

LEOPOLD UGORSKI

Zastosowanie metody aglutynacji płytowej do rozpoznawania salmonelozy u nutrii

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu
Kierownik: dr LEOPOLD UGORSKI

Weterynaria spośród metod diagnostycznych chętnie przyswaja sobie te, które z uwagi na prostotę i łatwość wykonania (szczególnie w warunkach terenowych) mogą znaleźć masowe zastosowanie. Wspomniane zalety posiada odczyn zlepnny płytowy z kroplą świeżej krwi i antygenem barwnym. W oparciu o dotychczasowe wyniki stosowania powyższej metody w serodiagnostyce pulerozy, salmonelozy ptactwa wodnego i brucelozy postanowiono zaadaptować ją w salmonelozie nutrii. Celowość tego dyktowała konieczność natury „biologicznej”, zasadniczo wykluczająca wykonywanie masowych badań bakteriologicznych kału u tych zwierząt. Defekacja u nutrii odbywa się przeważnie w wodzie i posiada charakter autoklizmy. Zwierzę wciąga wodę do prostnicy, aby następnie wypchnąć wraz z nią uformowane grudki kału, które porywa prąd wody przepływającej przez klatki.

Na podstawie badań własnych oraz informacji otrzymanych z 11 WZHW, czynnikiem etiologicznym salmonelozy u nutrii jest pałeczka tyfusu mysiego (*S. typhimurium*).

Przypadek Steffenowej wyhodowania na jednej z ferm *S. typhimurium*, *S. enteritidis* i *S. bovismorbificans* oraz przypadek własny — wydzielania *S. choleraesuis* są jak dotąd jedynym wyjątkiem świadczącym o możliwości istnienia zakażeń mieszanych.

Opracowanie płytowego odczynu zlepnego

1. Z kolekcji 326 szczepów *S. typhimurium* wyizolowanych w ciągu 6 lat z różnych epizootii salmonelozowych u nutrii użyto do produkcji antygenu szczepu „dwufazowego”, odznaczającego się stosunkowo małą zjadliwością ($LD_{50} 10^{-3}$, kiedy średnia kilkunastu innych szczepów wynosiła $LD_{50} 10^{-5}$) oraz dobrymi własnościami immunologicznymi (szczep nr 6964, kryp. „W-12”).*

Przygotowanie antygeny

Wzorcowy szczep *S. typhimurium* „W-12” przechowywany na podłożu Dorseta, przesiewa się na agar zwykły dla otrzymania po 24 godz. wzrostu pojedynczych kolonii, z których metodą Henry’ego izoluje się formy gładkie dla kolejnego przesiania ich na agary zwykłe skośne. Po następnych 24 godz. splukuje się

wyroste kolonie 10 ml płynu fizjologicznego. Otrzymaną spluczynę wysiewa się (we flaszkach Roux) na podłoże składające się ze zwykłego 3 proc. agaru z dodatkiem 0,5 proc. chloru amonu i 0,5 proc. tiosiarczany sodu. Flaszki Roux po 48 godz. trzymania w cieplarni zawiera się 30 ml jałowego roztworu o składzie

płyn fizjologiczny	100 ml
cytrynian sodu	2,0

na okres kilku godzin celem umożliwienia oddzielenia się masy bakteryjnej od podłoża. Po skontrolowaniu „czystości” uzyskanej zawiesiny, przesącza się przez jałową gazę. Następnie przeprowadza kontrolną aglutynację szkiełkową z surowicami anty-BO, 1, 12 oraz płynem fizjologicznym.

Potrzebną gęstość zawiesiny antygenowej oznacza się przy pomocy nefelometru Mac Farlanda.

Na każde 100 ml zawiesiny dodaje się 1 ml chloroformu oraz 5 ml 1 proc. roztworu wodnego fioletu krystalicznego. Po bardzo dokładnym wymieszaniu tak sporządzony antygen wstawia się na 24 godz. do termostatu wstrząsając co pewien czas. Po tym okresie wykonuje się następny odczyn zlepnny płytowy jak wyżej.

Tak sporządzony antygen jest preparatem biologicznie „nieczynnym”, bezpiecznym w użyciu, charakteryzującym się pełną sprawnością serologiczną sympleksu rzęskowego oraz w minimalnym stopniu upośledzoną sprawnością sympleksu somatycznego, mocną barwliwością komórki bakteryjnej, przy prawie nie barwiącym się medium.

2. Pobieranie krwi. U nutrii wszelkie ręko-czyny w okolicy głowy i tułowia uniemożliwiają potężne siekacze o dużej sile cięcia. Jedynie tylne kończyny, z uwagi na łatwy dostęp i bezpieczeństwo badającego, nadają się do wyszukiwania właściwego miejsca dla pobrania krwi, najlepiej nadaje się dla tego zabiegu bezwłosa dorsalna strona stopy, w odróżnieniu od partii wyżej leżących, pokrytych gęstym włosem szorstym i puchowym.

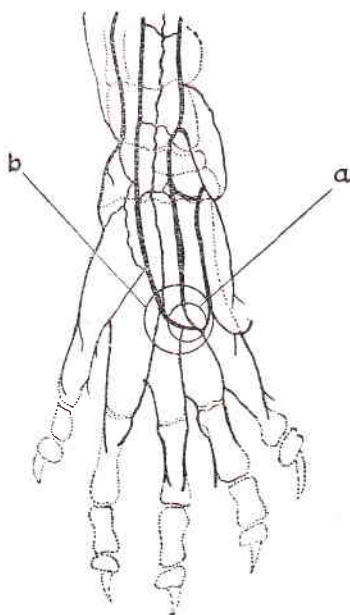
Ścisłe sprecyzowanie szukanego miejsca wymagało znajomości stosunków anatomicznych naczyń żylnych tylnej kończyny. Konsekwencją ich poznania było opracowanie układu żylnego stopy nutrii (rys. 1)*

Z analizy przedstawionego układu żylnego grzbietowej strony stopy nutrii wynika, że miejscem najwłaściwszym do pobrania krwi

*) Szczep nr 6964 „W-12” przekazano Gorzowskiemu Zakładom Przemysłu Bioweterynaryjnego, gdzie służy obecnie do produkcji szczepionki.

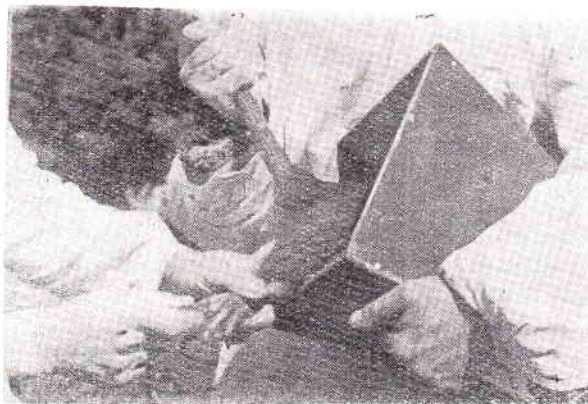
*) Przy wydatnej i cennej pomocy Pana Doc. dr Kazimierza Myczyńskiego.

jest łuk żylny grzbietowy dalszy śródstopia (*arcus venosus dorsalis digitalis*), ściślej ta jego część, która leży w rowku między drugą i trzecią kością śródstopia (na rys. 1 miejsce zakreślone kółkiem a). Można również wykorzystać do tego celu tę część w/w łuku żylnego, która leży w rynience między trzecią i czwartą kością śródstopia lub idąc w kierunku palców — leżące w wymienionych rynienkach żyły palcowe grzbietowe (*vv. digitales dorsales*), na rys. 1 miejsce zakreślone kółkiem b).



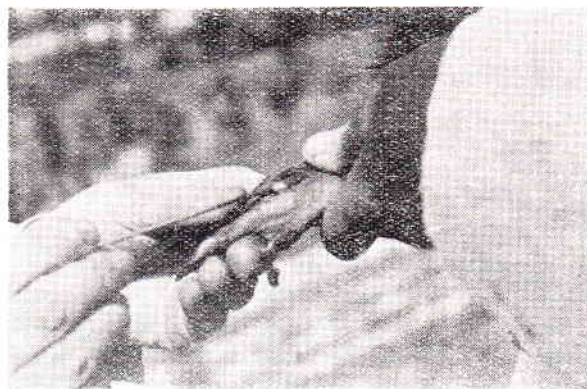
Rys. 1 wg K. Myczkowskiego

Znając stosunki anatomiczne, uzyskanie potrzebnych ilości krwi nie nastreża już żadnych trudności. Uciskając kciukiem lewej ręki grzbietową stronę stopy w połowie wysokości kości śródstopia, powodujemy wypełnienie się naczyń żylnych krwią, a co zatem idzie dobrą ich widoczność przez bardzo ciekłą w tym miejscu skórę (fot. 1 i 2).



Fot. 1.

Fot. Z. Zieliński



Fot. 2.

Fot. Z. Zieliński

Iglą trzymaną w prawej ręce nakłuwają się przeświecający łuk żylny między II a III kością śródstopia. Zabieg ten jest tym łatwiejszy, że utworzona przez obie kości śródstopia rynienka, na dnie której przebiega szukane naczynie żylnie jest równocześnie „kierunkową” ostrza igły naprowadzającą je na właściwy cel.

Metodą tą można w zależności od siły nakłucia uzyskać od kilku kropel do kilku ml krwi.

Sam zabieg jest prawie bezbolesny, bezpieczny dla zwierzęcia, i nie pozostawia żadnych śladów. Krwawienie ustępuje natychmiast po zwolnieniu ucisku. Zabieg można powtarzać bez obawy wywołania krwiaków podskórnych.

Na marginesie dodam, że jest to miejsce u nutrii nadające się również do wykonania zastrzyków dożylnych.

3. Ustalenie wysokości tzw. miana „fizjologicznego” dla zlepników anty- *S. typhimurium* w surowicy krwi zdrowych nutrii.

Badania przeprowadzono w dwóch seriach. W pierwszej użyto po 100 nutrii z czterech ferm (z których w dwu notowano paratyfus, dwie pozostałe wolne były od tego schorzenia). Badania wykonano przed i po uboju zwierząt.

Z surowicą krwi pobraną przed ubojem nastawiano odczyn zlepnym probówkowcy z antygenem *S. typhimurium* poczynając od rozcieńczenia 1:5. W wypadku otrzymania pozytywnej reakcji, aglutynację z daną surowicą prowadzono do wysokości jej miana. Następnie od każdej ze sztuk, u których odczyn zlepnym wystąpił już w rozcieńczeniu 1:5, po uboju pobierano do badania bakteriologicznego wycinki narządów wewnętrznych oraz kał z prostnicy na obecność pałeczek *Salmonella* w ogólności, a *S. typhimurium* w szczególności.

W fermach wolnych od salmonelozy 13 zwierząt (6,9 proc.) reagowało pozytywnie w mianie 1:5 i 1:10, a jedna nutria (0,54 proc.) w mianie wyższym. Z tego przypadku udało się wyhodować pał. tyfusu mysiego.

Wśród zwierząt z ferm objętych zarazą wykryto 24 reagentów (13,8 proc.) w mianach 1:5 i 1:10 oraz 3 (1,7 proc.) w mianach wyż-

szych. *S. typhimurium* wydzielone z dwóch sztuk o mianie 1:80 i 1:320.

W drugiej serii przebadano 1000 prób krwi nutrii pochodzących z różnych ferm woj. wrocławskiego. Odczyn zlepnny wykonano jak wyżej; 954 prób dało wynik ujemny (95,4 proc.), 31 reagowało dodatnio w rozcieńczeniu 1:10 i 1:20 (1,1 proc.), pozostałe 4 w rozcieńczeniach wyższych (0,4 proc.).

W sumie oba doświadczenia upoważniają do stwierdzenia, że w warunkach stanów fizjologicznych w surowicy krwi nutrii zlepniki anty-*S. typhimurium* nie występują.

Jedynie sporadycznie obecność ich ujawnia się ilościami, których rozcieńczeniem surowicy 1:25 stwierdzić się nie udaje.

Dlatego też przyjęto rozcieńczenie surowicy 1:20 za granicę miana fizjologicznego, a 1:25 za zobowiązujące -- dodatnie.

4. Określenie *optimal ratio* obu komponentów odczynu zlepnego płytowego dla strefy ekwiwalencji podanego powyżej miana surowicy 1:25, przeprowadzono w sposób podany w pracy pt.: „Możliwość wykorzystania antygenów barwnych w serodiagnostyce salmoneloz u ptactwa wodnego” (Med. Wet. 1959/10).

Stwierdzono, że strefa ekwiwalencji odczynu zlepnego płytowego odpowiadającego rozcieńczeniu surowicy 1:25 wymaga użycia antygeny o gęstości 1,5 miliarda pałeczek tyfusu mysiego w 1 ml. (nr 5 skali nefelometru Mac Farlanda).

Wspomniany antygen należy mieszać z tą samą ilością badanej krwi (np. 0,05 ml antygeny z 0,05 ml krwi lub 0,05 ml antygeny z 0,04 ml surowicy).

Przy zachowaniu podanych współczynników odczyn zlepnny przebiega szybko (maks. do 1 minuty) w formie gruboziarnistej, doskonale widocznej aglutynacji.

Reakcje z krwią o mianie niższym od 1:25 przeważnie wypadają ujemnie lub aglutynacja przebiega bardzo wolno (do 4—5 minut). Towarzyszy temu odczyn zlepnny drobnoziarnisty, trudno widoczny bez użycia szkła powiększającego.

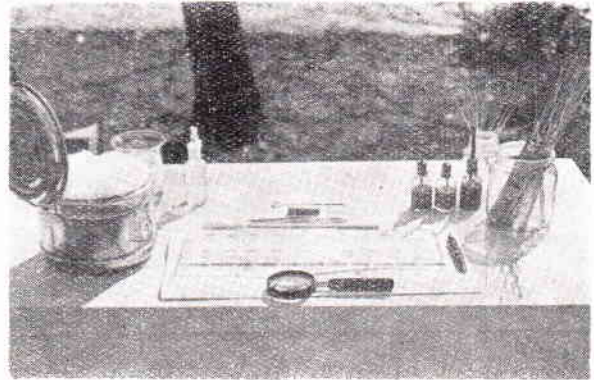
Sam tok postępowania przy masowych, terenowych badaniach serologicznych krwi nutrii na salmonelozę przedstawia się następująco:

Termin wykonania badań należy podać do wiadomości fermi na kilka dni przed ich rozpoczęciem. Czas ten jest potrzebny do poczynienia wstępnych przygotowań, do których należeć będzie zrobienie 10 kojców ponumerowanych od 1 do 10 dla przetrzymywania zwierząt w czasie badania. Dalej kilku mocnych skrzyń, w których będą umieszczone zwierzęta reagujące dodatnio. Skrzynie powinny posiadać zamknięcia.

W dniu badania nutrie należy przegłodzić.

Ekipa badająca składa się z lekarza wet. oraz siły pomocniczej.

W skład zestawu laboratoryjnego (fot. 3) wchodzi: 1. stół (wysokość 70—80 cm), 2. 3—4 płyty szklane z elipsowatymi wydłużeniami, 3. flaszeczka z antygenem barwnym. W korek wmontowana jest pipetka odmierzająca dawki 0,05 ml, 4. metalowy czerpak — mieszadełko o średnicy tarczki 3 mm pobierającej 0,05 ml krwi, 5. kilka grubszych, średnio długich igieł iniekcyjnych do nakłuwania żył, 6. flaszeczka z 4 proc. rozt. formaliny, 7. wata, wata z chlorkiem żelazowym, lignina, 8. ręcznik, iniednica, wiadro itp.



Fot. 3.

Fot. Z. Zieliński

Czynności związane z badaniem odbywają się w następującej kolejności:

Dwaj pracownicy fermowi wybierają nutrie z klatek i oddają je dwom innym, którzy po odpowiednim unieruchomieniu zwierząt zbliżają się do stołu. Pomocnik lekarza dezynfekuje miejsce nakłucia na kończynie. W międzyczasie lekarz rozlewa na płytkę 10 dawek antygeny, następnie nakłuwając właściwe miejsce i czerpakiem pobiera kroplę krwi, którą przenosi na płytę i szybko miesza z antygenem. Pomocnik po raz wtóry dezynfekuje miejsce nakłucia, po czym wskazuje odpowiedni numer klatki dla przetrzymania zwierzęcia. Kolejny numer klatki odpowiada kolejnemu numerowi na płycie.

Lekarz poruszając płytą w rękach ruchem wahadłowym odczytuje wyniki badań. W wypadku stwierdzenia reakcji dodatniej, nutria znajdująca się w odpowiedniej klatce zostaje odseparowana w przeznaczoną na ten cel skrzyni. Inne reagujące ujemnie, pozostali pracownicy fermi wpuszczają do budek, z których zostały zabrane. Zużyte igły wyjaławia się formaliną lub gotowaniem.

Po zakończeniu całości badań, prowadzący je lekarz sporządza krótki protokół.

Adres autora: dr Leopold Ugorski, Wrocław 12, ul. Rodakowskiego 6.