

IZABELLA GÓRSKA, TERESA KOCIK, BARBARA PORĘBSKA, MARIAN KRÓLAK

Próba zastosowania odczynu wiązania dopełniacza (OWD) w diagnostyce leptospirozy świń

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

Rozwój przemysłowych ferm tuczu trzody chlewnej pociąga za sobą konieczność ścisłego przestrzegania zasad zoohigieny i stosowania surowej kontroli weterynaryjnej. Dlatego z roku na rok zwiększa się ilość badań laboratoryjnych, wykonywanych dla potrzeb hodowli wielkostadnej.

Prowadzone w ramach tego programu badania świń w kierunku leptospirozy polegają na wykrywaniu przeciwciał w surowicy krwi świń testem aglutynacji mikroskopowej (AM). Jest to odczyn czuły i wysoce specyficzny, jednak pracochłonny, gdyż badania muszą być wykonywane z dużym zestawem antygenów.

Wprowadzenie odczynu rodzajowo-swoistego, gdzie jeden antygen wykrywałby w surowicy przeciwciała przeciwko wszystkim serotypom *Leptospira*, znacznie ułatwiłoby i skróciło badania serologiczne. Prace autorów rumuńskich donoszą o istnieniu takiego antygeny (3, 8, 9). Jest to antygen przygotowany ze szczepu *Patoc I*, serotyp *patoc*, należącego do saprofitycznego gatunku *Leptospira biflexa*. Wykrywa on zakażenia wywołane przez różne serotypy *Leptospira*. Odczyn wiązania dopełniacza z tym antygenem stosowany jest w Rumunii jako screening-test w diagnostyce leptospirozy u ludzi.

Celem niniejszej pracy była próba oceny przydatności odczynu wiązania dopełniacza do wykrywania przeciwciał leptospirowych u zwierząt.

W pierwszym etapie pracy postanowiono przebadać w OWD aktywność odpornościowych surowic króliczych wobec siedmiu antygenów, którymi króliki zostały uodpornione.

Celem drugiego etapu była ocena przydatności odczynu wiązania dopełniacza do badania surowic świń pochodzących z ferm, w których stwierdzono kliniczne objawy leptospirozy, a duży odsetek zwierząt reagował dodatnio w aglutynacji mikroskopowej.

1. Szczepy leptospirowe

Użyto następujące szczepy należące do gatunku *Leptospira interrogans*: RGA (serotyp *icterohaemorrhagiae*), Moskwa V (*grippotypyphosa*), M 84 (*sejroe*), *Perepelicin (tarassovi)*, *Pomona (pomona)*, *Hond Utrecht IV (canicola)*. Wymienione szczepy otrzymano z Pracowni Leptospiroz ZHW we Wrocławiu. Ponadto użyto szczep *Patoc I* (serotyp *patoc*), należący do gatunku *Leptospira biflexa*, który otrzymano od dr Nicolesco z Instytutu Cantacucino w Bukareszcie.

2. Antygeny do OWD

Zastosowano 6–10-dniową, żywą hodowlę na podłożu Vervoorta, którą wirowano przez 60 minut przy 3500 obr./min., po czym osad leptospir zawieszano w 1/20 wyjściowej objętości w płynie fizjologicznym z dodatkiem 0,01% mertiolatu. Antygeny mianowano w schemacie szachownicy wobec homologicznej surowicy króliczej według techniki LBCF (10). Za miano robocze przyjmowano to rozcieńczenie, które dawało najwyższe wyniki z surowicą homologiczną. Przykładowy wynik miareczkowania podano w tab. 1. Wyprodukowane antygeny miały następujące miano: *icterohaemorrhagiae* — 1/32, *grippotypyphosa* — 1/16, *sejroe* — 1/64, *tarassovi* — 1/32, *pomona* — 1/16, *canicola* — 1/32, *patoc* — 1/256. Antygeny przechowywano w temperaturze 4°C. W tych warunkach nie obserwowano spadku aktywności antygenów w okresie jednego roku.

3. Królicze surowice odpornościowe

Króliki szczepiono dożylnie żywą hodowlą leptospir. Przeprowadzono pięć szczepień w odstępach trzydniowych, stosując wrastające dawki od 0,2 do 2,0 ml hodowli. Króliki skrwawiano w tydzień po ostatnim szczepieniu. Surowice konserwowano przez dodanie mertiolatu do końcowego stężenia 0,01% lub fenolu do stężenia 0,5%, część surowic zliofilizowano.

Tab. 1. Przykładowy wynik mianowania antygeny leptospirowego z homologiczną króliczą surowicą odpornościową w układzie szachownicy

Rozcieńczenia antygeny <i>canicola</i>	Rozcieńczenia surowicy anty- <i>canicola</i>										
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384
1/4	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
1/8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	—	—	—	—
1/16	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
1/32	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	—	—	—
1/64	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—	—	—
1/128	++++	xxx+	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—
1/256	xxx+	++++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—
1/512	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Objaśnienia: za miano robocze przyjęto 1/32, +, +, +, +, —, oznacza odpowiednio 100, 75, 50, 25 i 0% zahamowania hemolizy, K — kontrola antykomplementarnych własności surowicy.

Miana surowic w AM ze szczepieniami homologicznymi wahały się od 1/400 do 1/6400.

4. Surowice świńskie

Zbadano 471 surowic świńskich pochodzących z sześciu różnych ferm. W fermach tych stwierdzono kliniczne objawy leptospirozy, a większość zwierząt reagowała dodatnio w AM z serotypem *tarassovi* w mianach od 1/100 do 1/51.200. Na fermie M. z poronionego płodu izolowano serotyp *tarassovi*. Izolacji dokonano nie w posiewie bezpośrednim na podłoże Vervoorta, lecz w pasażu przez świnkę morską.

5. Odczyn wiązania dopełniacza (OWD)

OWD wykonano ściśle według techniki LBCF (10). Stosowano dopełniacz w ilości 5C'H₅₀. Inkubację pierwszej fazy przeprowadzano przez 18 godz. w temperaturze 4°C, inkubację drugiej fazy w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 min.

6. Aglutynacja mikroskopowa (AM)

AM wykonywano zgodnie z instrukcją o laboratoryjnym rozpoznawaniu leptospirozy (1).

Wyniki

1. OWD z króliczymi surowicami odpornościowymi

We wstępnej części pracy przebadano aktywność siedmiu antygenów leptospirowych wobec odpornościowych surowic króliczych. Sześć antygenów przygo-

camy świńskimi poza jedną sztuką, u której wykryto w OWD przeciwciała antypatoc w rozcieńczeniu 1/5.

Nie stwierdzono ściślej zależności pomiędzy poziomem przeciwciał wykrywalnych w OWD i w AM (tab. 4). Można jedynie stwierdzić, że surowice reagujące w OWD miały zazwyczaj wysoki poziom aglutynin — spośród 50 surowic reagujących dodatnio w OWD, 42 wykazywały miana w AM powyżej poziomu 1/400. Nie było to jednak regułą, gdyż u trzech surowic dodatnich w OWD nie stwierdzono aglutynin przy użyciu AM.

Omówienie

Do wykrywania przeciwciał leptospirowych w badanych surowicach zastosowano technikę OWD zalecaną przez autorów amerykańskich (10), która uznawana jest obecnie za najbardziej czułą ze stosowanych wariantów.

Uzyskane przez nas wyniki badania odpornościowych surowic króliczych odczynem wiązania dopełniacza są zgodne z danymi Nicolesco i Lelutiu (4) oraz Sturdzy i Eliana (9). Po-

Tab. 2. Krzyżowe reakcje siedmiu antygenów leptospirowych z odpornościowymi surowicami króliczymi w OWD

Surowice		Antygeny						
przeciwno serotypowi	miano homolog. w AM	icterohaemor.	grippotyphosa	sejroe	tarassovi	pomona	canicola	patoc
ictero.	1/6400	2560 *)	160	40	40	160	80	40
grippto.	1/6400	160	1280	80	40	160	160	40
sejroe	1/400	40	160	320	40	80	80	20
tarassovi	1/3200	80	160	40	640	80	80	40
pomona	1/800	80	320	80	40	320	160	40
canicola	1/6400	80	160	40	20	80	640	20
patoc	1/400	20	40	10	10	20	20	320

Objaśnienie: *) odwrotność miana — średnia z trzech pomiarów.

towno ze szczepów stosowanych do rutynowych badań serologicznych świń przy użyciu AM, a siódmy z saprofitycznego szczepu *Patoc I*. OWD wykonano z poszczególnymi antygenami wobec surowic homologicznych i heterologicznych. Uzyskane wyniki (tab. 2) wykazują, że odpornościowe surowice królicze posiadały wysokie miana z antygenami homologicznymi (od 1/320 do 1/2560), a także dały wiele reakcji krzyżowych z pozostałymi antygenami. Nie tylko *Patoc I*, ale i wszystkie pozostałe antygeny reagowały ze wszystkimi surowicami odpornościowymi. Najwyższe reakcje heterologiczne dawał antygen *grippotyphosa*. Przedstawione w tab. 2 reakcje należy uznać za swoiste, gdyż antygeny nie reagowały z pięcioma kontrolnymi surowicami króliczymi, które pochodziły od zwierząt nieszczepionych.

2. OWD z surowicami świńskimi

Do badania wybrano surowice świńskie z ferm dotkniętych leptospirozą, w których zdecydowanie dominował serotyp *tarassovi*. Jest to serotyp najbardziej rozprzestrzeniony w północnym rejonie kraju i dlatego uznano za celowe prowadzenie badań w fermach zakażonych właśnie tym serotypem. OWD wykonano z antygenem *tarassovi*, tj. dającym najwyższe miana w aglutynacji mikroskopowej oraz z antygenem *patoc*, który jest stosowany w Rumunii w OWD jako antygen rodzajowo-swoisty. Ilość surowic dodatnich w AM i w OWD w poszczególnych fermach przedstawiona została w tab. 3. Z przebadanych 471 surowic świń 343 (72,8%) reagowało w AM z antygenem *tarassovi* w mianach od 1/100 do 1/51.200, a w odczynie wiązania dopełniacza z tym samym antygenem reagowało tylko 50 surowic (10,6%) w mianach od 1/5 do 1/80. Antygen *patoc* nie reagował w OWD z surowi-

dobnie jak w niniejszej pracy, cytowani autorzy również otrzymywali wysokie miana (do 1/512) z antygenami homologicznymi oraz pozytywne reakcje z antygenem *patoc*. Również Ris (7) otrzymywał dodatnie wyniki w OWD z surowicami odpornościowymi, jednak wyniki te uważał za nieswoiste, gdyż dodatnie reakcje stwierdził także u królików nieuodpornionych. W pracy naszej oraz badaczy rumuńskich (4, 9) kontrolne surowice od zwierząt nieszczepionych reagowały ujemnie, co świadczy o swoistości uzyskanych wyników.

Tab. 3. Wyniki badań w AM i w OWD surowic świńskich z antygenem *tarassovi* w sześciu fermach

Ferma	Liczba zwierząt badanych	Liczba zwierząt reagujących dodatnio	
		w AM	w OWD
P.	18	18 (100)	3 (16,7)
Pr.	128	126 (98,4)	2 (1,5)
M.	71	50 (70,4)	16 (22,5)
N.	15	15 (100)	3 (20)
Nd.	21	9 (42,9)	1 (4,8)
Ł.	218	125 (57,3)	25 (11,5)
Razem	471	343 (72,8)	50 (10,6)

Objaśnienie: w nawiasach podano procent w stosunku do liczby zwierząt badanych na danej fermie.

Pozytywne wyniki uzyskane z surowicami uodpornionych królików nie znalazły potwierdzenia w badaniach zwierząt gospodarskich. Surowice świń okazały się w OWD znacznie mniej aktywne niż surowice królicze. Odczyn wiązania dopełniacza wykonany z antygenem homologicznym *tarassovi* dał wyniki dodatnie tylko u 10,6% świń, pomimo że w AM reagowało aż 72,8% surowic. Antygen *patoc* nie dawał praktycznie żadnych reakcji z wyżej wymienionymi surowicami w OWD.

wica pobierana jest od tych zwierząt wkrótce po zakończeniu podawania antygeny, a więc przeciwciała czynne w OWD występują jeszcze w dużej ilości.

Podsumowując przedstawione wyniki oraz dane zebrane z piśmiennictwa wydaje się, że odczyn wiązania dopełniacza nie może na razie znaleźć szerszego zastosowania do wykrywania przeciwciał leptospirowych u zwierząt gospodarskich i nie może zastąpić w tym względzie obowiązującej aglutynacji mikrosko-

Tab. 4. Współzależność między poziomem przeciwciał *anti-tarassovi* wykrywalnych w AM i OWD w 50 surowicach świńskich reagujących dodatnio w OWD

Miano w OWD	Miano w aglutynacji mikroskopowej (AM)											
	Ujemne	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800	25 600	51 200	Razem
1/5	2*	1	1	—	—	4	6	1	—	—	—	15
1/10	1	—	2	1	1	5	5	2	1	—	—	18
1/20	—	—	1	—	1	1	3	4	1	1	1	13
1/40	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	—	3
1/80	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Razem	3	1	5	1	2	10	14	8	4	1	1	50

Objaśnienie: *) ilość reagujących surowic.

Również Nicolesco (2) w badaniach zwierząt gospodarskich uzyskiwała niski procent zgodności pomiędzy AM i OWD, zarówno gdy w OWD stosowała jako antygen serotyp dający najwyższe miano w AM, jak również przy użyciu antygeny *patoc* lub mieszaniny antygenów. Podobne wyniki otrzymali Nicolesco i Lelutiu (4). Badali oni metodą OWD surowice różnych zwierząt reagujących dodatnio w AM i uzyskiwali w OWD tylko 37% reakcji pozytywnych u świń, 82% u bydła, 19% u koni i 76% u psów. Antygen *patoc*, zarówno w naszych badaniach, jak i w pracach innych autorów (2, 4, 6), nie potwierdził swej przydatności do wykrywania infekcji leptospirowych u zwierząt.

Niepowodzenia w zastosowaniu odczynu wiązania dopełniacza do wykrywania leptospirozy u zwierząt można zapewne tłumaczyć krótką trwałością przeciwciał aktywnych w OWD. Jak wynika z badań Nicolesco i Moldovana (5) przeprowadzonych na świnich, u których znany był moment zakażenia, poziom przeciwciał wiążących dopełniacz spada znacznie szybciej niż poziom aglutynin. Również u ludzi obserwowano analogiczne zjawisko (8). Dlatego odczyn wiązania dopełniacza nadaje się do wykrywania leptospirozy u ludzi, gdzie badanie serologiczne wykonywane jest na ogół wkrótce po wystąpieniu objawów klinicznych, natomiast zawodzi u zwierząt, gdyż badane są sztuki, które znajdują się w różnych stadiach choroby, bądź też są już ozdrowieńcami i przeciwciała wiążące dopełniacz występują tylko u nielicznych osobników. W tym świetle zrozumiałe jest uzyskiwanie z reguły dodatnich wyników u uodpornianych królików, gdyż surow-

powej. Natomiast przypuszczalnie mógłby znaleźć zastosowanie jako odczyn umożliwiający rozróżnienie zakażeń świeżych od dawno przebytych.

Wnioski

1. Królicze surowice odpornościowe reagowały w wysokich mianach z antygenem homologicznym oraz dawały reakcje krzyżowe zarówno z antygenem *patoc*, jak i z innymi antygenami.

2. Tylko 10,6% badanych surowic świńskich reagowało dodatnio w odczynie wiązania dopełniacza przy użyciu antygeny *tarassovi*, mimo że znaczna ich większość (72,8%) była dodatnia w aglutynacji mikroskopowej z tym samym antygenem.

3. Serotyp *patoc* okazał się nieprzydatny jako antygen rodzajowo-swoisty do wykrywania leptospirozy u zwierząt przy użyciu OWD.

Piśmiennictwo

1. Instrukcja nr 35 Min. Rol. — Dep. Wet. z dnia 25 maja 1974 r. w sprawie laboratoryjnego rozpoznawania leptospirozy u zwierząt.
2. Nicolesco M.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 26, 761, 1967.
3. Nicolesco M., Borsat L.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 31, 209, 1972.
4. Nicolesco M., Lelutiu C.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 26, 557, 1967.
5. Nicolesco M., Moldovan G.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 31, 69, 1972.
6. Palit A., Sharma G. L.: Br. vet. J. 127, 154, 1971.
7. Ris D. R.: N. Z. vet. J. 23, 164, 1975.
8. Sturdza N., Elian M., Tulpan G.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 19, 572, 1960.
9. Sturdza N., Elian M.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 20, 33, 1961.
10. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. US Public Health Monograph. No 74, 1965.

Adres autora: mgr Izabella Górńska, ul. Mickiewicza 18/1, 61-832 Sopot.

Гурская И., Коцик Т., Лорембская Б., Круляк М. — **Попытка применения реакции связывания комплемента (РСК) в диагностике лептоспироза свиней.**

Исследовали пригодность реакции связывания комплемента (РСК) для обнаруживания лептоспирозных противотел в кроличьих иммуносыворотках и в сыворотках свиней, происходящих из шести промышленных, инфицированных лептоспирозом.

Антигены для РСК приготовили из шести серотипов, используемых рутинным образом в исследованиях свиней методом микроскопической агглютинации (МА), а также из штамма Patoc I, применяемого в Румынии в качестве родо-специфического антигена для РСК в обнаруживании лептоспироза людей. Все кроличьи сыворотки положительно реагировали в РСК в титрах от 1/20 до 1/2560 как с гомологическими, так и с гетерологическими антигенами. Гомологические титры были в каждом случае выше гетерологических. По родовой специфичности антиген Patoc I не отличался от остальных шести антигенов из вида *L. interrogans* (таб. 2). Из исследованных 471 свиных сывороток 343 (72,8%) реагировали положительно в МА, часто в высоких титрах, а лишь 50 (10,2%) реагировало по-

ложительно в РСК (таб. 3 и 4). Антиген Patoc I не подтвердил своей пригодности как родо-специфический антиген в РСК со свиными сыворотками.

Górska I., Kocik T., Porębska B., Królak M. — **Studies on the use of complement fixation test (CFT) in the diagnosis of swine leptospirosis.**

The use of CFT in detection of leptospiral antibody in rabbit immune sera and pig sera, taken from six commercial herds infected with leptospirosis, was evaluated. The antigens for CFT were prepared from six serotypes used in routine examinations by means of microscopic agglutination (MA) and also from a strain Patoc I which has been used as genus specific antigen in CFT of leptospirosis in human beings. All immune sera from rabbits reacted with homologous and heterologous antigens in CFT (titers: from 20 to 2560). The antigen Patoc I did not differ from other six antigens in respect to genus-specificity. Out of 471 sera under study 343 (72,8%) were positive in MA, often in high titers, while only 50 (10,2%) were positive in CFT. The Patoc I antigen failed to show any genus-specificity in CFT with swine sera.

PATOLOGIA I TERAPIA

STANISŁAW KOPER, MAREK MUCHA

Diagnostyka radiologiczna schorzeń narządów klatki piersiowej u krów

Z Zakładu Radiologii Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Rozpoznawanie schorzeń narządów klatki piersiowej u zwierząt opiera się głównie na badaniu klinicznym uzupełnionym badaniami laboratoryjnymi i metodami wyspecjalizowanymi. W dostępnym piśmiennictwie spotyka się niewiele doniesień omawiających badania radiologiczne klatki piersiowej krów i ich wartość diagnostyczną, zwłaszcza w odniesieniu do schorzeń płuc, serca i przełyku (2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 21, 22). Choroby tych narządów u krów są niejednokrotnie wyłączną przyczyną występowania objawów niestrawności (5, 9, 10, 12).

Dostępna w kraju aparatura rentgenowska, będąca w chwili obecnej na wyposażeniu wielu lecznic terenowych, upoważnia do przedstawienia własnych doświadczeń, które są rozwinięciem wcześniejszej publikacji (13).

Materiał i metody

Badaniami objęto 269 krów z objawami niestrawności, podejrzanych o urazowe zapalenie czepca i otrzewnej, które kierowane były do Zakładu Radiologii celem stwierdzenia lub wykluczenia obecności ciał obcych w czepcu. Badanie radiologiczne, stosownie do opisanego przez nas modelu postępowania, uwzględnia również rentgenografię tylnej części klatki piersiowej (13). Zdjęcia wykonywano na błonach ogólnodiagnostycznych o wymiarach 30×40 z użyciem

gruboziarnistych lub uniwersalnych folii wzmacniających. Promień środkowy kierowano od strony lewej klatki piersiowej, tuż za linią łokciową w punkt krzyżujący linię poziomą, wyprowadzoną ku tyłowi od strony stawu barkowego. Celem lepszego wykorzystania naturalnego radiologicznego kontrastu tej okolicy, przed wykonaniem zdjęcia lewą przednią kończynę zwierzęcia wysuwano lekko do pozycji wykroczonej. Pole naświetlenia o kształcie prostokąta wynosiło 18×22 cm, a jego krótszy bok był równoległy do linii wyznaczonej granicą mostka. Kasetę na linii rzutu wiązki promieniowania umieszczano po stronie prawej klatki piersiowej. Ekspozycję wykonywano w momencie wdechu zwierzęcia, stosując wartości zalecane przez Muchę (16). W przypadku braku zaczerwienienia kliszy (z powodu rozległych zmian zapalnych w płucach) pole naświetlenia przesuwno w kierunku grzbietowym, równając krótszy bok kasety z linią kręgosłupa piersiowego.

Wyniki

A. Prawidłowy obraz tylnej części klatki piersiowej bydła.

Uwidoczniona na zdjęciu rtg część klatki piersiowej krów zdrowych obejmuje tylne pole płucne, w którym spostrzega się kopułę przepony oraz część sylwetki serca, a której dość ostrokonturowany zarys tylny pochodzi od lewej komory. Zarys ten wraz z cieniem przepony tworzy tzw. kął przeponowo-sercowy, który