

POLA GRAJEWSKA

Wartość diagnostyczna precypitacji w żelu w rozpoznawaniu *Streptococcus agalactiae*

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii, Oddział w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr J. WISNIEWSKI

Niezależnie od wprowadzania do praktyki laboratoryjnej coraz do nowych metod szybkiego diagnozowania paciorkowców (3, 9), podstawowym kryterium identyfikacji paciorkowców hemolizujących pozostaje nadal klasyfikacja serologiczna, oparta na obecności w komórkach tych drobnoustrojów specyficznego wielocukru C.

Wiadomo, że warunkiem uzyskania miarodajnych wyników w tego typu analizach jest stosowanie wysoko wartościowej, specyficznej surowicy precypitującej oraz ekstraktów bogatych w wielocukier.

Znane są trzy podstawowe metody uzyskiwania ekstraktów wielocukrowych (10): a) metoda ekstrakcji kwaśnej wg Lancefield, b) metoda formamidowa Fullera, c) metoda enzymatyczna Maxteda. Wszystkie te metody wymagają dużej wprawy od wykonującego badanie oraz odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego. Pozostaje to w ścisłym związku ze stosunkowo wysokimi kosztami tego rodzaju analiz. Z tych względów rozpoczęto poszukiwania innych, prostszych metod ekstrakcji wielocukru (7, 12).

Niezależnie od tych prób, zainteresowania badaczy objęły również samą technikę wykonania odczynu precypitacji, polegającej od wielu lat na stosowaniu precypitacji w kapilarach. Przeprowadzono mianowicie próby zaadaptowania do omawianych badań techniki dyfuzyjnej w żelu (4, 6, 7, 8).

Ze względu na zachęcające wyniki tych badań oraz fakt, że dotyczyły one w głównej mierze paciorkowców hemolizujących grupy A, postanowiono przebadać jaką wartość diagnostyczną posiadają powyższe metody w przypadku paciorkowców grupy B, stanowiących najczęstszą przyczynę występowania stanów zapalnych gruczołów mlecznych u krów.

Materiał i metody

Badaniami objęto 376 szczepów paciorkowcowych wyizolowanych z mleka 318 krów, u których w oparciu o badania kliniczne wymienia oraz komórkowe mleka wykazano istnienie stanu zapalnego w jednej lub kilku ćwiartkach wymienia. Krowy pochodziły z 16 gospodarstw wielkostadnych województwa bydgoskiego.

Szczepy te zidentyfikowano jako paciorkowce w oparciu o instrukcję diagnostyczną FAO (1). Zmieniono jedynie technikę wykonania CAMP-testu, która wg instrukcji zalecała napełnianie wyciętego w agarze rowka beta-toksynę gronkowcową, co w niniejszej pracy zostało zastąpione przez liniowy wysiew wzorcowego szczepu gronkowcowego, produkującego tego rodzaju toksynę.

Do uzyskania ekstraktów wielocukrowych zastosowano równolegle dwie metody:

- a) metodę kwaśnej ekstrakcji przy pomocy HCl (2),
- b) metodę ekstrakcji termicznej w autoklawie w modyfikacji Küntera (5). Modyfikacja ta polegała na przedłużonym, w stosunku do metody oryginalnej (12), czasie ekstrakcji w 121°C z 15 na 60 minut.

Ekstrakty przygotowywano z 20-godzinnych hodowli paciorkowcowych w bulionie zawierającym 1% glukozy (10 ml). Po odwirowaniu hodowli 3000 obr./min., (10 min.) zlewano bardzo ostrożnie supernatant, a następnie do osadu dodawano 1 ml płynu fizjologicznego (ekstrakcja w autoklawie) lub 1 ml N/20 HCl (ekstrakcja kwaśna). W tym drugim przypadku próby umieszczano w łaźni wodnej (100°C) na 15 min., następnie chłodzono i neutralizowano 1 N NaOH w obecności czerwieni fenolowej. Wszystkie ekstrakty przed użyciem wirowano.

Surowice diagnostyczne dla paciorkowców z grupy B otrzymano z Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego *) oraz częściowo wyprodukowano we własnym zakresie stosując schemat szczepień i kontroli przyjęty przez Pracownię Ziarenkowców PZH w Warszawie. Surowice diagnostyczne dla grup A, C, G pochodziły z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie.

Kontrolne szczepy paciorkowcowe reprezentujące grupy: A, B, C, D, E, G, H i N oraz szczep gronkowca produkującego toksynę beta pochodziły z Pracowni Ziarenkowców PZH.

Precypitację próbówkową w kapilarach wykonywano techniką ogólnie przyjętą w pracowniach bakteriologicznych (10). Precypitację w żelu agarowym (Special-Agar-Noble) przeprowadzono na szkiełkach podstawowych.

Przed przystąpieniem do badań właściwych przeprowadzono badania wstępne. Miały one na celu ustalenie optymalnych warunków wykonywania precypitacji w żelu agarowym.

a) Stężenie agaru. Przygotowano następujące roztwory agaru w 0,9% NaCl: 1%, 1,5%, 2% oraz 2,5%. Badania przeprowadzono stosując wyciągi wielocukrowe z 20 znanych szczepów *Streptococcus agalactiae*. Najbardziej odpowiedni okazał się roztwór 1,5% i był on zastosowany w pracy. Roztwory o mniejszej lub większej koncentracji agaru były trudne do obróbki (uszkodzenie brzegów baseników przy wycinaniu, deformacja linii precypitacyjnych).

b) Układ baseników. Zastosowano trzy różne warianty układu baseników zmieniając ich średnice, jak również odległości między basenikiem centralnym oraz ułożonymi peryferyjnie:

- układ 5 baseników (Φ 2 mm) odległych od basenika centralnego (Φ 2 mm) o 5 mm, (7),
- układ 5 baseników (Φ 5 mm) odległych od basenika centralnego (Φ 5 mm) o 5 mm,
- układ 4 baseników (Φ 3 mm) odległych od basenika centralnego (Φ 3 mm) o 2 mm, (8).

W omawianych warunkach doświadczeń najodpowiedniejszy okazał się układ ostatni i ten zastosowano w pracy.

*) W tym miejscu autorka wyraża podziękowanie za dwukrotną przesyłkę surowicy precypitacyjnej.

Surowicę diagnostyczną umieszczano w basenikach centralnych, wyciągi wielocukrowe w basenikach ułożonych peryferyjnie.

c) Warunki inkubacji (temperatura). Trzy równoległe układy obejmujące 16 wyciągów wielocukrowych oraz surowicę diagnostyczną umieszczono w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, $+18-20^{\circ}\text{C}$ oraz $+37^{\circ}\text{C}$. Najszybsze pojawianie się precypitatu notowano przy stosowaniu temperatury pokojowej, następnie temperatury 37°C . W badaniach właściwych inkubację prób przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytywano po 1, 6, 24 i 48 godzinach.

Wyniki

Zastosowanie w pracy dwóch metod uzyskiwania wyciągu wielocukrowego oraz dwóch technik precypitacyjnych pozwoliło na zidentyfikowanie 217 szczepów paciorkowcowych jako należących do grupy B. Wyniki te uzyskano przy pomocy precypitacji dyfuzyjnej w żelu, podczas gdy precypitacja w kapilarach pozwoliła na wykrycie tylko 198 takich szczepów. Szybkość pojawiania się precypitatu w żelu agarowym była bardzo zróżnicowana. Po 1 godzinie zaobserwowano obecność precypitatu w przypadku 27 prób, po 6 godzinach w następnych 103 próbach, po 24 godzinach z kolejnymi 76 wyciągami oraz po 48 godzinach z 11 wyciągami wielocukrowymi. W wielu przypadkach obserwowano pojawienie się dwóch, a nawet trzech linii precypitacyjnych między basenikami.

Wyniki uzyskane w pracy w oparciu o stosowanie metody przedstawiono w tab. 1. Wskazu-

Tab. 1. Wyniki badań serologicznych (ustalenie grupy) oraz CAMP-testu w diagnozowaniu *Streptococcus agalactiae*

Badanie serologiczne dodatnie (grupa B) *			CAMP-test+	
Technika badania serologicznego	Liczba szczepów	%	liczba szczepów	%
I (antygen „K”, kapilary)	191	100**	180	94,2
II (antygen „A”, kapilary)	198	103,7	187	94,5
III (antygen „K”, żel)	202	105,8	191	94,6
IV (antygen „A”, żel)	217	113,6	206	94,9

Legenda: antygen „K” — wielocukier uzyskany metodą ekstrakcji kwasnej; antygen „A” — wielocukier uzyskany metodą ekstrakcji termicznej (autoklaw).

* Badanie kontrolne wyciągów wielocukrowych z surowicą diagnostyczną dla grup A, C, G dały wynik ujemny.

** Wyniki badania serologicznego przeprowadzonego metodą klasyczną (kwasna ekstrakcja wielocukru, precypitacja w kapilarach) przyjęto za podstawę, do której odnoszono wyniki uzyskane przy pomocy techniki zmodyfikowanej.

ją one, że czułość porównywanych technik badania serologicznego nie jest identyczna. Celem określenia, która ze stosowanych metod jest najlepsza zastosowano dla oceny istotności różnic między liczbami wyrażającymi wyniki dodatnie (tab. 1 — liczba szczepów) test χ^2 dla jednej cechy. Na podstawie wyliczeń można uznać, że najlepszą jest metoda wykorzystująca ekstrakt uzyskany w autoklawie oraz precypitację w żelu ($\chi^2 = 8,94$ przy $\chi^2_{0,05} = 3,84$).

Analiza serologiczna badanego materiału oraz wyniki uzyskane w CAMP-teście wykazały

zgodność dodatnią sięgającą 95% prób (szczepów) co przedstawiono w tab. 1. Szczepy, które w oparciu o test precypitacyjny z surowicą grupowoswoistą uznano za należące do grupy B, a jednocześnie uzyskano z nimi ujemny wynik w CAMP-teście, pochodziły z dwóch obór należących do jednego zespołu PGR. Wszystkie te szczepy nie rozkładały eskuliny oraz wykazywały hemolizę typu beta. Ponowne pobranie mleka i badanie szczepów paciorkowcowych z tych obór przeprowadzone po upływie miesiąca potwierdziło wyniki uzyskane pierwotnie.

Omówienie

Zastosowanie w pracy dwóch metod otrzymywania wyciągów wielocukrowych pozwoliło na uzyskanie wyższej liczby dodatnich wyników badania serologicznego (niezależnie od stosowanej techniki precypitacyjnej) w przypadku wyciągu otrzymywanego drogą ekstrakcji w autoklawie. Ponadto na uwagę zasługuje brak reakcji krzyżowych oraz uzyskiwanie bardziej wyraźnych, łatwiejszych do odczytania wyników przy stosowaniu wyciągów otrzymanych metodą ekstrakcji w autoklawie, jak też prostota wykonania samej ekstrakcji. Uzyskano więc potwierdzenie obserwacji dokonanych przez Rantza i Randall (12), którzy przeprowadzali badania porównawcze trzech wyciągów wielocukrowych (grup A, C, G): uzyskanego po ekstrakcji w autoklawie, ekstrakcji kwasnej oraz ekstrakcji enzymatycznej. Największą czułość wyciągu uzyskanego po ekstrakcji w autoklawie tłumaczyli oni 2—4 krotnie wyższą koncentracją wielocukru w tym preparacie w stosunku do wyciągów uzyskanych innymi metodami. Ilość wielocukru autorzy ci szacowali przy pomocy techniki rozcieńczeń antygeny i precypitacji z surowicą odpornościową. Do odmiennego wniosku doszli Lancaster i Sherris stosując w swych badaniach wyciąg wielocukrowy (głównie grupy A) uzyskany w autoklawie Rantza i Randall, wyciąg po ekstrakcji kwasnej oraz wyciąg Fullera. Według tych autorów wyciąg uzyskany w autoklawie był mniej aktywny niż pozostałe dwa wyciągi wielocukrowe, natomiast zastosowana precypitacja dyfuzyjna pozwoliła z kolei na wykrywanie niższych koncentracji antygeny niż precypitacja w kapilarach. Wyniki uzyskane w pracy przy porównywaniu obu wymienionych technik precypitacyjnych w odniesieniu do wyciągów wielocukrowych specyficznych dla grupy B potwierdzają więc obserwacje innych autorów (4, 7), preferujące technikę precypitacyjną w żelu.

Technika ta posiada również inne zalety. Prawidłowe wykonanie odczynu precypitacji w kapilarach wymaga dużej wprawy oraz około 5-krotnie większej ilości surowicy diagnostycznej niż przy stosowaniu precypitacji w żelu, gdzie na wykonanie czterech oznaczeń zużywa się około 10 μl surowicy. Również odczyty reakcji precypitacyjnych w żelu agarowym są łatwiejsze i następują mniej wątpliwości niż w

przypadku stosowania precypitacji w kapilarach. Pewnym mankamentem techniki dyfuzyjnej w żelu w porównaniu z precypitacją w kapilarach jest dłuższe oczekiwanie na wynik, który można odczytać dopiero po kilku lub kilkunastu godzinach. Pojawienie się w przypadku niektórych prób kilku linii precypitacyjnych między basenikami, obserwowane również przez innych autorów (12), sugerowałoby możliwość użycia wyciągów wielocukrowych uzyskiwanych drogą ekstrakcji w autoklawie również do typowania szczepów paciorkowcowych w obrębie grup. Badania Payne'a i Armstronga mające na celu ustalenie najlepszej metody pozwalającej na wykrycie maksymalnej ilości antygenów grupowo- i typowo-swoistych (dla grupy E) wykazały jednak, że antygeny typowo-swoiste są bardziej labilne od grupowo-swoistych. Autorzy sądzą, że antygen typowo-swoisty usytuowany jest bardziej peryferyjnie, podczas gdy antygen grupowy znajduje się głębiej.

Odrębnym zagadnieniem jest stosunkowo mała zgodność wyników badania serologicznego oraz CAMP-testu. Wiadomo, że CAMP-test może być zawodny w przypadku paciorkowcowych szczepów laboratoryjnych bądź też w sytuacji, gdy analizowane szczepy pochodzą z obór, w których stosowano terapię antybiotykami (13). Badane szczepy były jednak świeżo wyizolowane z mleka, a przeprowadzony wywiad wskazywał, że w okresie ostatnich kilku lat dowymieniowe wprowadzanie antybiotyków stosowano sporadycznie, jedynie w przypadku wystąpienia ostrych form *mastitis*.

Wnio ski

1. Oceniając czułość zastosowanych metod mierzona liczbą uzyskanych wyników dodatnich (grupa B) można przyjąć następującą kolejność:

- a) precypitacja w żelu z wyciągiem uzyskanym w autoklawie,
- b) z wyciągiem kwaśnym,
- c) precypitacja w kapilarach z wyciągiem uzyskanym w autoklawie,
- d) z wyciągiem kwaśnym.

2. Wszystkie szczepy zidentyfikowane jako *Str. agalactiae* w wyniku badań techniką klasyczną (wyciąg kwaśny, precypitacja w kapilarach) uzyskały analogiczną ocenę również w badaniach techniką zmodyfikowaną.

3. Względędy ekonomiczne (mniejsze zużycie surowicy diagnostycznej) oraz praktyczne (łatwiejsza, mniej pracochłonna technika wykonania badań, bardziej wyraźne reakcje ułatwiające interpretację) przemawiają na korzyść stosowania wyciągu uzyskanego metodą termiczną (autoklaw) oraz techniki dyfuzyjnej w żelu.

4. Porównanie analizy serologicznej i CAMP-testu w diagnozowaniu *Str. agalactiae* wykazało zawodność CAMP-testu w około 5% badanych prób.

Piśmiennictwo

1. A laboratory handbook of veterinary diagnostic methods compiled by A. J. Stevens, 1960. (FAO Working Document).
2. Chođkowski A.: Annls Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. DD, 9, 47, 1955.

3. Jasper D. E., Dellinger J. D.: Cornell Vet., 57, 87, 1967.
4. Kunter E.: Zentbl. Bact. I Orig., 183, 190, 1963.
5. Kunter E.: Zentbl. Bact. I Orig., 197, 72, 1965.
6. Krzemiński Z.: Pol. Tyg. Lek., 24, 24, 1969.
7. Lancaster L. J., Sherris J. C.: Am. J. clin. Path., 34, 131, 1969.
8. Müller G.: Arch. exp. Vet. Med., 21, 55, 1967.
9. Murphy J. M., Stuart O. M., Reed F. I.: Cornell Vet., 42, 133, 1952.
10. Pakula R.: Paciorkowce, PZWL, 1958.
11. Payne J. B., Armstrong C. H.: Appl. Microbiol., 19, 818, 1970.
12. Rantz L. A., Randall E.: Stanford med. Bull., 13, 290, 1955.
13. Schönherr W.: Tierärztliche Milchuntersuchung, S. Hirzel Verlag, Leipzig, 1965.

Adres autora: dr Pola Grajewska, Bydgoszcz, ul. Świerczewskiego 35.

Граевска П. — Диагностическая ценность реакции жельпреципитации в диагностике *Streptococcus agalactiae*.

Исследовали 376 штаммов стрептококков выделенных из молока коров. Применили 2 метода экстракции полисахарида (кислотную и термическую в автоклаве по Kunter) и 2 метода преципитации (в капиллярах и в желе из агара). Оптимальные условия для жельпреципитации установили в предварительных испытаниях.

На основании количества идентифицированных штаммов *Str. agalactiae* (гр. B) самым эффективным оказался метод употребляющий термический экстракт и жельпреципитацию. Этим метод был также проще и дешевле других. При сравнении результатов серологического анализа и теста CAMP в диагностике инфекции *Str. agalactiae* установили что тест CAMP дает поздние результаты в ок. 5% исследованных случаев.

Grajewska P. — The diagnostic value of precipitation in gel in determination of *Streptococcus agalactiae*.

The investigations has been carried out with 376 strains of streptococci isolated from milk of cows for serological identification. There were used simultaneously two methods of polysaccharide extraction (acid extraction and thermal extraction in autoclave acc. to Kunter), and two precipitation techniques (gel precipitation and precipitation in capillaries). In preliminary investigations there were established the optimal parameters for precipitation in gel. Taking into consideration the number of identified strains of *Str. agalactiae* (group B+), the most sensitive method proved to be precipitation in gel with the use of polysaccharides extracted in an autoclave. The working conditions were easier and less expensive compared with the classical method (acid extraction and capillary testing). The comparative serological analysis and the results of CAMP-test in typing of *Str. agalactiae* showed the deceptiveness of CAMP-test in about 5.0% of trials (strains).

KOWALCZYK D. F., MAYER G. P.: Stężenie kationów w mięśniach szkieletowych krów zdrowych i krów z porażeniem. (Cation concentration in skeletal muscle of paretic and nonparetic cows). Am. J. vet. Res., 33, 751—757, 1972 (4).

W celu określenia stężenia wapnia, magnezu, potasu i sodu w mięśniach wykonano biopsję mięśnia ścięgnistego u 12 niecielenych krów, 8 krów u których wystąpiło porażenie w czasie porodu i 8 krów u których w czasie porodu nie występowały objawy porażenia. Badania wykazały spadek poziomu wapnia w płazmie krów rodzących. Spadek ten był zaznaczony najsilniej u krów u których występowało porażenie. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic w poziomie magnezu i zawartości suchej masy w mięśniach wszystkich badanych sztuk. W czasie porodu dochodziło również do obniżenia poziomu potasu w badanych próbkach mięśni oraz do statystycznie znamiennego wzrostu poziomu sodu jedynie w mięśniach krów rodzących u których występowało porażenie.

Z.