

Długość cięcia równała się szerokości dłoni. Przez ranę cięcia włożono rękę dokładnie odkażoną oraz powleczoneą maścią oxyterracynową. Dłonią odszukano macię i pęcherz moczowy oraz odłamaną pipetę. W celu uniemożliwienia przemieszczania się złamanego końca pipety w pęcherzu włożono poprzez cewkę moczową do pęcherza kleszcze Statlera, przy których pomocy zaciśnięto pipetę. Chodziło o to, by ostry koniec nie drażnił i nie kałczył ściany pęcherza moczowego. Dłonią włożoną do jamy brzusznej starano się naciągać na ustaloną pipetę kleszczami ścianę pęcherza moczowego w jego górnoprzedniej części, aby przebić ją ukośnie i tym otworem wyjąć odłamaną pipetę. Do jamy otrzewnowej podano antybiotyki. Szwów na pęcherz moczowy nie zakładano. Na ranę cięcia sklepienia pochwy założono jeden szew krzyżowy z catg. nr 3, ściany pochwy powleczone 3% maścią oxyterracynową. Długość ułamanej pipety wynosiła 21,5 cm.

Krowa po operacji do trzech dni oddawała mocz z domieszką krwi. Do pęcherza moczowego w tym czasie podawano antybiotyki. Parcie na mocz stopniowo ustępowało. Krowę żywiono sianem łąkowym w dowolnej ilości z dodatkiem paszy treściwej, wodę do picia zmniejszono o 1/3 racji dziennej, pasz soczystych nie podawano. Po pięciodniowym leczeniu krwista barwa moczu stopniowo przechodziła w barwę słomkową. Parcie ustąpiło zupełnie, stan krowy był zadowalający. Zwierzę wypisano.

Na podstawie powyższych obserwacji nasuwa się następujący wniosek. Wprowadzić do inseminacji zamiast obecnie używanych pipet szklanych, pipety ze sztucznego tworzywa oraz prowadzić doszkalanie inseminatorów organizując kursy wielostopniowe.

Adres autora: Henryk Maciołek, Sulejów, pow. Piotrków Tryb., ul. Konecka 60.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

MARIAN GRUNDBOECK

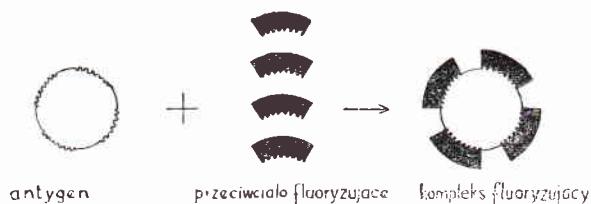
Metoda fluoryzujących przeciwciał i jej zastosowanie w medycynie weterynaryjnej

Z Pracowni Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr TADEUSZ ZULIŃSKI

Metoda fluoryzujących przeciwciał opiera się na stwierdzeniu, że przeciwciała mogą łączyć się z innymi substancjami, np. barwnikami, nie tracąc zdolności swoistego reagowania z antygenem. Właściwość tę wykorzystał Coons (11), opracowując metodę chemicznego łączenia barwników fluoryzujących z przeciwciałami oraz technikę odczynu znakowanych przeciwciał z antygenami występującymi w tkankach lub komórkach.

Jeśli odpowiednio przygotowany rozmaz, albo skrawek histologiczny nakropimy zgodnie ze wskazówkami Coonsa tzw. koniugatą, to znaczy roztworem fluoryzujących przeciwciał, wystąpi wówczas odczyn, wykazujący wszelkie cechy reakcji serologicznej z zachowaniem stosunków ilościowych między antygenem a przeciwciałami. Zależnie od swej wielkości i struktury, cząsteczka antygeny może wiązać do 150 drobin przeciwciał; każda cząsteczka przeciwciała natomiast może się łączyć z jedną, najwyżej z dwoma drobinami antygeny. Po splukaniu preparatu znakowane przeciwciała pozostają tylko w miejscach występowania antygeny. Preparat oglądany w mikroskopie fluorescencyjnym wykazuje jedynie struktury, zawierające antygen (Fot. 1 i 2). W odróżnieniu od reakcji serologicznych zachodzących w roztworach czy zawiesinach, w immunohistologii i immunocytoologii (takimi terminami określa się metodę opracowaną przez Coonsa) nie do-

chodzi do powstawania dużych skupisk reagującego materiału, tak charakterystycznych dla odczynu precipytacji czy aglutynacji. Schemat najprostszego odczynu znakowanych przeciwciał, tzw. reakcji bezpośredniej, przedstawia ryc. 1.

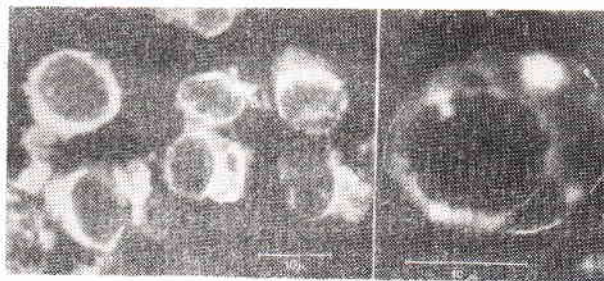


Ryc. 1. Wykrywanie antygeny metodą bezpośrednią

Bardziej złożoną modyfikacją tej metody jest tzw. odczyn pośredni. Przebiega on w dwu etapach. W pierwszym, preparat poddaje się działaniu nieznakowanych przeciwciał, czyli praktycznie biorąc nakrapla się go odpornościową surowicą. Przeciwciała łączą się z antygenem, jednak uwidocznienie powstałych kompleksów staje się możliwe dzięki drugiemu stadium reakcji, w którym preparat nakrapla się koniugatą, zawierającą znakowane fluorescencyjnie przeciwciała przeciw globulinom surowicy, użytej w pierwszym etapie. Jeśli np. preparat włoskowca różycy nakropiono w pierw surowicą odpornościową świni, to w drugim stadium należy użyć koniugaty, sporządzonej z surowicy innego gatunku zwierzęcia, np. królika, uodpornionego globulinami surowicy świni. Schemat reakcji przedstawia ryc. 2.

Metoda pośrednia daje silniejszą fluorescencję niż bezpośrednia. Pochodzi to stąd, że każda drobina przeciwciała pierwszego rzędu może wiązać więcej niż jedną drobinę koniugaty (schemat na ryc. 2 tego nie uwidacznia). Główną jednak zaletą tej metody jest możliwość stosowania jednej koniugaty do badania różnych antygenów. Jedynym warunkiem jest konieczność używania swoistych przeciwciał ze zwierząt tego samego gatunku.

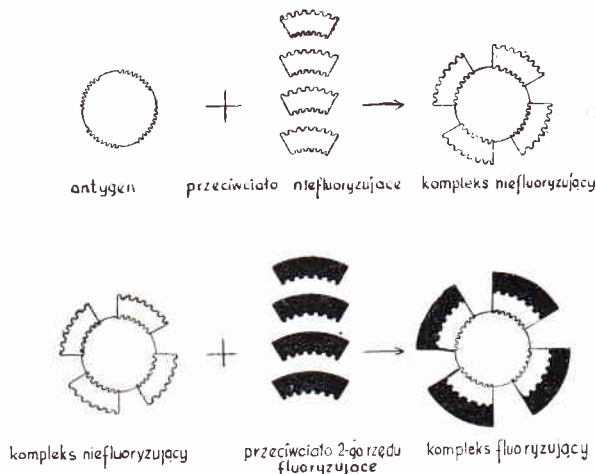
Szczególnym rodzajem pośredniej metody znakowanych przeciwciał jest odczyn polegający na uwidocz-



Fot. 1

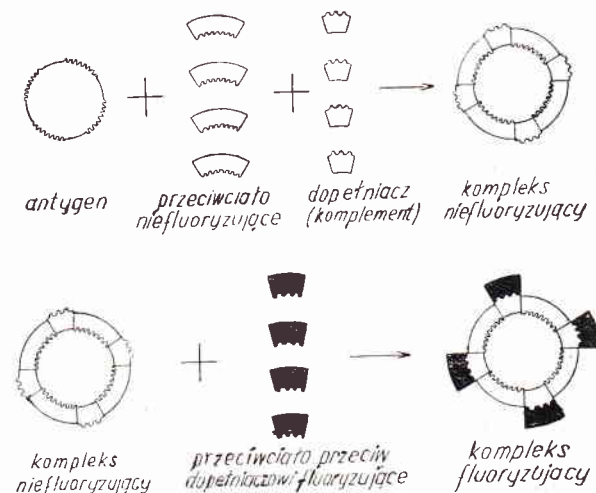
Fot. 2

Fot. 1. Antygen swoisty dla doświadczalnej limfomatozy kur, widoczny w całej zarodki komórek.
Fot. 2. Fluoryzujące ogniska tego samego antygeny w zarodki komórki, wykazującej początek podziału mitotycznego.



Ryc. 2. Wykrywanie antygenu metodą pośrednią

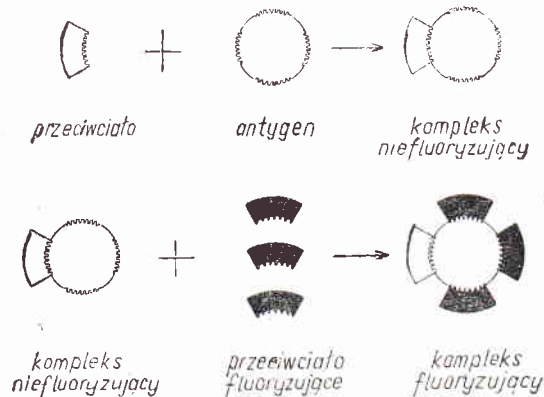
nieniu dopełniacza. Przed wykonaniem odczynu należy surowicę odpornościową podgrzać do 56°C w celu zniszczenia własnego dopełniacza, a następnie zmieszać ją ze świeżą surowicą świnki morskiej. Przy działaniu tej mieszaniny na preparat powstają kompleksy antygen — przeciwciało — dopełniacz świnki morskiej. Kompleksy te uwiadcniają się w drugim etapie reakcji przy pomocy koniugaty zawierającej znakowane przeciwciała przeciw dopełniaczowi świnki morskiej. Przebieg reakcji przedstawiono schematycznie na ryc. 3. Metoda ta umożliwiła stosowanie tej samej koniugaty do badania różnych antygenów, przy czym nie zachodzi konieczność używania surowic odpornościowych ze zwierząt tego samego gatunku. Metodę tę można stosować jedynie w tych reakcjach, w których występuje wiązanie dopełniacza.



Ryc. 3. Wykrywanie antygenu poprzez uwiadczenie dopełniacza

Metoda fluoryzujących przeciwciał znalazła również zastosowanie do wykrywania lokalizacji samych przeciwciał w komórkach. Bezpośrednia reakcja z użyciem znakowanych antygenów okazała się nieprzydatna. Niektóre antygeny trudno jest połączyć chemicznie z fluorochromami. Jeśli nawet takie połączenie jest możliwe, fluorescencja uzyskana tą drogą jest bardzo słaba. Preparaty nakrapla się zatem roztworem lub zawiesiną nieznakowanego antygenu, a następnie antygen ten, związany z przeciwciałami w tkankach uwiadcza się roztworem znakowanych przeciwciał. Przebieg reakcji przedstawia schemat na ryc. 4.

Przedstawiona metoda posiada wielkie znaczenie również dla medycyny weterynaryjnej. Szereg proble-



Ryc. 4. Wykrywanie przeciwciała (metodą pośrednią)

mów teoretycznych z dziedziny fizjologii, patologii, immunologii i mikrobiologii zostało wyjaśnionych dzięki tej metodzie. Ponadto stale wzrasta rola tej metody w praktyce weterynaryjnej, zwłaszcza w rozpoznawaniu niektórych schorzeń.

Wykrywanie antygenów wirusowych i bakteryjnych dla celów diagnostycznych i naukowo-badawczych

Wścieklizna

Goldwasser i Kissling (13) zakażali doświadczalnie myszy wirusem wścieklizny. Po wystąpieniu objawów klinicznych schorzenia zabijali je i sporządzali z przekrojów mózgu, przechodzących przez rogi Ammona, preparaty odciskowe. Preparaty utrwalano acetonem i barwiono znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami. W materiale z myszy szczepionych wirusem ulicznym stwierdzono silnie fluoryzujące twory odpowiadające ilościowo, a także rozmiarami i kształtem ciałkom Negriego. Przeprowadzone później barwienie tych samych preparatów metodą Shleifsteina wykazało, że rzeczywiście są to ciała Negriego. Poza tym w rozmazach występowały intensywnie fluoryzujące mniejsze twory o kształcie grudek lub obrączek, dla których trudno było znaleźć odpowiednik w preparatach barwionych inną metodą.

U myszy zakażonych wirusem ustalonym, u których ciała Negriego nie występują, obraz fluorescencyjny wykazywał tylko drobne skupienia antygenu pod postacią grudek, pyłków i obrączek.

Swoistą fluorescencję wykazywały też rozmazy ze ślinianek zarażonych naturalnym sposobem lisów, psów, krów i innych zwierząt. Badanie można było przeprowadzić nawet po 3-letnim przechowywaniu ślinianek w glicerolu.

U myszy zakażonych doświadczalnie można już po 24 godzinach wykazać w rozmazach mózgu swoistą fluorescencję (41). Dzięki temu możliwe jest szybkie rozpoznanie schorzenia poprzez wstrzyknięcie myszom materiału badanego w kierunku wścieklizny.

Nosówka psów

Schorzeniu poświęcono szereg badań z zastosowaniem metody znakowanych przeciwciał. Częściowy przegląd uzyskanych wyników podaje Coffin (7).

Dokładne badania patogeny schorzenia przeprowadzono na łasicach. Już w dwa tygodnie po donosowym, doświadczalnym zakażeniu zwierząt wirusowy antygen można było wykazać w szyjnych węzłach chłonnych. Następnie antygen pojawił się w węzłach śródpiersiowych i kręzkowych, w śledzionie, komórkach Browicz-Kupffera wątroby oraz w białych krwinkach. W tydzień po zakażeniu stwierdzono już antygen w komórkach nabłonkowych żołądka, jelita i skóry. Antygen występował początkowo pod postacią drobnych ziarnistości, które później zlewały się, tworząc fluoryzujące konglomeraty w zarodki lub jądro komórkowych,

odpowiadające wielkością i kształtem typowym dla nosówki ciałkom wrętowym. Po wystąpieniu klinicznych objawów schorzenia stwierdzono w białych krwinkach obecność swoiście fluoryzujących ziarnistości.

Naturalnie zakażone psy wykazywały przy użyciu tej metody podobne zmiany jak łasice. Występowały jednak różnice w natężeniu zmian w zakresie poszczególnych narządów. W mózgu chorych psów wirusowy antygen uwidaczniał się pod postacią fluoryzujących ziarnistości, względnie owalnych bryłek, leżących w ciałach komórkowych i wypustkach neuronów, jak również w komórkach ependymalnych i astrocytach. Przed pojawieniem się antygeny w samej tkance nerwowej stwierdzono jego obecność w ścianach naczyń krwionośnych mózgu. Wykazano również swoistą fluorescencję fuksynochłonnych ciałek wrętowych.

Metoda fluoryzujących przeciwciał została zastosowana do przyżyciowego rozpoznania nosówki. Badaniu poddaje się rozmazy ze spojówki oka psów, u których wystąpiła już gorączka. W rozpoznawaniu schorzenia *post mortem* bada się przy pomocy omawianej metody mrożone skrawki lub rozmazy z pęcherza moczowego, śledziony, płuc lub innych narządów.

Zakażne zapalenie wątroby u psów

Przy pomocy znakowanych przeciwciał wykazano obecność wirusa w ciałkach wrętowych, występujących w jądrach komórek wątrobowych oraz prześledzono proces tworzenia się tych ciałek (3). Najpierw pojawia się swoista fluorescencja w błonie jądrowej. Później wirus przedostaje się do wnętrza jądra powodując tworzenie się ciałek wrętowych. Wirusowy antygen wykazano ponadto w komórkach śródbłonki drobnych naczyń, zwłaszcza w obrębie płuc i mózgu.

Choroba Newcastle

Prince i Ginsberg (34) zakażali wirusem ND komórki guza puchlinowego Ehrlicha, po czym komórki te wstrzykiwali dootrzewnowo myszom. Za pomocą odczynu znakowanych przeciwciał można było już po paru godzinach stwierdzić wewnątrz tych komórek obecność swoistego antygeny. Objawiało się to intensywną fluorescencją licznych ognisk w zarodki komórek. Następnie komórki ulegały procesom wstecznym i rozplywowi. Antygen syntetyzowany wewnątrz zakażonych komórek był niezakaźny, nie aglutynował erytrocytów kury i nie wiązał dopełniacza w obecności homologicznych przeciwciał.

Wheelock i Tamm (44) zakażali hodowlę komórek HeLa omawianym wirusem i wykrywali swoisty antygen wewnątrz zakażonych komórek już po 3—3,5 godzinach od chwili zakażenia. Fluoryzujące ogniska znajdowały się tylko w zarodki, a nie było ich w jądrach komórek. Ogniska początkowo były małe, później powiększały się i wreszcie cała zaródka wypełniała się konglomeratami antygeny.

Ci sami autorzy (45) stosowali metodę Coonsa do oznaczania stężenia wirusa ND w zawiesinach. Zakażali oni hodowlę komórek HeLa badanymi zawiesinami wirusa. Po 10-godz. okresie inkubacji szkiełka z zakażonymi hodowlami barwiono pośrednią metodą znakowanych przeciwciał. Zakażone komórki wykazywały liczne, intensywnie fluoryzujące ogniska w zarodki. Metoda ta dawała zgodne wyniki z oznaczaniem stężenia wirusa drogą zakażenia zarodków kury oraz liczenia łąsinek w zakażonych hodowlach fibroblastów zarodka kury.

Pomór ptaków

Breitenfeld i Schäfer (4) badali namnażanie się wirusa pomoru w hodowli fibroblastów zarodka kury. Wykazali oni metodą fluoryzujących przeciwciał dwa antygeny wirusowe: antygen g oraz antygen hemaglutyninowy. Antygen g był stwierdzony już po trzech godzinach od zakażenia w obrębie jądra, później zaś występował on również w zarodki. Drugi z badanych

antygenów można było uwidocznnić w cztery godziny po zakażeniu. Występował on w całej komórce, wykazując największe stężenie w okolicy okołojądrowej. W późniejszym okresie antygen hemaglutyninowy gromadził się w obwodowej części komórek i zaznaczał swą obecność w nitkowatych wypustkach zarodki.

Mięsak Rousa

W skrawkach guzów pobranych od kur stwierdzono obecność swoistego antygeny w zarodki komórek nowotworowych. Przy użyciu znakowanych, indyceskich surowic odpornościowych uwidaczniały się w cytoplazmie mnogie ogniska o silnej fluorescencji. Natomiast odczyn z kurzymi surowicami odpornościowymi wywoływał równomierne świecenie całej zarodki. Jądra komórkowe w obydwu wypadkach pozostawały ciemne, lub tylko nieznacznie fluoryzowały (*Malmgren i in.*, 22).

Metodą fluoryzujących przeciwciał badano również proces namnażania się wirusa mięsaka Rousa w hodowli fibroblastów zarodka kury (35, 42). Już dwa dni po zakażeniu niektóre komórki wykazują obecność antygeny na powierzchni komórki, co objawia się fluorescencją obwodowej warstwy zarodki. W trzecim względnie czwartym dniu po zakażeniu komórki ztracają kształt typowy dla fibroblasta, przyjmując kulistą postać, charakterystyczną dla komórek mięsaka Rousa. W tym stadium można przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego zaobserwować odłączanie się materiału antygenowego z powierzchni komórki i przemieszczanie się go do otoczenia. Bezpośrednio po tym następuje proces syntezy wirusa w zarodki komórki, co objawia się silną fluorescencją całej cytoplazmy.

Białaczki drobiu

Grundboeck i wsp. (15) badali lokalizację swoistego antygeny w komórkach doświadczalnej limfomatozy u kurcząt. Rozmazy sporządzano zarówno z guzów pierwotnych, powstających w miejscach implantacji białaczkowego materiału, jak również z ognisk przerzutowych w wątrobie, śledzionie i innych narządach wewnętrznych. Komórki białaczkowe niezależnie od miejsca pochodzenia wykazywały intensywną fluorescencją całej zarodki (fot. 1). W niektórych komórkach występowały tylko mniej lub bardziej liczne, fluoryzujące ogniska w cytoplazmie (fot. 2).

Vogt i Rubin (43) badali namnażanie się wirusa mieloblastozy ptaków na fibroblastach zarodka kury. Swoista dla antygeny wirusowej fluorescencja została stwierdzona tylko w cytoplazmatycznej części komórki. Lokalizacja antygeny oraz czas uwidaczniania się go były podobne, jak w przypadkach zakażenia hodowli komórek wirusem mięsaka Rousa.

Metodę fluoryzujących przeciwciał zastosowano również do badania lokalizacji antygenów w erythroblastozie u kur (37).

Białaczka bydła

Tolle (40) poddawał rozmazy materiału białaczkowego odczynowi znakowanych przeciwciał. Stwierdził on przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego pozakomórkowo leżące, intensywnie świeące punkty. Wielkość ich wahała się od rozmiarów ledwie widzialnych do wielkości ziarniaka. Podobnie fluoryzujące punkty stwierdzono również w obrębie niektórych komórek, zwłaszcza limfocytów i czerwonych krwinek. Zdaniem *Tollego* te świeące grudki są skupieniami wirusa białaczki. Podobnych tworów nie można było stwierdzić w rozmazach krwi owcy, kozy, psa, królika ani świnki morskiej.

Przy pomocy tej samej metody badano u bydła poziom przeciwciał skierowanych przeciw białaczce. Badania przeprowadzono przy pomocy rozmazów krwi bydła z wyraźnymi objawami białaczki oraz przy pomocy rozmazów materiału białaczkowego z myszy, na które udało się przeszczepić bia-

łaczkę bydłą. Rozmazy poddawano działaniu badanej surowicy krwi, a następnie działaniu fluoryzującej koniugaty. Stwierdzenie fluoryzujących punktów w rozmazach świadczyło o obecności przeciwciał w badanych surowicach. Wykazano współzależność między zwiększoną ilością limfocytów a obecnością antygenu białaczkowego oraz występowaniem swoistych przeciwciał w krwi. W części przypadków stwierdzono dodatni odczyn fluorescencyjny w krwi, nawet wówczas, gdy badania obrazu krwi nie wskazywały na występowanie białaczki.

Brodawczaki u bydła

Smithies i Olson (36) wykazali obecność swojego antygenu w brodawczakach, występujących na skórze u bydła. Antygen objawił się fluorescencją jąder komórkowych w warstwach naskórka zawierających keratohialinę oraz w warstwach zrogowaciałych. Fluorescencji natomiast nie stwierdzono w wykazującej silny rozplam warstwie podstawowej naskórka, gdzie według domniemania wirus powinien się znajdować. Przypuszczalnie wirus występujący w *stratum germinativum* jest zbudowany głównie z kwasów nukleinowych, a zawiera niewiele białka i wskutek tego nie zaznacza tu swoich własności antygenowych.

Podobną lokalizację swojego antygenu wykazuje brodawczak króliczy (31).

Brucella

Swoistość odczynu pałeczek *Brucella* z fluoryzującymi przeciwciałami została wielokrotnie potwierdzona (18). Wszystkie badane szczepy należące do trzech typów pałeczki barwiły się intensywnie swoistą koniugatą, natomiast heterologiczne, gramdodatnie i gramujemne drobnoustroje, użyte jako kontrola, dawały reakcję ujemną.

Przy pomocy omawianego odczynu można wykazać brucele w rozmazach bardzo rozcieńczonych zawiesin, zawierających 2.5×10^8 żywych lub martwych pałeczek w 1 ml. Zanieczyszczenie zawiesiny innymi drobnoustrojami nie wywiera wpływu na czułość i swoistość odczynu (27).

Metoda znakowanych przeciwciał umożliwia bezpośrednio wykazywanie pałeczek w tkankach zwierząt, a nawet wewnątrz komórek. Obserwowano swoistą fluorescencję bruceli oraz skupisk swojego antygenu w komórkach otrzewnowego wysięku u świnki morskiej (17).

Metodę Coonsa zastosowano też do badania patogenezu schorzenia, wywołanego doświadczalnie u świnki morskiej przy pomocy *Brucella suis* (30). Charakterystycznym szczegółem było stwierdzenie pałeczek w segmentowanych granulocytach, które uczestniczyły w przenoszeniu czynnika chorobotwórczego do różnych narządów.

Salmonella

Łarionow i Kuźmin (21) znakowali barwnikami fluorescencyjnymi surowice odpornościowe przeciw *S. suipestifer*, *S. gartneri*, *S. wroclaw* oraz normalną surowicę końską. Uzyskanymi koniugatami działano na preparaty z ośmiu gatunków salmonel i czterech gatunków drobnoustrojów innego rodzaju. Każdy z badanych drobnoustrojów wykazywał dodatnią reakcję ze znakowaną homologiczną surowicą. Jedynie surowica przeciw *S. gartneri* obok odczynu swojego wywoływała również wyraźne odczyny nieswoiste; reagowała ona z pałeczkami *S. pullorum* i *S. gallinarum*. Autorzy podkreślają swoistość odczynu oraz jego przydatność do bezpośredniego wykrywania salmonel w patologicznym materiale oraz w hodowlach.

Mirolubowa (26) zaleca następującą metodę szybkiego wykrywania salmonel we krwi: 5—10 ml badanej krwi miesza się z 10-krotnie większą objętością płynnego podłoża. Po 6—18 godz. inkubacji w 37°C wiruje się hodowlę przez 10 min. przy 10 tys. obr./min. Z osadu sporządza się preparaty szkiełkowe, które poddaje się odczynowi fluoryzujących przeciwciał.

Thomson i in. (39) próbowali zastosować metodę Coonsa do wykrywania salmonel w próbkach kału. Metoda okazała się szybką i czułą, ale niestety nieswoista, a więc nieprzydatna do tego celu.

Różycyca świń

Darces i Groth (12) wykazali swoistość barwienia włoskowca różycy przy pomocy znakowanych przeciwciał.

Swoistość odczynu wykazali również Marshall i in. (23). Ze 150 szczepów drobnoustrojów innych niż włoskowiec różycy tylko jeden, *Bact. anitratum*, wykazał słabą reakcję z koniugatą, swoistą dla włoskowca. Przy pomocy omawianej metody autorzy wykazywali włoskowiec w preparatach z płynów wysiękowych oraz w preparatach odciskowych z narządów chorych zwierząt. Uzyskiwano również dodatni odczyn w preparatach mazanych krwi świń, dotkniętych posoczniciową postacią schorzenia. Komórki włoskowca uwiadczały się zarówno w osoczu, jak i wewnątrz komórek żernych. Autorzy stwierdzili, że w preparatach sporządzonych z narządów gotowanych przez godzinę można również uzyskać wyraźny, swoisty odczyn.

Wąglik

Cherry i Freeman (6) zastosowali znakowane przeciwciała do identyfikowania laseczek wąglika w hodowlach oraz w preparatach odciskowych z narządów zwierząt i ludzi. Metoda pozwalała na postawienie rozpoznania w godzinę od chwili sporządzenia preparatu. Odczyn nie był całkowicie swoisty, niemniej jednak okazał się bardzo użyteczny. Wartość jego podniósł fakt, że zwyczajne histologiczne utrwalanie i zatapienie w parafinie tkanek nie niszczy własności antygenowych laseczki. Preparaty zabarwione metodą Grama można odbarwić wkładając je na 10 min. do acetonu, a następnie wykorzystać do odczynu znakowanych przeciwciał.

Blagowieszczenskij i wsp. (2) prowadzili badania nad podniesieniem swoistości odczynu. Stwierdzili oni, że niepożądaną reakcję można usunąć adsorbując surowicę przeciwwąglikowe zawiesiną *Bac. anthracoides* i *Bac. pseudoanthracis*.

Leptospiry

Multon i Howarth (29) wykazywali *L. canicola* w nerkach zakażonych doświadczalnie chomików. Odczyn znakowanych przeciwciał uwiadczał podobną lokalizację drobnoustrojów, jak równolegle prowadzone badania histochemiczne.

Boulanger i Robertson (3) również używali metod immunofluorescencyjnych w odniesieniu do leptospir ze szczególnym uwzględnieniem *L. pomona*. Z 12 typów serologicznych leptosir wyhodowanych *in vitro* sporządzono preparaty, które następnie poddano działaniu znakowanych przeciwciał przeciw *L. pomona*. Silną fluorescencję wykazywały tylko rozmazy *L. pomona*. Słabą reakcję obserwowano w rozmazach *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. australis*, *L. hyos* i *L. autumnalis*. Szesć pozostałych serotypów wykazywało odczyn całkowicie ujemny. Koniugata sporządzona z surowicy królika, uodpornionej mieszaniną 10 serotypów rodzaju *Leptospira*, dawała intensywną, dodatnią reakcję z komórkami wszystkich użytych serotypów.

Przy pomocy znakowanych przeciwciał udało się wykazać *L. pomona* w moczu świń i cieląt oraz w preparatach odciskowych z nerek cieląt i chomików zakażonych doświadczalnie.

Ziarniaki

Moody i in. (28) sporządzili koniugatę, barwiącą wszystkie paciorkowce grupy A, nie reagującą natomiast z paciorkowcami grup B, C, D, F i G. Grupową swoistość koniugaty uzyskano adsorbując ją komórkami grupy C. Do odczynu używano preparatów sporządzonych z hodowli, jak również z wymazów z gardła.

Badania przeprowadzone na mniejszym materiale

wskazują, że można również sporządzić swoiste koniugaty dla paciorkowców z grupy B, C, D, F i G.

Także gronkowce były przedmiotem szeregu badań. Carter (5) uzyskiwał roztwory znakowanych przeciwciał, skierowanych przeciw typowi I gronkowca złocistego (koniugata I) oraz przeciw typowi II tego drobnoustroju (koniugata II). Przy pomocy tych dwu koniugat przeprowadzano odczyn z 218 koagulazododatnimi szczepami *S. aureus*. 201 szczepów wykazywało dodatni odczyn z koniugatą I. Natomiast z koniugatą II dodatnio reagowały wszystkie badane szczepy. W dalszych badaniach stwierdzono, że koagulazoujemne gronkowce nie dawały dodatniego odczynu z tymi koniugatami.

Poczyniono próby zastosowania koniugaty I i koniugaty II do badania próbek sera i mleka w proszku. Metoda okazała się bardzo czuła. Przy jej użyciu można było wykryć gronkowce koagulazododatnie nawet wówczas, gdy były one zabite na skutek procesów przetwórczych.

W tym miejscu należy wspomnieć, że pionierskie prace Coonsa i jego współpracowników nad metodą fluoryzujących przeciwciał dotyczyły wielocukrowych antygenów zawartych w pneumokokach.

Inne drobnoustroje

Przedstawione badania antygenów wirusowych i bakteryjnych stanowią jedynie fragment rozległego piśmiennictwa, dotyczącego zastosowania metody fluoryzujących przeciwciał w nauce i praktyce weterynaryjnej. Niemal codziennie ukazują się coraz to nowe publikacje z tej dziedziny. Można już spotkać doniesienia na temat wirusowej biegunki u bydła, pomoru świń, PPLO, gruźlicy, nosaczyny oraz wielu innych drobnoustrojów i schorzeń mniej lub bardziej groźnych dla hodowli. Ponadto powstała olbrzymia literatura przedstawiająca immunofluorescencyjne badania wirusów i bakterii chorobotwórczych dla człowieka. Szereg prac poświęcono również schorzeniom wywołanym przez rickettsiae, grzyby i pierwotniaki. Częściowe zestawienie wyników, uzyskanych przez różnych autorów zawierają artykuły Coonsa (10) i Beutnera (1).

Wykrywanie antygenów występujących fizjologicznie w tkankach

Metoda fluoryzujących przeciwciał znalazła zastosowanie w badaniach nad lokalizacją hormonów, enzymów i wielu innych substancji o charakterze antygenowym.

Marshall (24) wykazywał obecność adrenokortykotrofiny (ACTH) w zasadobłonnych komórkach przedniego płata przysadki mózgowej u świni. Analogiczne badania przeprowadzone nad siedliskiem hormonu wzrostowego w przysadce człowieka wykazały jego obecność w komórkach eozynochłonnych (20).

Yaeger i Anderson (47) badali lokalizację hialuronidazy w jądrach buhaja. Swoistą fluorescencję, świadcząca o obecności tego enzymu stwierdzono w obrębie kanalików nasiennych, w warstwie spermatocytów i spermatogonii. Hialuronidaza, znajdująca się głównie na powierzchni komórek, przyczynia się do rozluźnienia spoiwości tkanki; to pozwala na przemieszczanie się dojrzewających komórek do światła kanalików.

Dalszym przedmiotem badań był antygen Forssmana. Tanaka i Leduc (38) stwierdzili, że antygen ten występuje pod postacią kropelek w śródbłonku oraz przydankowej tkance łącznej naczyń krwionośnych we wszystkich narządach świnki morskiej, kota, psa, myszy i kury. W innych tkankach występowanie antygenu przedstawiało się rozmaicie u różnych gatunków zwierząt.

Humphrey (16) wykazał, że fluoryzujące przeciwciała skierowane przeciw trombocytom barwią swoiście nie tylko trombocyty, lecz również megakariocyty. Cytowany autor potwierdził tym samym słuszność poglądu Wrighta o pochodzeniu płytek krwi od olbrzymich komórek szpiku.

Omawianą metodę zastosowano również do uwidaczniania czynników grupowych w erytrocytach człowieka. Cohen i współpracownicy (9) zastosowali do tego celu nieco zmodyfikowany tok postępowania. Nie poddawali oni odczynowi utrwalonych preparatów szkiełkowych, ale przeprowadzali reakcję w zawieszynie. Dopiero po zakończeniu reakcji i przepłukaniu komórek kładli oni kroplę zawiesziny komórkowej na szkiełko podstawkowe i przykrywali ją szkiełkiem nakrywkowym. Badacze wykazali tą metodą antygeny swoiste dla czynnika A, B i Rh. Metoda pozwalała na rozróżnienie czynnika A₁ od czynnika A₂. Czerwone krwinki Rh — dodatnie podane dożylnie osobie Rh — ujemnej można było wykryć w jej krwiobiegu za pomocą immunofluorescencji w ciągu 20 dni. Udało się również wykazać w krwi Rh — ujemnych kobiet Rh — dodatnie erytrocyty płodowe w trzech ostatnich miesiącach ciąży.

W analogicznych badaniach przeprowadzonych przez Mateja (25) obok czynników grupowych A i B uwidaczniane były w krwinkach czynniki D, C i E. Badanie podgrup A₂ i A_x wykazało słabszą immunofluorescencję w porównaniu z krwinkami A₁. Przeprowadzono również badania nad sztucznymi, mieszanymi populacjami krwinkowymi. Stwierdzono, że immunofluorescencja może wykazać małe populacje, stanowiące nawet 1/10 000 część dużej populacji krwinkowej. Przy pomocy omawianej metody wykrywano krwinki płodu w krwi matki w ostatnich miesiącach ciąży oraz po porodzie. Również w krwi pępinowej noworodków znajdowano fluoryzujące krwinki, pochodzące prawdopodobnie od obcogrupowych matek. Matej poddawał odczynowi znakowanych przeciwciał głównie zawiesziny krwinek, podobnie jak uprzednio cytowani autorzy. Ponadto przeprowadzał on odczyn na rozmazach, utrwalonych w wysokiej temperaturze. Technika ta jednakże dawała pozytywne wyniki tylko w odniesieniu do czynników grupowych A i B.

Wykrywanie przeciwciał

Leduc i wsp. (19) badali proces wytwarzania przeciwciał przeciw anatoksynie błoniczej. Antygen wstrzykiwano królikom podskórnie, jednorazowo lub dwukrotnie. Obecność swoistych przeciwciał stwierdzono metodą immunofluorescencyjną najpierw w regionalnych węzłach chłonnych. Dodatni odczyn wykazywała zaródź dużych, niedojrzałych komórek, odpowiadających morfologicznie hemocytoblastom. Komórki te wykazywały silny rozplam, nabierając w następnych pokoleniach cech typowych dla proplazmocytoz i plazmocytoz. W miarę różnicowania się tych komórek wzrastała również fluorescencja ich zarodki. Po jednorazowym podaniu antygeny pojawiło się niewiele komórek plazmatycznych wykazujących zawartość przeciwciał. Po dwukrotnym podaniu antygeny komórki te występowały masowo. Swoistą fluorescencję o stosunkowo słabym nasileniu stwierdzono również w grudek chłonnych. Dodatnią reakcję wykazywały głównie niedojrzałe komórki w środkowej części grudek. Drobne ogniska fluorescencyjne w obrębie dojrzających, małych limfocytów były rzadkim zjawiskiem. Z badań wynika, że główną rolę w produkcji przeciwciał odgrywają komórki z szeregu plazmocytoz. Jeżeli limfocyty grają w tym procesie jakąkolwiek rolę, to jest ona bardzo nieznaczna.

White i in. (46) przeprowadzali analogiczne badania na świnkach morskich, wstrzykując im jako antygen albuminę z jaja kurzego wraz z adiuwantem, zawierającym wosk z prątką gruźlicy. Zawartość wosku w podawanym preparacie znacznie zmniejszała produkcję przeciwciał. Komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego intensywnie namnażające się w miejscu iniekcji nie wykazywały przeciwciał. Natomiast swoista dla przeciwciał fluorescencja występowała w komórkach plazmatycznych węzłów chłonnych, śledziony i wątroby.

Patterson i Suszko (33) przeprowadzali doświadczenia nad wytwarzaniem przeciwciał przez komórki

w hodowli tkanek. Uodporniali oni kurczęta albuminą z surowicy bydłowej, zabijali je, po czym komórki z ich śledzion hodowali *in vitro*. Po dwóch dniach hodowli stwierdzono w podłożu obecność przeciwciał. W tym czasie wykryto metodą immunofluorescencyjną przeciwciała w zarodki plazmocytołów oraz niektórych mniejszych komórek, trudnych do zidentyfikowania. Fluoryzowały ponadto niektóre makrofagi, prawdopodobnie na skutek wchłonięcia komórek wytwarzających przeciwciała. Po sześciu dniach hodowli tylko nieliczne komórki o nieregularnym kształcie wykazywały obecność przeciwciał. Równocześnie obniżył się poziom przeciwciał w podłożu hodowli.

Gammaglobuliny immunologicznie nieczynne mają podobne pochodzenie, jak przeciwciała. Otręga i Mellors (32) stwierdzili obecność tej frakcji białek w zarodki dojrzających i niedojrzających plazmocytołów, z których część zawierała ciałaka Rusella. Ponadto gammaglobuliny stwierdzono w komórkach, tworzących ośrodki namnażania grudek chłonnych. Komórki te autorzy określali terminem *intrinsic cells*.

Uwagi na temat techniki wykonania odczynu

Do odczynu fluoryzujących przeciwciał używa się podobnych surowic odpornościowych, jak do innych reakcji serologicznych. Do sporządzenia koniugaty stosuje się najczęściej roztwór czystych globulin. Użytkuje się je przez wytrącenie z surowic za pomocą siarczanu amonu lub etanolu na zimno.

Jednym z najlepszych barwników, używanych do piętnowania przeciwciał jest izotiocyjanian fluoresceiny. Synteza tego związku jest trudna. Dlatego lepiej posłużyć się handlowymi preparatami, produkowanymi przez szereg zagranicznych wytwórni.

Połączenie białka z fluorochromem odbywa się w roztworze o ściśle określonym stężeniu obydwu substratów i przy optymalnym dla tej reakcji pH. Proces musi przebiegać w temperaturze około 4°C i trwa on zwykle do 18 godzin. Preparaty barwnika adsorbowanego na celicie umożliwiają przeprowadzenie reakcji w znacznie krótszym czasie.

Roztwór znakowanych białek oczyszcza się zazwyczaj drogą dializy, która może trwać nawet kilka dni. Czas ten można skrócić stosując wytrącanie znakowanych przeciwciał z roztworu w punkcie izoelektrycznym. Bardzo szybko oczyszczenie można osiągnąć przy użyciu odpowiednich kolumn chromatograficznych. Dalsze oczyszczenie koniugat przeprowadza się zwykle adsorbując je proszkami z narządów.

Do odczynu używa się preparatów mazanych lub odciskowych, skrawków histologicznych lub szkiełek z hodowli tkanek. Szczególną przydatność do tej metody wykazują skrawki sporządzone za pomocą mikrotomu mrożeniowego.

W ogromnej większości preparaty trzeba przed odczynem utrwalić. Zależnie od rodzaju badanego antygeny, używa się do tego celu alkoholu etylowego, acetonu, formolu, wysokiej temperatury, rzadziej zaś innych czynników utrwalających.

Preparaty utrwalone, a następnie wksuszone nakrapla się surowicą lub koniugatą i umieszcza się je w komorze wilgotnej. Odczyn zwykle przebiega w temperaturze pokojowej i trwa około 30 minut. Po zakończeniu reakcji, jak również po pierwszym etapie odczynu pośredniego preparaty płucze się dokładnie fizjologicznym roztworem chlorku sodu, odpowiednio zbuforowanym. Po ostatnim płukaniu na preparat kładzie się kroplę zbuforowanego glicerolu oraz szkiełko nakrywkowe.

Bezpośrednio po sporządzeniu można oglądać preparat w mikroskopie fluorescencyjnym. Urządzenie do fluorescencji zostało opisane w osobnym artykule na łamach „Medycyny Weterynaryjnej” (14).

Przy stosowaniu metody fluoryzujących przeciwciał konieczne jest sporządzenie szeregu kontrolnych preparatów, mających świadczyć o swoistości uzyskanej fluorescencji. Autofluorescencję stwierdzamy, badając w mikroskopie fluorescencyjnym analogiczny preparat

nie poddawany działaniu żadnych przeciwciał. Inną niezbędną kontrolą jest obejrzenie identycznie barwionego preparatu, nie zawierającego czynnika, który jest przedmiotem badań. Np. dla preparatu z mózgu psa podejrzanego o wściekliznę, kontrolę stanowi preparat z mózgu zdrowego psa.

Przy użyciu bezpośredniej metody znakowanych przeciwciał dalszą kontrolę swoistości stanowi tzw. blokada reakcji za pomocą nieznakowanych przeciwciał. Kontrolę tę przeprowadza się w ten sposób, że preparat nakrapla się roztworem nieznakowanych przeciwciał, a następnie koniugatą zawierającą takie same przeciwciała związane z fluorochromem. Ujemny wynik barwienia przemawia za swoistością odczynu.

W metodzie pośredniej barwimy kontrolny preparat, używając w pierwszym etapie normalnej surowicy zamiast odpornościowej. I w tej kontroli odczyn powinien wypadać ujemnie. Swoistość reakcji można kontrolować ponadto na szereg innych sposobów, nie omawianych w tym miejscu.

Swoistość odczynów immunofluorescencyjnych przedstawia się podobnie, jak swoistość innych reakcji serologicznych. W pewnych warunkach zastosowanie metody fluoryzujących przeciwciał jest ograniczone na skutek występowania krzyżowych reakcji. Metoda ta jednak jest czuła i szybka a o jej przydatności i wartości świadczy najlepiej jej wielkie rozpowszechnienie w ciągu ostatnich lat.

Piśmiennictwo obejmujące 47 pozycji znajduje się u autora.

Грундбоэк М. МЕТОД ФЛУОРИЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ВЕТЕРИНАРИИ.

Автором описано применение флуоризирующих антител для обнаружения антигенов в тканях и клетках. Метод автора оказался пригодным для разрешения различных вопросов как патогенез заразных болезней, поведение введенных антигенов, синтез антител, синтез гормонов и т.п. В ветеринарии этот способ применяли при исследовании многих заразных и инвазионных болезней. Многие доклады касательно иммунофлуоресцентной окраски делают возможным использование упомянутого метода для диагностики.

Grundboeck M. — Fluorescent antibody method and its application in veterinary medicine.

The use of fluorescein-labelled antibodies to detect antigens in tissues and cells is presented. The method has provided useful contribution to the understanding of such diverse problems as the pathogenesis of infectious diseases, the fate of injected antigens, the formation of antibodies, the synthesis of hormones etc.

In the veterinary field, this method has been employed to study the numerous diseases, caused by viruses, bacteria, rickettsiae, fungi and protozoa. Many reports on the application of immunofluorescent staining deal with potential diagnostic uses of the method.

ČAVLEK B.: Warunki klimatyczne i ich przestrzeganie w komorach wędzarniczych. (Mikroklimatski uslovi i njihova kontrola u pušnicama). Tehnol. Mesa, 4, 7/8, 204—205 (1963).

Konserwujące działanie dymu zależy od jego fizycznych i chemicznych własności. Szybkość przebiegu reakcji osmotyczno-dyfuzyjnych podczas wędzenia jest uzależniona od koncentracji dymu, temperatury i wilgotności w komorze wędzarniczej, jak również od rodzaju wyrobu, jego struktury, składu chemicznego mięsa oraz obiegu powietrza w komorze i jej wentylacji. Największy wpływ na skład chemiczny dymu wywiera rodzaj użytego drewna i temperatura w jakiej jest spalane.

E. Zajaczkowski