

TABELA 4.

Absorpcja precipityn przeciwwielocukrowych

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'ego 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'ego 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 graduation: 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-

ciej wątpliwe z surowicą zwierząt, co do których istniały wszelkie dane, że są zakażone a nawet klinicznie chore. Ta okoliczność zmusiła wielu badaczy do poddania szczegółowej analizie wszystkich elementów, biorących udział w tym odczynie, nie wykluczając środowiska, oraz techniki laboratoryjnej.

I istotnie, udało się znaleźć wiele niedokładności. Okazało się mianowicie, że na skutek niedostatecznego docenienia własności poszczególnych elementów, biorących udział w aglutynacji oraz wskutek braku ujednoliconego postępowania często uzyskiwano mylne wyniki, na które bezkrytycznie powoływali się poszczególni autorzy, stwarzając coraz to większy chaos.

Jaszcrawym przykładem do omawianej sprawy mogą być już dość szeroko znane porównawcze badania *Stablefartha* (1936) nad różnymi metodami wykonywania odczynu aglutynacyjnego z pał. Banga, używanymi w różnych państwach t. w. różnych laboratoriach. Na 50 przebadanych surowicę np. najczulszą metodą amerykańską — 26 z nich okazało się dodatnich, 24 surowice reagowały wątpliwie, ujemnych zaś nie stwierdzono zupełnie, podczas gdy przy zastosowaniu najmniej czułej metody niemieckiej zaledwie 4 surowice dały miano dodatnie, 2 surowice miano wątpliwe, a 44 surowice wykazały miano zupełnie ujemne.

To też kwestia opracowania standardowej metody postępowania przy wykonywaniu odczynu aglutynacyjnego okazała się ważna nie tylko dla każdego państwa poszczególnie ale bardzo pożądana i na terenie międzynarodowym. Sprawę tę ujął w swe ręce przed wojną Międzynarodowy Urząd Epizootyczny w Paryżu.

Przy okazji wspomnieć należy, że kwestia ujednolicenia odczynu aglutynacyjnego przy rozpoznawaniu brucellozy jest aktualna już od około 15 lat (*Fitch i Dohnam, Bishop, Boyd* (1930—1931), *Wiśnicki i Larson* (1931), *Kinsley* (1932), *Henricsson* (1932), ibi. Stan zagadnienia dziś nie jest mi znany z powodu braku odpowiednich źródeł. W każdym razie już w 1939 r. prawie wszystkie państwa cywilizowane swoje standardy posładały. W Polsce zagadnieniem omawianej standaryzacji aglutynacji próbowkowej pierwszy zajął się *Zagrodzki* (1937) na terenie Państwowego Instytutu Naukowego Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach. Jednak poszczególne zagadnienia związane z interesującym nas tematem nie zostały przez tegoż autora wyczerpująco i trafnie opracowane.

W niniejszej pracy, na podstawie dostępnego materiału źródłowego oraz częściowo opierając się na wynikach przeprowadzonych doświadczeń własnych, postanowiono przedstawić porównawczo wartość większości metod, dotychczas używanych w związku z wykonywaniem złepnego odczynu z pał. Banga i na tej podstawie określić właściwe postępowanie i ewentualnie w takim zakresie, aby ono mogło dać podstawę do opracowania standardu.

Zebraany materiał przekracza ramy przeciętnej jednej publikacji. Przeto zdecydowano się poszczególne zagadnienia związane z omawianą sprawą podać w oddzielnych doniesieniach.

Doświadczenia zostały wykonane w dwóch fazach: przeważającą część prób przeprowadzono w 1938 r. w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie. Praca jednak została przerwana na skutek akcji wojennej, w której większa część opracowanego materiału została zniszczona. Ocalały jedynie notatki z przeprowadzonych doświadczeń, na podstawie których zamierzono pierwotny stan odtworzyć. Nie wykończony dział przedsięwziętych doświadczeń uzupełniono tylko fragmentarycznie: częściowo w Woj. Zakładzie Higieny i Wet. w Warszawie, częściowo zaś w Zakładzie Bakteriologii Wydziału Weterynaryjnego Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, rezygnując z całkowitego opracowania tematu, z powodu braku obecnie ku temu odpowiednich warunków. Dzięki wspomnianym przerwom praca utraciła na przejrzystość. Pominęto także sporą część wątpliwych prób przy omawianiu różnych działów tematu, albowiem, w obecnym stanie nie dając wyników rozstrzygających, nie mogły być one brane pod uwagę.

Do pracy użyto razem 39 szczepów br. abortus bovis, świeżo wydzielonych z błon płodowych krów, lub z żółdka poronionych płodów, zaś pozostała część szczepów pochodziła z różnych krajowych laboratoriów. Niektóre z nich hodowane w warunkach zwykłych, a niektóre w środowisku gazu świeżego.

Zawiesiny do aglutynacji otrzymywano przez opłókanie 0,85% roztworem fizjologicznym, sporządzonym na zwykłej wodzie destylowanej o pH 6,2—pH 6,5 — 3-dniowej hodowli na agarze wątrobowym wg. Huddlesona o pH 7,4 — pH 7,6 w próbkach lub w butelkach Roux. Czystość ho-

dowli sprawdzano bakterioskopowo na preparatach barwionych metodą Grama, oraz przy pomocy aglutynacji azklekowej z własnymi dodatnimi surowicami. W ten sposób otrzymaną zawiesinę filtrowano przez jabłową gazę, celem oddzielenia ew. znajdujących się w spóźnie cząstek agaru (*Donham i Fitch* (1935)). Pominęto natomiast trzesienie zawiesin na trzęsawce z perełkami, jak również przemywanie zawiesin (*Hirsch* (1935)), zalecane przez niektórych autorów, a to z powodu braku dogodnych urządzeń w skalach zamierzonych doświadczeń.

Gęstość zawiesiny ustalano przy pomocy sporządzonego wzorca siarczynu barowego ($BaSO_4$) w zwykłej próbówce, jakiej używa się do agaru skośnego. Wzorec ten przygotowywano w znany ogólnie sposób, tj. przez potraktowanie 1% $BaCl_2$ 1% H_2SO_4 w stosunku 3:37. Należy nadmienić że przygotowując taki wzorec, trzeba uprzednio chlorurek baru, jak również kwas siarkowy dobrze oziębić w chłodni i po tym dopiero powoli oba składniki dodawać, energicznie mieszając. W opisanych warunkach powstaje drobny osad $BaSO_4$ utrzymujący się długo w zawieszeniu i dający dość jednolitą opalescencję płynu. Natomiast, jeśli oba roztwory nie będą dostatecznie chłodne i zostaną połączone nagle całymi objętościami, powstają duże kryształy $BaSO_4$, innego kształtu, szybko opadające po skłóceniu na dno próbówki. Stwarza to pewną trudność w ustalaniu gęstości pożądanej zawiesiny w czasie pracy.

Ponadto użyto do doświadczeń 2 dodatnie surowice końskie od koni szczepionych doświadczalnie — jednego zawiesinę żywą, drugiego zaś zawieszoną zabłą. Miano ich odpowiednio wynosiło: 1:40.000 i 1:5.000. Ponadto 2 surowice od chorych krów, które poroniły. Miano tych surowic sięgało 1:2560 i 1:1280. Dla celów kontrolnych służyły dwie ujemne surowice — końska i bydlęca.

Sam odczyn nastawiano w ten sposób, że najpierw rozcieńczano w próbkach surowicę, a potem dopiero dodawano zawieszynę w równej objętości.

Przy odczytywaniu wyników trzymano się już w poprzedniej pracy przyjętego schematu a mianowicie:

- + + + całkowicie wyjaśnienie płynu, osad charakterystyczny, „suchy”, drobnozłaniasty, o brzegach pozbitych.
- ++ płyn nad osadem lekko opalający, ale osad obfity i dość charakterystyczny.
- + płyn silnie opalający, osad mierny, dość charakterystyczny.
- + — lub + płyn mętny, osad nikły, mało charakterystyczny.
- płyn jednolicie mętny, charakterystycznego osadu brak.

Pomimo omawianie różnych sposobów odczytywania wyników, albowiem kwestia ta została naogół wyczerpująco omówiona już we wspomnianej uprzednio pracy (1). Chciałbym natomiast podkreślić, że stosowana przeze mnie skala oceny miana od +++ do — z wielu względów wydaje się być uzasadniona.

Mianowicie mamy wtedy możliwość uwydatnienia intensywności odczynu w dość swobodnych granicach, co bez wątpienia odgrywa pewną rolę przy epidemiologicznej ocenie miana aglutynacyjnego. W miarę używania coraz to mniej znaków aż do + i — owa swoboda jest coraz bardziej krąpowana. Z drugiej strony stosowanie więcej znaków, aniżeli +++, zdaje się mieć w sobie więcej przesady, aniżeli pożądanej dokładności; ogólnie jest wiadomo, że drobne różnice w intensywności wypadania szczepów ze względów technicznych są nie do uniknięcia, a być może także z powodu innych od nas niezależnych zmian w obrębie chwilejnych własności samych komponentów: surowicy i antygeny. Ponadto za utrzymaniem przez nas przyjętej skali oceny przemawia pewna serologiczna tradycja; wśród odczynów serologicznych szeroko stosowanych i posiadających już pewną przeszłość historyczną w zakresie praktycznego zastosowania, jak np. odczyn Wassermann'a u ludzi i Bordet-Gengou przy nosaciznie u koni — wynik +++ jest uważany za typowy i klasyczny*).

SUMMARY.

The author determines the subject of his research undertaken in order to to work out the standard method of agglutination test with br. abortus bovis. The technique of preparing the $BaSO_4$ model from 1% $BaCl_2$ and 1% H_2SO_4 which should be formerly cooled in a refrigerator and steadily combined, is of special interest.

The author also gives us the argumentation of the scale used for determining the intensity of agglutination - test.

*) Wykaz piśmiennictwa zostanie podany w doniesieniu IX.