

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL, VIII, 20.

SECTIO DD

1953

Z Katedry Epizootologii Wydziału Wet. U. M. C. S.
Kierownik: Prof. dr Stanisław Krauss

Stefan STĘPKOWSKI i Adolf KOŚLAK

**Badania nad aglutynacją probówkową, szkiełkową
i odczynem precypitacyjnym przy pulorozie**

Исследования над агглютинацией в пробирках, на стек-
лянных пластинках, а также над преципитационной
реакцией при пуллорозе

**Studies on the test-tube agglutination, plate agglutination
and the precipitation reaction in pullorosis**

Przy laboratoryjnym badaniu krwi ptaków na nosicielstwo *S. pullorum* (*S. gallinarum*) wykorzystuje się najczęściej jeden z odczynów zlepných a mianowicie aglutynację probówkową lub aglutynację płytową (szkiełkową).

Ostatnia z wymienionych prób znajduje wielu zwolenników a to ze względu na oszczędność czasu i środków, zużywanych przy jej wykonywaniu i ponieważ próba ta pozwala uzyskać wyniki szybciej niż aglutynacja probówkowa.

Z punktu widzenia przydatności próby dla masowych badań diagnostycznych ważnym jest również zagadnienie czułości i swoistości aglutynacji płytowej, co było przedmiotem ogłoszonych niedawno badań Wiśniewskiego (1953). W oparciu o wyniki uzyskane z 4171 próbkami surowic autor wyraził pogląd, że aglutynacja płytowa pod względem czułości przewyższać ma aglutynację probówkową oraz że jest to próba zupełnie swoista. Ze względu jednak na to, że autor używał w badaniach 2 różnych antygenów (do aglutynacji płytowej antygen ze szczepu *S. gallinarum* Nr 294, barwiony tetrazolem, do aglutynacji probówkowej antygen z 5 innych

szczepów wyizolowanych od padłych z objawami tyfusu kur) ten pogląd Wiśniowskiego wymagał potwierdzenia.

Pragnąc uzyskać bardziej pewne podstawy dla porównawczej oceny wartości aglutynacji płytowej w stosunku do aglutynacji próbówkowej przeprowadziliśmy badania używając do obu odczynów tego samego antygeny, sporządzonego ze szczepu *S. gallinarum* Nr 294. Szczep ten pochodzenia węgierskiego cechować mają szczególnie silne własności zlepne (Nawrocki, 1953).

Dla dokładniejszej kontroli wyników włączyliśmy do badań odczyn precypitacyjny z endotoksyną Boivin. Odczyn precypitacyjny próbowano już wcześniej wykorzystać dla diagnozowania niektórych zakażeń powodowanych przez salmonelle. I tak Tulasne i Kuhlmann (1939) oraz Zabłocki (1949) wykazali przydatność tej próby dla rozpoznawania zakażeń durowych u ludzi, zaś Mikulaszek i Ratomski przy zakażeniach *S. abortus equi* u koni. Odnośnie pulerozy jedynie Biester i Devries oraz Curasson wzmiankują o możliwości wykrywania nosicieli zarazka za pomocą próby precypitacyjnej.

Technika badań

Do badań wykorzystano surowice od ptaków, nadsyłane z terenu woj. lubelskiego w 1–2 dni po pobraniu. Badania wykonywano z surowicami nieinaktywowanymi natychmiast po ich otrzymaniu. Jak podano wyżej do obu odczynów zlepnych użyto jednego antygeny, sporządzonego ze szczepu *S. gallinarum* Nr 294 i zawierającego 1% zieleni brylantowej (antygen standartowy Wydziału Rozpoznawczego PIW do aglutynacji płytowej). Odczyn precypitacyjny wykonywano z endotoksyną Boivin, uzyskaną również ze szczepu *S. gallinarum* Nr 294.

Aglutynację próbówkową nastawiano z każdą surowicą w rozcieńczeniu 1/25, w ten sposób, że 0,05 ml surowicy mieszano z 1,2 ml odpowiednio rozcieńczonego antygeny. Z kolei próby wstawiano do cieplarki (37° C) na przeciąg 6 godzin. Po tym czasie odczytywano wynik po raz pierwszy a następnie po upływie dalszych 12 godzin przebywania prób w temperaturze pokojowej dokonywano odczytu powtórnego. Zgodnie z instrukcją Wydziału Rozpoznawczego PIW za dodatnie uważano surowice wykazujące aglutynację przy pełnym przejaśnieniu płynu. Obecność aglutynacji przy braku całko-

witego przejaśnienia płynu traktowano jako odczyn wątpliwy, brak aglutynacji i przejaśnienia płynu jako odczyn ujemny.

Do aglutynacji płytowej używano płyt szklanych z wydrążeniami, do których wprowadzono 0,025 ml surowicy a następnie dodawano 0,03 ml antygeny. Po zmieszaniu cieczy wynik odczytywano w czasie 3 minut. Za dodatnie uważano wszystkie próby, w których wystąpiły w tym czasie mniej lub bardziej wyraźne grudki (aglutynacja grubo-, średnio- i drobno ziarnista). W próbach ujemnych antygen pozostawał w homogennej zawieszynie.

Odczyn precypitacyjny wykonywano w probówkach z pipet pastеровских o średnicy wewnętrznej około 6 mm, spiczasto zakończonych. Na dno probówki wlewano najpierw 0,2 ml nierozcieńczonej surowicy, którą następnie ostrożnie nawarstwiano rozcieńczoną endotoksyną. Wynik odczytywano po 10–15 minutach przebywania prób w cieplarni. W przypadkach dodatnich na granicy płynów występował szaro-biały pierścień. grubości do 2–3 mm. Do odczynu używano endotoksyny w rozcieńczeniu 1/2,5 (rozcieńczenie dające najwyraźniejszy pierścień przy miareczkowaniu endotoksyny).

Wyniki badań nad aglutynacją probówkową i płytową

Do porównawczych badań nad aglutynacją probówkową i płytową użyto ogółem 3365 surowic od drobiu. Cyfrowe wyniki badań zestawia tablica Nr 1.

Tablica Nr 1

Agglutynacja płytowa		Agglutynacja probówkowa			Agglutynacja płytowa dodatnia	Agglutynacja probówkowa dodatnia
do-datnia	ujemna	do-datnia	wąt-pliwa	ujemna	Agglutynacja probówkowa ujemna	Agglutynacja płytowa ujemna
403	2962	381		2984	32	10
		332	49			

Z uwagi na to, że instrukcja Wydziału Rozpoznawczego PIW w aglutynacji płytowej nawet słabe odczyny (aglutynacja drobno-

ziarnista) zaleca uznać jako dodatnie per analogiam odczyny wątpliwe w aglutynacji próbówkowej, podobnie jak Wiśniowski włączono również do dodatnich.

Przy takim założeniu stosunek aglutynacji płytowej do aglutynacji próbówkowej przedstawiał się następująco:

Wyników zgodnych	98,76%
Wyników niezgodnych	1,24%
dodatniej aglutynacji płytowej przy	
ujemnej aglutynacji próbówkowej	0,95%
dodatniej aglutynacji próbówkowej	
przy ujemnej aglutynacji płytowej	0,29%

Z przytoczonych cyfr wynika wyraźna przewaga pod względem czułości aglutynacji płytowej (przy pomocy której wykryto 5,4% więcej pozytywnie reagujących surowic) nad aglutynacją próbówkową. Uzyskane przez nas rezultaty wykazują dużą zbieżność z badaniami Wiśniowskiego (tablica Nr 2).

Tablica Nr 2

Zgodność aglutynacji próbówkowej i płytowej		Niezgodność aglutynacji płytowej i próbówkowej			
		Aglutynacja płytowa dodatnia		Aglutynacja próbówkowa dodatnia	
		Aglutynacja próbówka ujemna		Aglutynacja płytowa ujemna	
badania własne	badania Wiśniowskiego	badania własne	badania Wiśniowskiego	badania własne	badania Wiśniowskiego
98,76%	98,87%	0,95%	1,03%	0,29%	0,09%

Wyniki badań nad odczynem precypitacyjnym

Do badań nad odczynem precypitacyjnym użyto 250 surowic, reagujących w obu lub przynajmniej w jednym z odczynów aglutynacyjnych (próbówkowym lub płytowym) dodatnio oraz 250 surowic, które w odczynach tych nie reagowały.

Wszystkie surowice aglutynujące ujemnie wykazały również ujemny wynik odczynu precypitacyjnego, co należy uznać za do-

wód swoistości odczynu z użytą przez nas endotoksyną Boivin. Surowice uznane za dodatnie w poszczególnych odczynach wykazały różną ilość reakcji pozytywnych (tablica Nr 3).

Tablica Nr 3

Ogólna ilość surowic dodatnich	R e a k c j e p o z y t y w n e					
	Aglutynacja płytowa		Aglutynacja probówkowa		Precypitacja	
	ilość	‰	ilość	‰	ilość	‰
250	245	98	241	96	248	99,2

Przy założeniu jednakowej swoistości poszczególnych odczynów za najbardziej czuły przyjąć należy odczyn precypitacyjny, przy pomocy którego wykrywa się największy odsetek prób dodatnich. Odczyn ten pod względem nasilenia reakcji pokrywał się naogół z aglutynacją probówkową, przy czym każda z surowic reagujących dodatnio w aglutynacji probówkowej wykazała dodatni również wynik odczynu precypitacyjnego.

Korelacja w nasileniu aglutynacji płytowej i precypitacji była o wiele słabiej zaznaczona. W tym wypadku obserwowano silne odczyny aglutynacyjne przy słabej reakcji precypitacyjnej i odwrotnie. Ponadto 2 surowice (0,4% ogólnej ilości) o aglutynacji płytowej dodatniej reagowały negatywnie zarówno w aglutynacji probówkowej jak też w odczynie precypitacyjnym, co należy uznać za przejaw »nadmiernej czułości« aglutynacji płytowej.

Dyskusja

W związku z próbą wprowadzenia przez WZHW aglutynacji płytowej do diagnostyki pulerozy stało się aktualnym zagadnienie czułości i swoistości tego odczynu. Ażeby uzyskać możliwość porównania tej próby w stosunku do aglutynacji probówkowej przeprowadzono badania przy użyciu tego samego antygeny na 3365 surowicach od drobiu. Rezultaty badań potwierdziły w zasadzie pogląd, wyrażony przez Wiśniewskiego, według którego aglutynacja płytowa przewyższa pod względem czułości aglutynację probówkową, wykrywając większą ilość reakcji dodatnich.

Przeprowadzone z odczynem precypitacyjnym na 500 surowicach próby kontrolne wskazują na pewną nieswoistość aglutynacji płytowej. Przemawia za tym brak bardziej zaznaczonej korelacji pomiędzy nasileniem tego odczynu w porównaniu do aglutynacji próbówkowej i precypitacji a także fakt, że 0,4% surowic dodatkowych w aglutynacji płytowej reagowało ujemnie zarówno w aglutynacji próbówkowej jak też w odczynie precypitacyjnym («nadmierna czułość» aglutynacji płytowej). Jednak tak nieznaczny odsetek reakcji niespecyficznych w zasadzie nie zmienia wartości próby ze względu na jej inne walory.

Należy podkreślić całkowitą swoistość i wysoką czułość odczynu precypitacyjnego z endotoksyną Boivin. Odczyn ten mało praktyczny dla masowych badań rozpoznawczych przy pulerozie może mieć rozstrzygające znaczenie w badaniach kontrolnych.

Wnioski

- 1) Aglutynacja płytowa pod względem czułości przewyższa wyraźnie aglutynację próbówkową.
- 2) Aglutynacja płytowa wykazuje pewne cechy nieswoistości wyrażające się w wykrywaniu nieco większej ilości (0,4%) przypadków pozytywnych w porównaniu do aglutynacji płytowej i precypitacji.
- 3) Odczyn precypitacyjny z endotoksyną Boivin jest próbą swoistą i bardziej czułą od aglutynacji płytowej i aglutynacji próbówkowej.

P I S M I E N N I C T W O

1. Biester H. E., Devries L.: Diseases of Poultry. Iowa 1945.
2. Gurasson G.: Maladies infectieuses des animaux domestiques, T. I., Paris, 1946.
3. Mikulaszek E., Ratomski A.: Med. Wet., 1945, nr 3-4.
4. Mikulaszek E., Walecki H.: Med. Dośw. i Mikrob., 1949, I.
5. Nawrocki J.: Med. Wet., 1953, Nr 2.
6. Swincow P. M., Uszakow A. A.: Boliezni ptic. Moskwa, 1951.
7. Tulasne R., Kuhlman A.: Rev. d. Immunol., 1939, 5.
8. Wiśniowski J.: Med. Wet., 1953, Nr 3.
9. Zabłocki B.: Med. Dośw. i Społ. 1939, 3-4.
10. Zabłocki B.: Med. Dośw. i Mikrob. 1949, 1.

Р Е З Ю М Е

С сравнительной точки зрения авторами были исследованы агглютинации в пробирках на стеклянных пластинках, а также преципитационная реакция при пуллорозе. Для агглютинационных реакций была использована взвесь штамма *Salmonella gallinarum* № 294, полученного из Венгрии, обладающего развитой в значительной степени способностью склеиваться. Для преципитационной реакции был употреблен эндотоксин Boivin заготовленный из выше упомянутого штамма.

Наиболее чувствительной оказалась преципитационная реакция. По отношению к количеству положительных результатов эта реакция больше всего сближалась к агглютинации на стеклянных пластинках, по отношению же к интенсивности реакции — к агглютинации в пробирках.

Из агглютинационных реакций агглютинация получаемая на стеклянных пластинках обладает большей чувствительностью, чем агглютинация получаемая в пробирках. При ее помощи на общее число 3.365 проб, использованных для исследований, обнаружено около 5,4% больше положительно реагирующих сывороток, чем при агглютинации получаемой в пробирках.

S U M M A R Y

The authors conducted studies on the test-tube agglutination, the plate agglutination (rapid) and the precipitation reaction in pul-
lorosis. In the agglutination test the highly agglutinable strain *Salmonella gallinarum* Nr 294 obtained from Hungary was used; the Boivin's endotoxin prepared from the same strain was employed in the precipitation test.

The precipitation test proved to be the most sensitive. This test proved closely to the plate agglutination test as regards the number of positive results and as regards to the intensity of the reaction-to the test-tube agglutination test.

The plate agglutination test was the more sensitive test among the agglutination tests. Using this reaction in a total number of 3.365 examined samples there were about 5,4% per cent more positive reacting sera, than in the test tube agglutination test.