

Podobną chorobę opisał swego czasu Plehn M. pod nazwą „zwyrodnienie lipidowe wątroby”, podając jako przyczynę niewłaściwe skarmianie ryb.

Z przeprowadzonych badań okazało się, że otrzymanym w sposób jałowy przesączem przez świecę Berkefelda N. udało się zakazić dostrzewnowo szereg pstrągów. Opierając się na przypuszczeniu, iż ryby zakażają się najprawdopodobniej doustnie, starano się uzyskać zakażenie, wprowadzając zdrowym osobnikom dożołądkowo rozciartą wątrobę, lub nerkę. Próby te wypadły dodatnio. W obu przypadkach objawy i przebieg choroby były identyczne z objawami chorobowymi zaobserwowanymi w warunkach naturalnych. Spośród zakażonych pstrągów część przechorowała, a u pewnej ilości nie wystąpiły żadne objawy. Należy więc przyjąć za prawdopodobne, że wśród danego pogłowia część osobników odznaczała się większą odpornością. Przebieg choroby ryb w stawie jest długotrwały i u poszczególnych osobników różny. W opisanym przypadku choroba o niewiele zmniejszającym się natężeniu obserwowana była przez półtora roku bez przerwy. Przyjmując za podstawę wyniki otrzymane z doświadczeń nad zakażeniem sztucznym okazało się, że okres od chwili zakażenia do śmierci wynosił 9—46 dni. Pierwsze wyraźne objawy (ścienienie skóry) zauważano najwcześniej po 5—6 dniach. Na podstawie tych danych sądzić można, że schorzenie to przebiega podostro lub przewlekłe.

Z obserwacji poczynionych w czasie trwania choroby stwierdzono, że rozprzestrzenianiu się jej sprzyja nagromadzenie się zarazka w padłych rybach. W związku z tym polecono jako środki mające na celu opanowanie i zwalczanie choroby, aseptykę i izolację ryb zdrowych od źródła zarazka. Czynności zapobiegawcze polegały na jak najszybszym spuszczeniu stawu, oczyszczeniu dna z trupów i odkażeniu wapnem palonym, podzieleniu ryb na osobniki zdrowe, podejrzane o chorobę i chore, na wydzieleniu z gospodarstwa pstrągowego ryb chorych i na ścisłej izolacji zdrowych od podejrzanych oraz na stałym odlawianiu ryb chorych w celu niedopuszczenia do gromadzenia się trupów stanowiących zbiornik zarazka. Dość skrupulatnie wykonywane powyższe zabiegi pozwoliły całkowicie opanować schorzenie, dając spadek śnięcia z 11% w kwietniu na 0,2% w grudniu. W miesiącach i latach następnych żadnego wypadku choroby nie stwierdzono.

Jednocześnie wbrew poprzednim poglądom wykazano, iż pokarm tak pod względem ilościowym jak i jakościowym nie ma żadnego wpływu na powstawanie oraz przebieg procesu chorobowego.

Poza tym stwierdzono, że pora roku jak też i normalne wahania temperatury w rocznym okresie nie mogą być brane pod uwagę, jako czynnik mający wpływ na przebieg choroby. Jedynie bardzo wysokie podniesienie się temperatury powodujące pogorszenie się warunków tlenowych w wodzie,

wpływa jak zwykle w takich wypadkach niekorzystnie, przyspieszając śmierć chorych.

Wysuwana hipoteza zwyrodnienia pogłowia jako przyczyny choroby zdaje się nie mieć racji bytu. Możliwe natomiast jest, że może ona być czynnikiem powodującym zmniejszenie odporności w stosunku do zarazka.

Opierając się na opisanych zmianach anatomo- i histopatologicznych, na wyniku badań bakteriologicznych i przebiegu choroby występującej w warunkach naturalnego i sztucznego zakażenia, uznaliśmy za najbardziej słuszną nadać nazwę dla tej choroby „anemia zaraźliwa pstrągów” (*Anemia infectiosa truttae*).

R é s u m é

L'auteur observa dans une ferme de truites en Podhale (région des Monts Tatry) une maladie de truites, variation arc en ciel et variation russeau. Cette maladie se manifestait sous forme d'assombrissement des téguments, de pâleur des branchies et d'hydrémie. L'auteur constata tous les manifestations caractéristiques d'anémie dans tous les organes, surtout dans la foie et dans les reins. Une dégénération lipidique et parfois des foyers de nécrose furent constatés. Des nécroses furent aussi constatées dans les reins. C'est un virus filtrable qui fut trouvé comme la vraisemblable cause de la maladie, par voie expérimentale. La durée de la maladie se révéla longue, et comptait de 9 à 46 jours. La période d'incubation était de 5 à 6 jours. Ni la saison, ni la nutrition ne semblent jouer de rôle dans l'étiologie de la maladie. L'auteur se servit de moyens prophylactiques et thérapeutiques suivants: écoulement d'eau des étangs, purification du fond de cadavres de poissons morts, désinfection des étangs par la chaux, isolation des poissons sains des pièces malades ou suspectes de maladie, addition de menthe à la nourriture. Ces moyens abaissèrent la mortalité de 11% à 0,2% à partir du mois d'avril jusqu'au mois de décembre, puis la maladie disparut.

P i ś m i e n n i e t w o :

(1) Doerr R. u. Hallauer C. — „Handbuch der Virusforschung”, Wien 1939. (2) Gildemeister E., Haagen E. u. Waldmann O. — „Handbuch der Viruskrankheiten”, Jena 1939. (3) Gaschoff O. — „Die verlustreichen Lebererkrankungen der Forellennäsbetriebe in Frühjahr 1929”, Allg. Fisch. Ztg. Jhrg. 54, Nr. 22, 1929. (4) Gaschoff O. — „Frühjahrssterben männlicher Regenbogenforellen an Leberdegeneration — Ursache und Vorbeugung”, Allg. Fisch. Ztg., Jhr. 55, Nr. 9, 1931. (5) Plehn M. — „Zur Kenntnis der Salmoniderleber in gesunden und kranken Zustand”, Ztschr. f. Fisch. Bd. I. (6) Plehn M. — „Praktikum der Fischkrankheiten”, Stuttgart 1924. (7) Schäperclaus W. — „Fischkrankheiten”, Braunschweig 1941. (8) Seiffert G. — „Virus und Viruskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen”, Dresden und Leipzig 1938.

Z Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie.

Kierownik: Prof. dr E. MIKULASZEK

E. MIKULASZEK — A. RATOMSKI

Badania doświadczalne nad budową antygenową zmiennych form laseczki wąglika

The antigenic composition of dissociation forms of *Bacillus anthracis*.

(Praca wykonana w 1941 roku we Lwowie)

Badania lat ostatnich rzuciły wiele nowego światła na zjawiska zmienności laseczki wąglikowej, a równocześnie poczyniono znaczne postępy w dziedzinie poznania budowy antygenowej tego drobnoustroju.

Obok dawniej już poznanych frakcji glikoproteidowych i wielocukrowych udało się, głównie dzięki pracom Tomca i

ka i współpracowników, wyodrębnić z laseczki wąglikowej w stanie chemicznie czystym substancję oloczkową w postaci polipeptydu, zbudowanego z jednostek kwasu glutaminowego.

Badania własne

Mając do dyspozycji większą liczbę szczepów laseczki wąglikowej, postanowiliśmy przekonać się, przy pomocy metod

chemicznych i serologicznych, jakie są własności izolowanych składników komórkowych tego drobnoustroju oraz czy w trakcie procesów zmienności ulegają one zmianom.

Objawy zmienności obserwowane u użytych szczepów.

Jako metodę prowadzącą do występowania form zmienionych laseczki wagiłkowej wybraliśmy długotrwałą hodowlę w inaktywowanej normalnej surowicy końskiej; obok niej zastosowaliśmy hodowlę w bulionowej pożywie z dodatkiem precipitacyjnej surowicy wagiłkowej. Złożone hodowle pozostawialiśmy w cieplarni 37° na przeciąg kilku miesięcy, przy czym przeszczepiano je w regularnych kilku dniowych odstępach na płytki agarowe, a wyrosłe kolonie badano makroskopowo na wygląd oraz mikroskopowo w preparatach odbitek, przy czym zwracano szczególną uwagę na wygląd pojedynczych komórek, ich wzajemny układ, występowanie zarodników i otoczek.

Obrazy jakie w ten sposób otrzymano były nieswycie różnorodnie, po pewnym czasie jednak pojawiały się typy kolonii, które w dalszych przeszczepianach okazały się trwałe i ustalone.

Z licznych postaci ustalonych kolonii użyto do doświadczeń 5 typów, które przedstawiały się następująco:

- 1) kolonie normalne wirulencyjnych szczepów;
- 2) kolonie duże, nieprzejrzyste, wilgotne o gładkich brzegach, w odbicie komórek bez zarodników z grubymi otoczkami;
- 3) kolonie śluzowe, o wyraźnej konsystencji śluzowej, w odbicie pojedynczo leżące laseczki z wakuolami, otoczkowa, bez zarodników.
- 4) kolonie z bulionu z surowicy Ascollego, duże przejrzyste, fryzujące; w odbicie laseczki niezarodnikujące, nie wytwarzające otoczek na agarze — formy te zdaniem naszym należy uważać jako odpowiadające szczepom szorstkim (R. 5) kolonie szczepu o osłabionej wirulencji a to t. zw. waktyny Pasteurowidkiej pierwszej.

Dla otrzymania frakcji komórkowych zastosowano następujące metody: a) metoda wielokrotnego zamrażania. 48 godzinne hodowle laseczki wagiłkowej na fiaskach Roux spłódniano wyjalowaną wodą przekroploną w ilości 30 ml na fiaskę, po czym gęstą zawiesinę bakteryjną zamrażano w elektrycznej chłodni a następnie odtajano w cieplarni 37°. Proces ten powtórzono 20 razy. Po ostatnim odtajaniu zakwaszono płyn, zawierający autolizowane komórki, kwasem octowym do pH 4,5, przy czym wypadł obfity kłaczkowaty osad a równocześnie płyn nad osadem zupełnie się wyjaśnia. Otrzymuje się w ten sposób osad A i płyn B.

Dalsza przeróbka osadu A: osad zebrany na szaciku lub oddzielony drogą wirowania rozpuszcza się w płynie fizjologicznym zalkalizowanym ługiem sodowym do pH 8,5, po czym sący się go przez sączkę azbestową bakteryjną Seltza. Przesączony płyn pozbawiony resztek komórek, zakwasza się ponownie kwasem octowym do pH 4,5, w następstwie czego wypada osad złożony głównie z frakcji nukleo- wzgl. glikoproteidowej. Osad ten oczyszcza się przez wielokrotne rozpuszczenie w alkalicznym płynie fizjologicznym i strącanie po zakwaszeniu kwasem octowym. Po kilkukrotnym wytrąceniu i ostatecznym wysuszeniu otrzymuje się frakcję nukleoproteinową w postaci białszek wzgl. proszku koloru brunatnego. W 2 przypadkach tym sposobem nie udało się otrzymać frakcji białkowej we większej ilości wobec czego zastosowano tu półgodzinne gotowanie zawiesiny bakteryjnej w 1% ługu sodowym w celu łatwiejszego rozpuszczenia frakcji białkowej.

Płyn B przerobiono w dalszym ciągu w następujący sposób: połowę płynu użyto do otrzymania substancji otoczkowej (polipeptydu „P”) przy pomocy zmodyfikowanej metody Ivanovicsa: płyn zadaje się w stosunku 1:10 roztworem 10% siarczanu miedzi, po czym natychmiast wypada obfity zielony osad. Osad ten rozpuszcza się w 0,1 n HCl i przepuszcza stumień siarkowodoru aż do zupełnego strącenia miedzi w postaci siarczku. Po odsączeniu siarczku miedzi wytrąca się polipeptyd przy pomocy nadmiaru alkoholu etylowego, słabo zalkalizowanego ługiem sodowym, oczyszcza drogą kilkukrotnego wytrącenia alkoholem i suszy, otrzymując go w postaci białozółtego proszku wzgl. grudek. Ze szczepu szorstkiego R (kolonie typu 4) otrzymano tym sposobem tylko małą ilość serologicznie nieczynnego materiału.

Z drugą połową płynu B przeprowadzano frakcjonowanie wytrącanie alkoholem dla uzyskania frakcji wielocukrowych. Po zadanu alkoholem etylowym do 66 proc. wypadła pierwsza frakcja wielocukrowa a po dalszym dodawaniu do 85%, frakcja wielocukrowa druga. Obie frakcje oczyszczają się dro-

gą kilkukrotnego rozpuszczania w małej ilości wrzącej wody i strącaniem nadmiarem alkoholu. Tą samą techniką przerobiono również w miejsce zawiesiny laseczek, spłódnącej z pożywką agarowej, sam osad z bakterii otrzymany drogą dekantowania i centrifugowania oraz przemycania płynem fizjologicznym. Wyraźniejzych różnic w zachowaniu się frakcji otrzymanych z obu rodzajów materiału nie zauważono.

b) metoda odbiałczania kwaśnego. (zmodyfikowana metoda Zinsera - Parkera).

Zawiesinę laseczek, uzyskaną przez spłódnienie 48 godzinnej hodowli na fiaskach Roux zadaje się kwasem octowym do stężenia 10%, po czym gotuje na łaźni wodnej 100° w ciągu 1 godziny. Powstaje przy tym obfity kłaczkowaty osad złożony z komórek i ciał białkowych, który usuwa się, sącąc płyn przez bibułę. Z zupełnie przejrzystego przesącza wytrąca się alkoholem etylowym, dodanym w ilości 66% pierwszą frakcję węglowodanową a po dodaniu alkoholu do 85% frakcję węglowodanową drugą. Obie frakcje oczyszczają się wielokrotnym wytrącaniem w alkoholu.

c) metoda zasadowej hydrolizy. (Pflügera). Zawiesinę laseczek zadaje się taką ilością ługu sodowego ażeby jego stężenie wyniosło 30%, po czym ogrzewa się płyn na łaźni wodnej 100° w ciągu 1 godziny. Z płynu zupełnie przejrzystego wytrąca się alkoholem w stężeniu 66%, pierwszą frakcję węglowodanową; po dodaniu alkoholu do 85% wypada jedynie bardzo skąpa ilość nieczynnego osadu. Frakcję pierwszą oczyszczają się wielokrotnym wytrącaniem alkoholem.

d) metoda elektrolizy.

Osad laseczek wagiłki, uzyskany po dekantowaniu zawiesiny poddaje się 3 godzinnemu działaniu prądu zmiennego o napięciu 110 v, doprowadzonego przy pomocy elektrod platynowych. W ciągu tego działania prądu płyn powoli się wyjaśnia z powstaniem słupowego osadu na dnie naczyń. Po przesączeniu płynu przerabia się go jak przy metodzie wielokrotnego zamrażania.

W ten sposób uzyskano przy pomocy metod a i d: frakcję białkową (nukleoproteinową wzgl. glikoproteidową), frakcję polipeptydową (substancję „P”) i 2 frakcje wielocukrowe (I i II), zaś przy pomocy metod b i c jedynie 2 frakcje wielocukrowe (I i II).

Własności chemiczne otrzymanych frakcji komórkowych.

Frakcje białkowe (nukleoproteinowe wzgl. glikoproteinowe) otrzymane metodą wielokrotnego zamrażania oraz metodą elektrolizy zachowały się jednakoowo. Są to ciała bezpostaciowe, barwy brunatnej, nierozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych a natomiast łatwo rozpuszczalne w słabych zasadach (pH 8,5 do 9,0). Odczyn na biało wypadają dodatnio w roztworach 1:1000 (ksantoproteinowy, Millona, biuretowy, z kwasem sulfosalicylowym, Adamkiewicza), dodatni zaś odczyn Molischa wskazuje na obecność ugrupowań węglowodanowych. Kolorymetryczne oznaczenie grup węglowodanowych przy pomocy odczynu alfa-naftolowego wg. Dischego daje wartości od 3 do 5%. Frakcje te strącają się pod wpływem soli metali ciężkich (miedzi).

Frakcje polipeptydowe odpowiadały w swych własnościach preparatom (substancji „P”), izolowanym przez autorów węgierskich (Tomcsika, Ivanovicsa i L.); są to ciała bezpostaciowe, rozpuszczalne w wodzie, strącalne pod wpływem soli metali ciężkich (miedzi), zawierające azot, nie dające odczynów na biało i ujemny odczyn węglowodanowy Molischa.

Frakcje wielocukrowe I bez względu na metodę otrzymania, przedstawiały się jako ciała bezpostaciowe, barwy brunatnej, rozpuszczalne w wodzie, nierozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach. W roztworze 1:250 nie dają dodatnich odczynów na biało; odczyn węglowodanowy (Molischa, z floroglucyną i orcyną) są silnie dodatnie; pierwsze z nich jeszcze w rozcieńczeniu wielocukru 1:10.000. Odcień barwy odczynów z floroglucyną i orcyną wskazuje na obecność heksoz i brak pentoz. Redukcja występuje dopiero po kilkugodzinnym hydrolizowaniu w rozcieńczonych kwasach mineralnych.

Frakcje wielocukrowe drugie są to ciała bezpostaciowe, zwykle barwy żółtej lub brunatnej, rozpuszczalne w wodzie; w rozpuszczalnikach organicznych są nierozpuszczalne. Przy ujemnych odczynach na biało dają dodatnie odczyn węglowodanowe, jednak w słabszym stopniu niż frakcje pierwsze (w niektórych preparatach odczyn węglowodanowy występuje tylko jako zamazane). Redukcja dopiero po hydrolizie. Z powodu otrzymania drugiej frakcji zwykle tylko w małych ilościach, wykonanie wszystkich odczynów z niemi natrafiało niestety na trudność.

Wyniki odczynów chemicznych, wykonanych z frakcjami komórkowymi laseczki węglikowej nie wykazują większych różnic pomiędzy frakcjami białkowymi, otrzymanymi przy pomocy różnych metod i z różnego materiału wyjściowego; to samo odnosi się również i do frakcji wielocukrowych oraz polipeptydowych z tą jedynie różnicą, że nasilenie barwnych odczynów węglowodanowych (Mollischa, z orecyną i floroglicyną) w niektórych frakcjach wielocukrowych, zwłaszcza drugich, zależy od materiału i metody otrzymywania wykazywało różnice; fakt ten wskazywałby na to, że skład chemiczny ilościowy otrzymanych frakcji nie zawsze był identyczny.

Sumaryczne zestawienie własności chemicznych u otrzymanych frakcji znajdujemy w tabeli I.

Własności serologiczne otrzymanych frakcji komórkowych.

Wyodrębnione frakcje komórkowe zbadano w odczynie wiązania dopełniacza i precypitacji wobec surowic odpornościowych osłich i końskich różnego pochodzenia.

a) odczyn wiązania dopełniacza.

Jak już wstępne badania wykazały, wypadł odczyn wiązania dopełniacza zarówno z frakcjami białkowymi, polipeptydowymi, jak i wielocukrowymi (w rozcieńczeniu 1:2000 do 1:16.000.000) przy użyciu surowic wysokowartościowych końskich wzgl. osłich stale ujemnie.

Wynik ten zgadza się z danymi literatury (Schaeffer — Sander i in.) podkreślającymi, że silnie precypitujące surowice końskie dają z izolowanymi frakcjami komórkowymi niektórych drobnoustrojów, między nimi i z laseczki węglikowej, ujemny odczyn wiązania dopełniacza, podczas gdy surowice królicze z tymi samymi antygenami zarówno precypitują jak i wiążą dopełniacz.

b) odczyn precypitacyjny.

Odczyn wykonywano jako próbę pierścieniową, podwarstwając rozcieńczenia antygenów (1:1000 do 1:10.000.000) nierozcieńczoną surowicą; próbę wstawiano na 30' do ciepłarki, po czym wyniki odczytywano natychmiast. Wyniki odczynu precypitacyjnego z izolowanymi frakcjami laseczki węglikowej i 3 surowicami precypitacyjnymi (Puławy I, Puławy II i Czeska III) zebrane są w załączonych zestawieniach. (Tabela 2 i 3).

Opierając się na przedstawionych wynikach można już na pierwszy rzut oka stwierdzić, że niemal wszystkie izolowane substancje (z nielicznymi wyjątkami) zachowały się w odczynie precypitacyjnym czynnie, dając dodatnie wyniki niekiedy jeszcze w rozcieńczeniu 1:100.000 a zaznaczone w rozcieńczeniu 1:10.000.000. Zarówno więc frakcje białkowe (nukleoproteidowe wzgl. glikoproteidowe), polipeptydowe jak i wielocukrowe I i II posiadają charakter precypitogenowy.

Wpływ metody otrzymywania na własności serologiczne niektórych frakcji zaznacza się wyraźnie i tak np. frakcje glikoproteidowe ze szczepów poddanych gotowaniu w 1% KOH są serologicznie nieczynne. Podobnie też wszystkie frakcje wielocukrowe II, otrzymane drogą strącania wyższym stężeniem alkoholu posiadają znacznie słabsze własności precypitogenowe aniżeli frakcje I lub też nawet są zupełnie nieczynne. Przy pomocy elektrolizy otrzymuje się na ogół frakcje bardziej czynne (białkowe, polipeptydowe i wielocukrowe I) a jedynie frakcja II wielocukrowa po zastosowaniu elektrolizy okazała się zupełnie nieczynna.

Wyraźniej zaznacza się wpływ objawów zmienności szczepów, użytych do sporządzenia frakcji komórkowych, na własności serologiczne otrzymanych preparatów. Najsilniejszym precypitogenem są z frakcji glikoproteidowych te, które uzyskano z szczepów normalnych i otoczkowych, podczas gdy te same frakcje otrzymane z innych form zmiennych są mniej aktywne serologicznie. We frakcjach polipeptydowych, o ile je z danej formy dysocjacyjnej w ogóle można otrzymać, różnice te zupełnie się zacierają. We frakcjach wielocukrowych (zwłaszcza frakcjach I) wpływ dysocjacji bakteryjnej jest bardzo wyraźny; szczepy służowe dają wielocukry serologicznie nieczynne podobnie jak i szczepy szorstkie. W porównaniu ze szczepami normalnymi dają szczepy zmienione, frakcje wielocukrowe wypadające przy wyższym stężeniu alkoholu jako drugie, o bardzo słabych własnościach precypitogenowych albo też zupełnie nieczynne.

Szczepy o osłabionej zjadliwości jak np. wakcyna Pasteurowska I zawierają słabo czynne lub zupełnie nieczynne frakcje komórkowe. Na uwagę zasługuje ponadto jeszcze zachowanie się frakcji, otrzymanych z materiału, składającego się tylko z samych zarodników; frakcje białkowe i wielocukrowe zachowują się jak identyczne frakcje z form wegetatywnych, podczas gdy frakcja polipeptydowa z zarodników jest niemal zupełnie nieczynna serologicznie.

Również i pomiędzy frakcjami otrzymanymi z 2 szczepów normalnych (1/40 i 71/40) występują dość znaczne różnice, polegające na tym, że szczep 1/40 jest zarówno jako białko, polipeptyd czy wielocukier silniejszym precypitogenem. Czy w danym przypadku mamy do czynienia z różnicami, spowodowanymi obecnością różnych typów serologicznych u laseczki węglikowej, na to zagadnienie odpowiedź by dać mogły jedynie badania, wykonane na znacznie większym materiale.

Co do wrażliwości haptenu węglikowego na czynniki chemiczne, to zbadano wpływ silnego odczynu zasadowego na otrzymane frakcje; i tak frakcje białkowe gotowane w 1% KOH 30 minut tracą w zupełności swe własności serologiczne. Na frakcje polipeptydową zadziało słabym stężeniem ługu (do pH 8,5) przy czym nie zauważono osłabienia własności haptenu. Frakcja wielocukrowa I jest bardzo odporna na odczyn zasadowy, gdyż nawet po zastosowaniu techniki Pflügera (30% KOH — 100° — 1 h) zachowuje się w dalszym ciągu czynnie w odczynach serologicznych. Frakcje wielocukrowe II po zastosowaniu techniki Pflügera otrzymuje się tylko w znikomej ilości, jako materiał serologicznie nieczynny.

Surowice użyte do doświadczeń zawierały zarówno przeciwciała zwrócone przeciwko białkom jak i precypityny, strącające polipeptydy i wielocukry. Surowica Puławska I precypitowała najsilniej z wszystkimi 4 frakcjami komórkowymi, podczas gdy surowice Puławska II i Czeska III dawały dodatnie odczyny, jakkolwiek słabsze z frakcjami białkowymi, polipeptydowymi i wielocukrowymi I a zupełnie ujemne lub tylko zaznaczone z frakcjami wielocukrowymi II. Wynikałoby z tego, że te ostatnie najtrudniej uodparniają albo też, że dodatni odczyn precypitacyjny z frakcjami II spowodowany jest obecnością matych ilości wielocukru I, absorpcyjnie związanych z frakcją wielocukrową II.

W końcu zastosowano odczyn absorpcji precypityny w celu oddzielenia w surowicy precypitacyjnej węglikowej przeciwciała, zwróconego przeciwko substancji otoczkowej „P” (frakcji polipeptydowej) od przeciwciała reagującego z komórkowym wielocukrem. Surowice Puławska I absorbowano frakcją wielocukrową I (na I ml. surowicy 10 mg wielocukru). Po odwirowaniu powstałego strątu wykonywano odczyn precypitacyjny z płynem nad precypitatem i roztworami badanych antygenów w rozcieńczeniu 1:1000 i 1:10.000. Wyniki tego doświadczenia podaje tabela 4.

Jak z przedstawionej tabeli wynika, absorbuje frakcja wielocukrowa I z surowicy węglikowej przeciwciała, zwrócone przeciwko frakcji wielocukrowej oraz w słabszym stopniu przeciwciała, odpowiadające frakcji glikoproteidowej; natomiast przy odpowiednim rozcieńczeniu antygenem wypada odczyn absorpcji precypityny z haptenu polipeptydowym jako ujemny. Przy pomocy odpowiedniej techniki można więc główne przeciwciała, występujące w surowicy precypitacyjnej węglikowej a to: przeciwwielocukrowe i przeciwpolipeptydowe swoiście absorbować i od siebie oddzielić.

Streszczenie i wnioski.

1) Ze zmiennych form laseczki węglikowej otrzymano przy pomocy różnych metod 4 frakcje komórkowe o różnych własnościach chemicznych.

2) Pierwsza odpowiada białku, związanemu z węglowodanem, czyli tak, zw. nukleo-wzgl. glikoproteidowi; druga i trzecia odpowiadają niezwiązanym czyli wolnym wielocukrom; czwarta zaś zachowuje się identycznie jak polipeptyd, izolowany przez autorów węgierskich (Tomcsika, Ivanovicsa i współpracowników).

3) Serologiczne własności wyodrębnionych frakcji komórkowych zbadano w odczynie precypitacyjnym z surowicami węglikowymi, służącymi do wykonywania odczynu Ascollego. Równocześnie wykonany odczyn wiązania dopełniacza dał zgodnie z danymi piśmiennictwa, z wszystkimi frakcjami komórkowymi ujemny wynik.

4) Otrzymane z normalnej formy laseczki węglikowej frakcje komórkowe okazały się w odczynie precypitacyjnym serologicznie czynne, przy czym w sile ich reagowania zaznacza się pewne stopniowanie; najczulsze odczyny dają frakcje polipeptydowe, dalej wielocukrowe pierwsze, znacznie słabsze odczyny występują z frakcjami nukleoproteidowymi a frakcje wielocukrowe drugie dają tylko w najniższych rozcieńczeniach dodatnie odczyny precypitacji.

5) Z zarodników laseczki węglikowej otrzymano głównie haptenu wielocukrowe, natomiast nie udało się, przy zastosowaniu naszej techniki, uzyskanie frakcji polipeptydowej z tego materiału.

6) Zbadano również zachowanie się frakcji komórkowych, otrzymanych ze zmiennych form laseczki węglikowej; a to otoczkowej, służowej, szorstkiej i osłabionej wirulencji (wakcyna Pasteurowskiej I). Silnie aktywne serologicznie frakcje otrzy-

TABELA I

Rodzaj frakcji	z formy zmiennej	metoda otrzymywania	Odczyny chemiczne									Uwagi	Nr (stanow. frakcji)		
			rozpuszczalność w wodzie	Stężalność: 80% etanolu (CaSO ₄)	białkowe				węglowodanowe						
					Kasnioproteinowy	Mullona	biuretowy	sulfosali-cylowy	redukcja po hydrolizie	Mollach	z siarcoplas-cyna			z orczyka	
glikoproteidowa	szczep normalny 71/40	zamrażanie	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0		4
"	"	zamrażanie zarodników	—	+	++	+++	+	++	+	+	—	1	0		11
"	"	elektroliza	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0		33
"	szczep otoczkowy 71/40	zamrażanie	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0	100° w 1% KOH	24
"	szczep szorstki R 71/40	"	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0	100° w 1% KOH	28
"	szczep otoczkowy 71/40	"	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	1	0		30
"	szczep śluzowy 71/40	"	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0		39
"	szczep normalny 1/40	"	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	2	0		51
"	wakcyna Pasteurowa I.	"	—	+	++	+++	+	++	+	+	+	4	0		42
polipeptydowa	szczep normalny 71/40	zamrażanie	+	+	—	—	—	—	—	—	—	0	0		10
"	"	zamrażanie zarodników	+	+	—	—	—	—	—	—	—	1	0		20
"	"	elektroliza	+	+	—	—	—	—	—	—	—	0	0		34
"	szczep otoczkowy 71/40	zamrażanie	+	+	—	—	—	—	—	—	—	0	0		31
"	szczep śluzowy 71/40	"	+	+	—	—	—	—	—	—	—	0	0		40
"	szczep normalny 1/40	"	+	+	—	—	—	—	—	—	—	0	0		52
"	wakcyna Pasteurowa I.	"	+	+	—	—	—	—	—	—	—	4	1		43
wieloczkrowa I	szczep normalny 71/40	zamrażanie	++	—	—	—	—	—	+++	+++	5	3			12
"	"	Zinsser—Parker	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			6
"	"	zamrażanie zarodników	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			12
"	"	Zinsser—Parker z zarodników	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	2			15
"	"	elektroliza	++	—	—	—	—	—	++	++	3	0			36
"	szczep otoczkowy 71/40	Zinsser—Parker	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			22
"	szczep szorstki R 71/40	"	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			26
"	szczep śluzowy 71/40	zamrażanie	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			41
"	szczep normalny 71/40	"	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			55
"	wakcyna Pasteurowa I.	"	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			44
"	szczep normalny 71/40	Pflüger	+	—	—	—	—	—	+++	+++	4	3			8
"	"	Pflüger z zarodników	++	—	—	—	—	—	++	++	3	0			19
wieloczkrowa II	szczep normalny 71/40	zamrażanie	++	—	—	—	—	—	+	+	2	0			3
"	"	Zinsser—Parker	++	—	—	—	—	—	+++	+++	4	0			7
"	"	zamrażanie zarodników	++	—	—	—	—	—	++	++	3	0			13
"	"	Zinsser—Parker z zarodników	++	—	—	—	—	—	+	+	2	0			18
"	"	elektroliza	++	—	—	—	—	—	—	—	1	0			37
"	szczep otoczkowy 71/40	Zinsser—Parker	++	—	—	—	—	—	+++	++	3	1			23
"	szczep szorstki R 71/40	"	++	—	—	—	—	—	+++	+++	3	1			27
"	szczep normalny 1/40	zamrażanie	++	—	—	—	—	—	+	+	3	0			54
"	wakcyna Pasteurowa I.	"	++	—	—	—	—	—	++	+	2	0			45

Objaśnienie odczynu z floreczyną i) odczyn

bezbarwny = 0
biało żółty = 1
żółty = 2

pomarańczowy [w 3
wielokrotność] = 4
ciemno wielokrotność = 5

TABELA 2. ODCZYŃ PRECYPITACYJNY

Lp. frakcji	z frakcją glikoproteidową z szerepu:	Surowica Puławy I						Surowica Puławy II						Surowica Czeska III.						U w a g i							
		1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:500000	1:1000000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:500000	1:1000000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000		1:100000	1:500000	1:1000000				
4	normalnego 71/40	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	U w a g i	
11	normalnego 71/40	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy silnie dodatnio	
33	normalnego 71/40	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy silnie dodatnio	
30	otoczowego 71/40	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio	
39	śluzowego 71/40	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio	
51	normalnego 1/40	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio	
42	wakcyjny Pasteurowskiej I	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio	
24	otoczowego 71/40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	frakcja oszona do 100° w 1% KOH	
28	szorstkiego R. 71/40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	frakcja oszona do 100° w 1% KOH	
z frakcją polipeptydową z szerepu:																											
10	normalnego 71/40	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	dosy dodatnio
20	normalnego 71/40 z zarodników	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio
34	normalnego 71/40	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	dosy dodatnio
31	otoczowego 71/40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	dosy dodatnio
40	śluzowego 71/40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	dosy dodatnio
52	normalnego 1/40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	dosy dodatnio
43	wakcyjny Pasteurowska I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dosy dodatnio

TABELA 5. ODCZYNY PRECYPITACYJNE

Lp. frakcji	Z frakcją wielocukrową I. z szczepu:	Surowica Puławy I.						Surowica Puławy II.						Surowica Czeska III.						Uwagi					
		1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:500000	1:1000000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:500000	1:1000000	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000		1:100000	1:500000	1:1000000		
2	normalnego 7140	+++	+++	+++	+	-	-	+++	++	+	-	-	-	-	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	normalnego 7140	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
8	normalnego 7140	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
12	normalnego 7140 z zarodników	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+	-	-	-	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	
15	normalnego 7140 z zarodników	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
19	normalnego 7140 z zarodników	+++	+++	+++	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
36	normalnego 7140	+++	+++	+++	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
22	otoczkowego 7140	+++	+++	+++	±	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
26	szorstkiego R 7140	+++	+	±	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
41	śluzowego 7140	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
55	normalnego 140	+++	+++	+++	+	±	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	
44	wakcyny Pasteurowskiej I.	+++	++	++	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Z frakcją wielocukrową II. z szczepu:																									
3	normalnego 7140	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	normalnego 7140	+++	±	±	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	normalnego 7140 z zarodników	+++	+++	+++	++	-	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	normalnego 7140 z zarodników	+++	±	±	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	normalnego 7140	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	otoczkowego 7140	+++	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	szorstkiego R 7140	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
54	normalnego 140	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
45	wakcyna Pasteurowska I.	+++	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

druga elektrolizy

druga elektrolizy

TABELA 4.

Absorpcja precipityn przeciw wielocukrowym

Surowica Puławy I nieabsorbowana	A n t y g e n y					
	wielocukrowy Nr 8		polipeptydowy Nr 31		glikoproteidowy Nr 51	
	1:1000	1:10000	1:1000	1:10000	1:1000	1:10000
	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Surowica Puławy I absorbowana wielocukrem Nr 8	-	-	±	+++	+	+

mano jedynie z formy otoczkowej — natomiast z formy śluzowej, szorstkiej i z walcynki Pasteurowskiej otrzymano tylko frakcje o osłabionych właściwościach swoistych lub też zupełnie nieczynne. Wyjątek stanowi tu jedynie polipeptyd z formy śluzowej, występujący w niej jako silnie aktywny hapten w dużej ilości.

7) W surowicy diagnostycznej Ascoli znajdują się jako główne przeciwciała — przeciwwielocukrowe i przeciwpolipeptydowe, które przy odpowiedniej technice można drogą absorpcji precipityn od siebie oddzielić.

8) Poznanie dysocjacji bakteryjnej i budowy antygenowej laseczki wąglika posiada pierwszorzędne znaczenie dla rozpoznawania wąglika metodą Ascoli oraz dla przyrządzania wąglikowych surowic i szczepionek.

E. MIKULASZEK, A. RATOMSKI

The antigenic composition of dissociation forms of *Bacillus anthracis*.

SUMMARY

From dissociation forms of *Bacillus anthracis* it is possible to obtain, using different methods, 4 cell fractions with varying chemical characteristics. The first has the structure of a protein linked with a carbohydrate or corresponds to a nucleo or glycoprotein; the second and third are non-linked or free polysaccharides; the fourth has the characteristics of the polypeptide, isolated by the Hungarian authors (Tomcsik, Ivanovics and collaborators).

The serological behaviour of the isolated fractions was investigated, using precipitation with anthrax serums for the Ascoli-test. Complement fixation tests were negative with all isolated fractions. The precipitation reaction was with all fractions positive, although in the intensity there was a visible gradation: the polypeptide fractions gave the most sensitive reactions, then came the first polysaccharide fractions, then the glycoproteins and the second polysaccharide fractions (by fractionated alcohol precipitation) were only in the weakest dilutions serologically active.

From anthrax spores may be obtained in the first place polysaccharide haptens, but it was with our technic impossible to obtain a polypeptide fraction from this material.

In the same manner were investigated cell fractions obtained from dissociation forms of *Bac. anthracis*: from the capsulated form, the mucoid and rough form and from a strain with attenuated virulence, the Pasteur vaccin I. Strongly active fractions were obtained only from the capsulated form; from the other dissociation forms could be isolated only weakly active or totally inactive preparations. An

exception is the polypeptide fraction from the mucoid form, behaving as a strongly active hapten.

In diagnostic Ascoli serum can be demonstrated as principal antibodies antipolysaccharide and antipolypeptide precipitins; they can be differentiated, using an adequate technic, by precipitin absorption.

The study of bacterial dissociation and the antigenic composition of the anthrax bacillus has a great value in the diagnostic use of the Ascoli method and for the preparation of anthrax vaccines and serums.

Piśmiennictwo.

- 1) Baronio F. *Igiene moderna* 1938, t. 16, p. 166.
- 2) Boari D. *Giorn. Batter. e Immun.* 1938, t. 20, p. 1.
- 3) Ivanovics G — Erdős L. *Zschr. f. Immunif.* 1937, B. 90, S. 5.
- 4) Ivanovics G — Bruckner V. *Zschr. f. Immunif.* 1937, B. 90, 304.
- 5) Ivanovics G. *Cbl. f. Bakt. Or. I.* 1937, B. 138, S. 211.
- 6) Ivanovics G. *Cbl. f. Bakt. Or. I.* 1937, B. 138, S. 449.
- 7) Hruska Ch. *C. R. Soc. Biol.* 1936, T. 121, p. 1314.
- 8) Schaeffer W — Sandor G. *C. R. Soc. Biol.* 1937, T. 126, p. 187.
- 9) Schaeffer W. *C. R. Soc. Biol.* 1938, T. 127, p. 956.
- 10) Schaeffer W. *C. R. Soc. Biol.* 1938, T. 127, p. 356.
- 11) Schaeffer W — Sandor G. *C. R. Soc. Biol.* 1937, T. 125, p. 336.
- 12) Schaeffer W. *C. R. Soc. Biol.* 1936, T. 122, p. 897, 1178.
- 13) Schaeffer W. *C. R. Soc. Biol.* 1938, T. 128, p. 34.
- 14) Ionesco — Mihailesti C — Sorae E — Wisner B. *C. R. Soc. Biol.* 1937, T. 125, p. 765.
- 15) Sterne M. *Onderstepoort Journ. of Vet. Sc. and An. Ind.* 1937, T. 8, 292.
- 16) Sterne M. *Onderstepoort Journ. of Vet. Sc. and An. Ind.* 1937, T. 9, 49.
- 17) Pochon J. *Revue d'Immunologie* 1938, V. 4, p. 457.
- 18) Tomcsik J — Ivanovics G. *Zschr. f. Immunif.* 1938, B. 93, 196.
- 19) Wagner G. *Cbl. f. Bakt. OR. I.* 1920, B. 84, 386.
- 20) Tomcsik J — Bodon G. *Zschr. f. Immunif.* 1934, B. 83, 426.
- 21) Tomcsik J — Bodon G. *Zschr. f. Immunif.* 1935, B. 84, 308.
- 22) Przesmycki F — Szczuka S. *C. R. Soc. Biol.* 1927, T. 96, 1478.
- 23) Schockaert J. *C. R. Soc. Biol.* 1929, T. 100, 447.

FELIUS ANCYKOWSKI

Lublin

W sprawie standardu odczynu aglutynacyjnego

On the standard method of agglutination test with *br. abortus bovis*.

Doniesienie I. Metodyka doświadczalnego postępowania.

Raport I. The methods of experimentation.

Łatwość wykonania, oraz stosunkowo duża czułość odczynu aglutynacyjnego zdecydowały, że przy rozpoznawaniu

brucellozy zwykle jako pierwszą i zasadniczą próbę diagnostyczną stosujemy aglutynację próbkową.

Mimo wspomnianych walorów odczynu aglutynacyjnego był przedmiotem licznych prac i dyskusyj, bowiem uzyskiwane wyniki nie zawsze pokrywały się ze stanem faktycznym; miano aglutynacyjne wypadło ujemne, a jeszcze znacznie częś-