19). Badania te wykonywane były w 11 wytypowanych zakładach higieny weterynaryjnej (zhw) oraz odwoławczo w Pracowni Badania Brucelozy IWet. Podobny tok postępowania stosowany był przy badaniu bydła w gospodarstwach indywidualnych oraz w stadach świń i owiec, z tą różnicą, że OAG u świń wykonywano tylko w IWet, zaś OAG u owiec nie jest do tej pory stosowany.

Stosowanie OAG i OME miało na celu weryfikowanie swoistości wątpliwych, a nawet dodatnich wyników OA (15, 21). Takie wykorzystanie dodatkowych odczynów aglutynacyjnych ułatwiało brak, praktycznie biorąc, aglutynin poszczepiennych w populacji zwierząt gospodarskich w Polsce. Jak wiadomo, w 1975 r. zaprzestano ostatecznie stosowania w całym kraju szczepionki S-19 bydła, zaś u świń i owiec szczepień ochronnych przeciw brucelozie nigdy nie stosowano. Biorąc powyższe pod uwagę, przyjęto w praktyce następujący schemat postępowania. Jeśli w dwóch kolejnych badaniach, wykonanych w odstępach 21 dni, ilość aglutynin utrzymywała się na poziomie ≥ 50 mjał, a jednocześnie zwierzę było ujemne w OWD, OAG lub OME, to dodatnie reakcje w OA traktowano jako nieswoiste dla brucelozy, spowodowane przez inne drobnoustroje, spokrewnione antygenowo z rodzajem *Brucella* (15, 21). Zwierzęta reagujące według powyższego wzoru nie podlegały eliminowaniu ze stada. Nie dotyczyło to przypadków, w których istniało podejrzenie komplikacji serodiagnostyki brucelozy na tle zakażeń *Yersinia enterocolitica*, serotyp 09. Podstawą do takiego podejrzenia były dodatnie wyniki w OWD, OAG lub OME, przy braku danych epizootologicznych, wskazujących na brucelozę. W takich przypadkach zwierzę kierowano do uboju i poddawano badaniom serologicznym i bakteriologicznym w kierunku brucelozy i jersiniozy (20).

Od 1985 r. po wprowadzeniu OKAP do badań kontrolnych na brucelozę w stadach bydła, świń i owiec, schemat tych badań uległ zmianie (10). Aktualny schemat badań ma charakter dwustopniowy. W I etapie wykonuje się skriningowe badanie całych stad zwierząt przy użyciu OKAP. W przypadku wyniku ujemnego zwierzęta uznawane są za zdrowe.

Natomiast dodatni wynik w OKAP zobowiązuje do zbadania tej samej próbki surowicy w odczynach podstawowych (OA i OWD). Ujemne wyniki w obu tych odczynach pozwalają wykluczyć brucelozę u badanych zwierząt, zaś wynik dodatni w OWD oznacza zakażenie. Natomiast wątpliwy wynik w OWD, jak również wątpliwy lub dodatni wynik w OA jest wskazaniem do II etapu badań po 21 dniach, za pomocą odczynów podstawowych (OA i OWD) oraz odczynów dodatkowych (OME i OAG). Ocenę uzyskanych wyników tych badań przeprowadza się zgodnie z odpowiednimi przepisami (6, 8, 18, 19).

Należy podkreślić, że OKAP stosuje się w okresowych badaniach całych stad zwierząt wolnych od brucelozy. W przypadkach podejrzenia o brucelozę, jak również przy badaniu zwierząt hodowlanych, przeznaczonych do obrotu wewnętrznego lub na eksport, uzasadnione jest badanie przy użyciu OA i OWD, z pominięciem skринingowego badania w OKAP.

Przedstawiony schemat postępowania opracowany został z myślą o skutecznej ochronie stad zwierząt przed nawrotami brucelozy, a jednocześnie w celu zmniejszenia pracochłonności i kosztów okresowych badań kontrolnych na brucelozę. Natomiast podane zasady standaryzacji oraz przeliczania mian OA i OWD na jednostki międzynarodowe przeciwciał winny być pomocne w zabezpieczeniu kraju przed zawlečeniami brucelozy ze zwierzętami importowanymi. Wyniki tych dwóch odczynów są bowiem powszechnie przyjmowane jako podstawa oceny stanu zdrowia zwierząt w obrocie międzynarodowym (11). Należy przy tym zaznaczyć, że przyjęte w Polsce kryteria diagnostyczne są wyższe w OA oraz niższe w OWD, w porównaniu do kryteriów zalecanych przez Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE) w międzynarodowym kodeksie zoosanitarnym (11). Tak więc u bydła wynik ujemny w Polsce wynosi w OA poniżej 50 mjadg, a w OWD poniżej 10 mjpwd (4, 7), zaś według OIE za wynik ujemny przyjmuje się w OA poniżej 30 mjadg, a w OWD poniżej 20 mjpwd (11). Przyjęte w Polsce kryteria w OWD oparte zostały na wieloletnich krajowych obserwacjach (24) oraz danych piśmiennictwa (21), według których OWD jest odczynem bardziej swoistym i miarodajnym niż OA w ocenie stanu zdrowia pojedynczych zwierząt. Wiadomo bowiem, że wyniki OA mogą być w znacznej mierze obarczone błędem wynikającym z reakcji nieswoistych (15, 21). Fakt ten spowodował konieczność weryfikowania wyników OA przy pomocy OAG i OME (19).

Piśmiennictwo

1. Anczykowski F.: Bull. Off. int. Epizoot. 53, 315, 1960.
2. Fourth report FAO/WHO Exp. Com. Bruc., Rome 1964.
3. Instrukcja Min. Rol. — Dep. Wet. Nr 14 z dnia 1.10.1964.
4. Instrukcja Min. Rol. — Dep. Wet. Nr 15 z dnia 27.10.1964.
5. Instrukcja Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 1.12.1975 (WETgb-642-27/75).
6. Instrukcja Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 5.11.1976 (WETz, gb-4414-1/76).
7. Instrukcja Min. Rol. — Dep. Wet. Nr 52 z dnia 31.05.1980.
8. Instrukcja Min. Rol. Gosp. Żywn. — Dep. Wet. z dnia 7.05.1982 (WETz-II-4414-4/82).
9. Instrukcja Min. Rol. Gosp. Żywn. — Dep. Wet. z dnia 4.11.1983 (WETz-II-4414-4/83).
10. Instrukcja Min. Rol. Gosp. Żywn. — Dep. Wet. Nr 55 z dnia 2.02.1984.
11. International Zoo-Sanitary Code, Office International des Epizooties, Paris 1982.
12. Komunikat Ministra Rolnictwa z dnia 3.11.1980 (WETsp-11-4414-15/80).
13. Królak M.: Pol. Arch. Wet. 17, 95, 1974.
14. Królak M., Stryszak A.: Standardowa technika odczynu z 2-merkaptetanolem (OME) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. Wyd. Instytut Weterynarii, Puławy 1979.
15. Królak M., Chyliński G., Stryszak A., Nowosielski T., Marciniński W.: Medycyna wet. 37, 72, 1981.
16. Królak M., Janicki S., Starostka K., Błaszczyk B.: Pol. Arch. Wet. 23, 111, 1982.
17. Królak M., Wiśniewski Z., Stryszak A., Heleski M.: Medycyna wet. 39, 79, 1983.
18. Pismo Min. Rol. Dep. Wet. z dnia 18.05.1978 (WETz-gb-4414-14/78).
19. Pismo Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 4.10.1979 (WETz-II-4414-21/79).
20. Pismo Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 24.07.1980 (WETsp-II-4414-10/80).
21. Stryszak A., Królak M.: Medycyna wet. 37, 328, 1981.
22. Stryszak A., Królak M.: Medycyna wet. 37, 399, 1981.
23. Stryszak A.: Odczyn kwaśnej aglutynacji płytkowej (OKAP) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. Praca dokt., Instytut Weterynarii, Puławy 1983.
24. Wiśniewski J., Królak M.: Bull. Off. int. Epizoot. 63, 1219, 1965.
25. Wiśniewski J., Królak M., Drożdżyńska M.: Bull. Off. int. Epizoot. 75, 217, 1971.
26. Wiśniewski J., Królak M., Drożdżyńska M.: Standardowa technika odczynu antyglobulinowego (OAG) w rozpoznawaniu brucelozy bydła. Wyd. Instytut Weterynarii, Puławy 1978.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Królak, ul. Grunwaldzka 476/10, 80-309 Gdańsk-Oliwa

MACARTNEY L., MCCANDLISH I. A. P., THOMPSON H., CORNWELL H. J. C.: Parwowirusowe zapalenie jelit u psów. (Canine parvovirus enteritis: Pathogenesis). Vet. Rec. 115, 453—460, 1984 (16).

U szczeniąt w wieku 8—10 tygodni po zakażeniu doustnym parwowirusem wyizolowanym z kału chorych psów, wirus występuje po raz pierwszy w kale 3 dnia, osiągając maksymalne stężenie między 4 a 7 dniem. Swoiste przeciwciała pojawiają się w surowicy 5 dnia po zakażeniu, zaś wirus występuje 1—2 dni wcześniej. Wirus występuje w grasicy już 1 dnia po zakażeniu, w centrach rozrodczych węzłów chłonnych i w miazdze białej śledziony 2—3 dnia, zaś w komórkach strefy rozrodczej nabłonka krypt jelitowych 4 dnia po zakażeniu. Począwszy od 5 dnia po zakażeniu stężenie antygeny wirusowego w tkance limfatycznej obniża się i osiąga wartości śladowe między 7 i 8 dniem.

G.

PAL M., MEHROTRA B. S.: Związek *Aspergillus fumigatus* z zapaleniem nosa. (Association of *Aspergillus fumigatus* with rhinitis). Vet. Rec. 115, 167, 1984 (8).

W etiologii zapalenia nosa u zwierząt dużą rolę oprócz bakterii przypisuje się *Aspergillus fumigatus*. W 41 próbkach wysięku z jamy nosowej pochodzących od 23 mułów, 9 koni, 7 wielbłądów i 2 świń, wykazano badaniem hodowlanym na agarze Sabourauda z glukozą obecność *A. fumigatus* w czystej hodowli w wysięku z nosa jednego muła i jednego wielbłąda. U tych zwierząt stosowano przed izolacją *A. fumigatus* przez okres 25 dni leki przeciwhistaminowe, przeciwzapalne (hydrokortyzon) i terramycynę. Wyizolowane szczepy były patogenne dla myszek białych.

G.