

JERZY RZEDZICKI

Właściwości seroantygenu somatycznych wyciągów wielocukrowych *Mycobacterium avium*.

Cz. I. Aktywność w odczynie hemaglutynacji biernej (HAb)

Zakład Chorób Drobni Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: doc. dr S. STĘPKOWSKI

Wprowadzenie do serodiagnostyki gruźlicy odczynu hemaglutynacji biernej (28) oraz użycie jako antygeny uczulającego krwinki wielocukrowe (15) spowodowało zwiększenie zainteresowania badaczy frakcjami polisacharydowymi tuberkuliny i ekstraktów komórkowych.

Middlebrook (27) wyodrębnił z tuberkuliny frakcję, która zawierała 0,3% azotu i mniej niż 1% białka. Frakcja ta silnie uczulała krwinki w odczynie HAb nawet w stosunkowo niskich stężeniach 5×10^{-8} do 1×10^{-9} . Za charakterem wielocukrowym tej frakcji przemawiał fakt, że dokładnie oczyszczona adsorbowała się na krwinkach zwykłych, a nie adsorbowała się na krwinkach taninowanych (adsorbujących antygeny białkowe — 2).

Boyden i Sorkin (3) badając przesącz hodowli *M. tuberculosis* na obecność czynnika uczulającego krwinki wyizolowali dwie substancje. Termostabilną autorzy określili jako hemosensytynę alfa, termolabilną jako hemosensytynę beta.

Dla ustalenia właściwości seroantygenu prątków kwasoopornych większe znaczenie mają badania nad ich antygenami komórkowymi. Thurston i wsp. (40, 41) wykazali wyższą swoistość w odczynie zahamowania HAb antygenów somatycznych niż odpowiednich tuberkulin. Castelnuovo i wsp. (7) badając ekstrakty prątków kwasoopornych uzyskane z hodowli o różnym wieku oraz filtry tych hodowli, stwierdzili, że antygeny ekstraktów i filtratów są w zasadzie identyczne, przy czym liczba antygenów w ekstraktach była stała bez względu na wiek hodowli, natomiast liczba antygenów w filtratach była zmienna. Autorzy ci w oparciu o spostrzeżenia własne oraz innych badaczy (32) dochodzą do wniosku, że badania antygenów prątków gruźlicy powinny być przeprowadzane przy użyciu ekstraktów, a nie filtratów hodowli.

Aspektem praktycznym badań nad wielocukrami prątków kwasoopornych jest zagadnienie przydatności tych frakcji antygenowych w diagnostyce serologicznej gruźlicy u ludzi i zwierząt. Burtin i Kourilsky (6) wyrazili pogląd, że w reakcjach serologicznych przy gruźlicy zasadniczą rolę odgrywają frakcje wielocukrowe natomiast frakcje białkowe są mniej przydatne do tych celów. Foldes (9) w oparciu o odczyn HAb wykazał, że aktywność serologiczna ekstraktów prątków kwasoopornych jest wprost proporcjonalna do ilości

polisacharydów. Znaczenie wielocukrów jako czynnika aktywnego w odczynach serologicznych jest związane z rolą grup wielocukrowych w antygenie. Grupy wielocukrowe warunkują swoistość antygeny oraz swoistość reakcji antygen — przeciwciała (39).

Materiał i metody

Do badań użyto 3 szczepy *Mycobacterium avium* *) (Kirchberg, Kr-Pt, VII), 1 szczep *M. tuberculosis* (H37Rv), 1 szczep *M. bovis* (An5), 1 szczep *M. phlei* oraz 3 szczepy *M. smegmatis* (IG, *M. rabinovitschi*, *M. friburgensis* **).

Szczepy przechowywano w temp. +4°C na podłożu Loevensteina.

1. Namnażanie szczepów bakteryjnych.

Prątki namnażano na podłożu Soutona w temp. 37–39°C. *M. tuberculosis* i *M. bovis* inkubowano przez 8 tyg., *M. avium* przez 4 tyg., a prątki saprofityczne przez 1 tydzień.

2. Odtłuszczenie masy bakteryjnej.

Osad prątków po odwirowaniu i kilkakrotnym przepłukaniu pł. fizjol. i ochłodzonym acetonem suszono w temp. 45°C. Wysuszoną masę ekstrahowano w aparacie Soxhleta w temp. 35°C kolejno mieszaniną alkoholu i eteru (aa), chloroformem i mieszaniną alkoholu i eteru z dodatkiem 1% stęż. HCl. Przygotowaną w ten sposób masę bakteryjną użyto do sporządzania wyciągów antygenowych.

3. Otrzymywanie wyciągów antygenowych.

a) Dezintegraty ultradźwiękowe gotowane otrzymywano w oparciu o technikę podaną przez Togunową i wsp. (42). Odtłuszczone masę bakteryjną zawieszano w płynie fizjologicznym (30 mg/ml, homogenizowano, a następnie poddawano działaniu ultradźwięków w ciągu 1 godz. przy częstotliwości 2,0 MHz. Po odwirowaniu (16 tys. obr./min. przez 15 min.) płyn z nad osadu ogrzewano przy 100°C przez 1 godz. i ponownie wirowano (6 tys. obr./min. przez 15 min.). Klarowny płyn używano do badań.

b) Wyciągi formamidowe wg Fullera. Odtłuszczone prątki rozcierano z formamidem (0,2 ml formamidu na 30 mg prątków). Ekstrakcję przeprowadzono wg techniki podanej przez Mikulaszka (29).

c) Wyciągi fenolowe otrzymywano wg skróconej metody Westphala i wsp. (43).

d) Dezintegraty ultradźwiękowe trypsynowane sporządzano metodą Burtina i Kourilsky'ego z tym, że działanie trypsyny hamowano nasyconym roztworem węgla sodu przez alkaliczację do pH 12,0.

e) Wyciągi kwasowe wg Lancefield. Odtłuszczone masę bakteryjną zawieszono w 1/20 n HCl (30 mg/ml) i ekstrahowano wielocukier wg techniki podanej przez Mikulaszka (29).

f) Surowice odpornościowe uzyskiwano przez podskórne wstrzykiwanie królikom (z przerwami 1 tyg.)

*) Nomenklatura prątków wg Breda i wsp. (4) oraz Kwapińskiego (17).

***) Szczepie otrzymano z Vyzkumny Ustav Veterinarneho Lekarstvi Brno — CSSR, Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w Warszawie, Instytutu Weterynarii w Puławach, Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych WSR w Lublinie.

zawiesiny odłuszczonego prątków w oleju parafinowym (50 mg/ml) i iniekcje dożylnie zawiesiny odłuszczonego prątków w płynie fizjologicznym.

g) Surowice kurze pochodziły od 3 kur zakażonych gruźlicą sztucznie oraz od 7 kur zakażonych w warunkach naturalnych. Gruźlicę u tych ostatnich potwierdzono badaniem sekcijnym, mikroskopowym i hodowlanym.

h) Odczyn hemaglutynacji biernej (HAb) wykonywano wg techniki podanej przez Heina (11). Krwinki taniowano metodą opisaną przez Boydena (2).

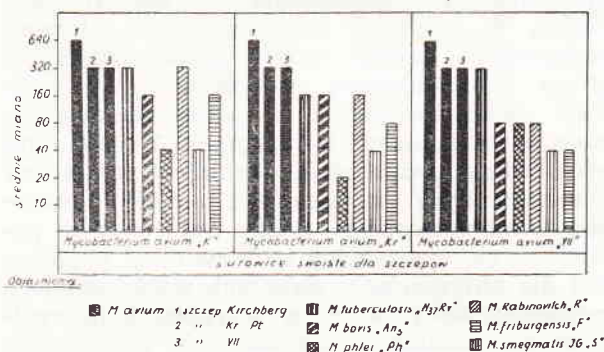
i) Analizę statystyczną wyników odczynu HAb z surowicami kurzymi wykonano przy pomocy testu chi kwadrat podając równocześnie prawdopodobieństwo „P” zaistnienia zaobserwowanych różnic w drodze przypadku. $P \leq 0,05$ różnice istotne, $P \leq 0,01$ różnice wysoce istotne, $0,05 < P \leq 0,10$ różnice niemal istotne, $P > 0,1$ różnice losowe.

Wyniki*)

1. Odczyn hemaglutynacji biernej z surowicami królików. Dezintegraty ultradźwiękowe gotowane (wyciągi DUG).

Szczepy *M. avium* VII i Kr-Pt reagowały z surowicami własnymi i heterologicznymi do miana 1:320, szczep Kirchberg 1:640. *M. tuberculosis* dawał dodatnie odczyn w mianach od 1:160 do 1:320, a *M. bovis* w mianach od 1:80 do 1:160. Z prątków kwasoopornych saprofitycznych najbardziej aktywny był *M. rabinovitschi*, który reagował od 1:80 do 1:160. Wyniki tych odczynów przedstawia schemat 1.

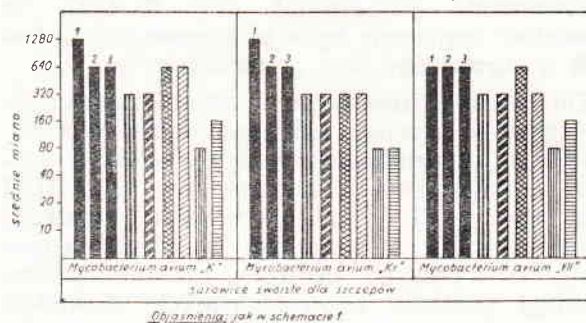
Schemat 1 Aktywność serologiczna dezintegratów ultradźwiękowych gotowanych z surowicami królików w odczynie hemaglutynacji biernej



Wyciągi formamidowe wg Fullera (wyciągi F).

Szczepy *M. avium* reagowały w mianie 1:1280 w mianie 1:640. *M. tuberculosis* i *M. bovis* wykazywały pozytywną reakcję do miana 1:320 z każdą surowicą. Z prątków saprofitycznych najaktywniejszym był wyciąg F *M. phlei*, tylko nieznacznie słabiej reagował *M. rabinovitschi* (schemat 2).

Schemat 2 Aktywność serologiczna wyciągów formamidowych wg Fullera z surowicami królików w odczynie hemaglutynacji biernej

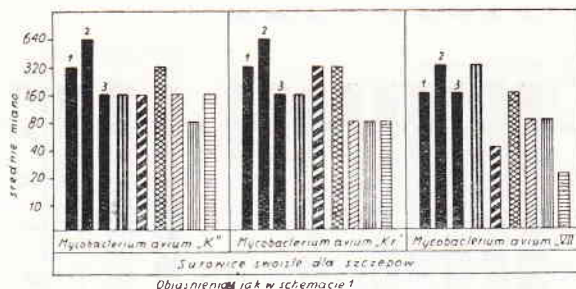


*) W celu bardziej syntetycznego ujęcia wyników badań odczynu HAb zastosowano w tekście skróty myślowe: „szczep N. reagował z surowicą ...” zamiast „krwinki opłaszczane wyciągiem antygenowym szczepu N... były zlepiane przez surowicę ...”.

Wyciągi fenolowe wg Westphala (wyciągi W).

W przypadku szczepów *M. avium* stwierdzono dwukrotnie pozytywny wynik odczynu do miana 1:640 (szczep Kr-Pt z surowicą własną i z surowicą dla szczepu Kirchberg). Miana pozostałych reakcji wahały się od 1:160 do 1:320, przy czym reakcje ze szczepem VII były najslabsze. Szczep *M. tuberculosis* reagował w mianie 1:320 oraz w mianie 1:160. *M. bovis* poza mianem 1:320 wykazywał również miano tylko 1:40. Z prątków saprofitycznych najsilniejsze reakcje wystąpiły w przypadku *M. phlei* (miano 1:320). Wyniki przedstawia schemat 3.

Schemat 3 Aktywność serologiczna wyciągów fenolowych wg Westphala z surowicami królików w odczynie hemaglutynacji biernej



Wyciągi kwasowe wg Lancefield.

Krwinki poddane opłaszczaniu wyciągami kwasowymi nie ulegały zlepianiu pod wpływem surowic królików hyperimmunizowanych.

Dezintegraty ultradźwiękowe trypsynowane.

Krwinki opłaszczane tymi wyciągami były zlepiane przez surowice królików zarówno przed jak i po hyperimmunizacji, co wskazywało na nieswoistość odczynu.

Wpływ taniowania krwinek na wysokość miana HAb.

Taniowanie krwinek powodowało równoległe podwyższenie miana o jedno lub dwa rozcieńczenia zarówno w odczynach właściwych (krwinki uczulone+sur. dodatnia) jak też w odczynach kontrolnych (krwinki nieuczulone+surowica dodatnia).

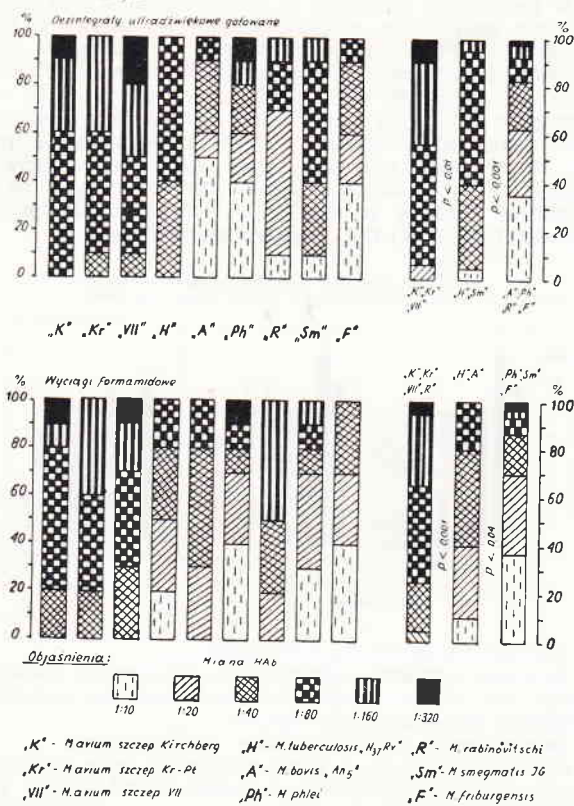
2. Odczyn hemaglutynacji biernej z surowicami kur gruźliczych.

Wysokość mian w odczynie HAb z surowicami kur gruźliczych oraz z wyciągami DUG i wyciągami F w opracowaniu statystycznym przedstawia schemat 4.

Omówienie wyników i dyskusja

Zainteresowanie badaczy wielocukrami prątków kwasoopornych jest niewątpliwie związane z właściwościami swobodnego reagowania tych elementów komórki bakteryjnej w odczynach serologicznych. W rozpoznawaniu gruźlicy ważną rolę odgrywa odczyn hemaglutynacji biernej. Według Bracco i wsp. (cyt. za 14) może on być wykorzystany nie tylko do wykrywania zakażeń ale także do oceny stopnia odporności humoralnej ustrojów zakażonych. Ślopek (39) uważa, że odczyn HAb jest 5—20 razy czulszy niż odczyn aglutynacyjny. Prace badawcze dotyczące zachowania się tego odczynu u ludzi są bardzo liczne (2, 3, 8, 18, 21, 24, 25, 26, 35, 41, 46). Zagadnienie to było również opracowywane u bydła (10, 11, 13, 19, 20, 23, 33, 34, 36), a także u psów (31, 37). Natomiast tylko nieliczni badacze zajmowali się odczynem HAb u ptaków (13, 38, 45) chociaż u drobiu, w odróżnieniu od ludzi oraz

Schemat 4. Analiza statystyczna wyników odczynu hemaglutynacji biernej z surowicami kurzymi.



zwierząt ssących, próba tuberkulinowa ma stosunkowo małą wartość diagnostyczną (13, 16, 22, 30). Najprawdopodobniej było to spowodowane tym, że dotychczas nie zostały bliżej określone właściwości seroantygenu wielocukrów *M. avium*. Hristoforov i Sivoski (13) wykazali w komórce *M. avium* (analogicznie jak w komórce *M. tuberculosis* i *M. bovis*) obecność aktywnych w odczynie HAb wielocukrów, brak jednak danych porównawczych nad antygenami wielocukrowymi *M. avium* sporządzonymi wg różnych metod. Z obserwacji Sorkina i Boydena (47) wiadomo, że różne wyciągi wielocukrowe prątków cechuje niejednakowa zdolność uczulania krwinek.

W badaniach własnych starano się ustalić aktywność w odczynie HAb pięciu różnych wyciągów sporządzonych z odtłuszczonych komórek *M. avium*; dwa z tych wyciągów uzyskano za pomocą metod fizykalnych, a trzy pozostałe drogą chemicznej ekstrakcji wielocukrów. Celem ustalenia stopnia swoistości wyciągów *M. avium* wykonano badania porównawcze z wyciągami prątków patogennych heterologicznych oraz kilku prątków saprofitycznych.

W badaniach wstępnych wykazano, że wyciągi kwasowe Lancefield nie uczulają krwinek a dezintegraty trypsynowane reagują nieswoiście i w związku z tym nie prowadzono z tymi wyciągami dalszych badań. Stwierdzono natomiast, że każdy z pozostałych wyciągów (wyciągi DUG, F i W) posiada zdolność

swoistego uczulania krwinek w odczynie HAb. Najbardziej aktywne okazały się przy tym wyciągi formamidowe *M. avium* (schemat 2). Wyciągi DUG uczulały krwinki silniej niż wyciągi fenolowe, a słabiej niż wyciągi formamidowe (schemat 1). Najniższą aktywność cechowała wyciągi fenolowe (schemat 3). Na ogół wyciągi *M. avium* (głównie DUG i F) przewyższały aktywnością analogiczne wyciągi prątków heterologicznych, aczkolwiek w szeregu prób te ostatnie wykazywały miana zbliżone (a w przypadku wyciągów fenolowych nawet wyższe) do mian uzyskiwanych z niektórymi szczepami *M. avium*. Występowanie pozytywnych reakcji krzyżowych pomiędzy surowicami swoistymi dla *M. avium*, a wyciągami prątków heterologicznych przemawia za istnieniem wspólnych antygenów wielocukrowych u wszystkich użytych do badań prątków.

Warto zaznaczyć, że występowanie odczynów z surowicami hyperimmunizowanych królików nie dawało gwarancji, że to samo zjawisko występować będzie z surowicami naturalnie zakażonych kur. Nie można bowiem wykluczyć możliwości, że pojawianie się w surowicach królików przeciwciał dla antygenów adsorbujących się na krwinkach mogło być związane z współdziałaniem innych czynników. W prątkach odtłuszczonych, którymi uodparniano króliki mogły zostać odsłonięte grupy determinujące, zamaskowane w prątkach nieodtłuszczonych z jakim stykają się ptaki w warunkach naturalnych; a poza tym wielokrotne uodparnianie królików, połączone z ustawicznym pobudzaniem układu siateczkowo-śródbłonkowego mogło spowodować pojawienie się w surowicy tych zwierząt przeciwciał dla antygenów o słabszych właściwościach immunogennych, które w warunkach naturalnych nie pobudzają wytwarzania przeciwciał. Wiadomo, że u osobników naturalnie zakażonych gruźlicą antygeny wielocukrowe pojawiają się we krwi w okresie przenikania prątków do tkanek i w tym czasie pobudzają one powstawanie przeciwciał. Okres ten jest jednak stosunkowo krótki, a po usadówieniu się prątków w tkankach do krwi przenika tylko niewielka ilość antygeny niewystarczająca do wytworzenia przeciwciał (35). Z tych to powodów konieczne było przeprowadzenie badań z surowicami kur gruźliczych.

Do badań z surowicami kurzymi zastosowano tylko te wyciągi antygenowe, które z surowicami hyperimmunizowanymi królików wykazały największą aktywność (wyciągi DUG oraz wyciąg F). Wyniki tych badań ilustruje schemat 4. Na ogół wyciągi *M. avium* reagowały w wyższych mianach niż analogiczne wyciągi prątków heterologicznych. Jednakże w szeregu przypadków te ostatnie wykazały reakcje dodatnie w takim samym lub nawet wyższym mianie niż wyciągi *M. avium*. Przypuszczalnie reakcje te były związane z zaka-

żeniami mieszanymi. Zakażenia takie u kur stwierdził Bojarski (1).

W celu ustalenia stopnia swoistości odczynu HAb z wyciągami *M. avium*, przeprowadzono obliczenia statystyczne w oparciu o wysokość mian w odczynie HAb, będące wskaźnikiem zdolności uczulania krwinek przez poszczególne wyciągi antygenowe. Wyodrębniono w obrębie uzyskanych wyników badań trzy grupy: 1) o mianach najwyższych, 2) o mianach pośrednich i 3) o mianach najniższych. Różnice wysokości mian pomiędzy poszczególnymi grupami okazały się statystycznie znamienne (schemat 4). Charakterystycznym było, że w grupie pierwszej znalazły się wszystkie szczepy *M. avium* (wyciągi DUG i wyciągi F), a ponadto jedynie wyciąg F *M. rabinovitschi*. Ten ostatni obok reakcji w mianach wysokich dawał reakcje w mianach bardzo niskich jakich nie stwierdzono z wyciągami F *M. avium*.

Wykazanie przy pomocy rachunku statystycznego dość dużej aktywności wyciągów DUG oraz wyciągów F *M. avium* w odczynie HAb z surowicami kur gruźliczych, wskazuje na możliwość wykorzystania tych wyciągów w serodiagnostyce gruźlicy drobiu. Niezbędne są jednak dalsze badania dla wyjaśnienia stopnia swoistości odczynu HAb z wyciągami *M. avium* w przypadkach zakażeń prątkami

heterologicznymi lub atypowymi. Z uwagi na to, że surowice kurze reagowały z badanymi wyciągami dość nieregularnie należałoby przy sporządzaniu wyciągów do celów diagnostycznych używać nie jednego lecz kilku szczepów *M. avium*.

Wnioski

1. Odtłuszczone komórki *M. avium* zawierają frakcje antygenowe wykazujące zdolność adsorbowania się na krwinkach i reagowania w odczynie HAb z surowicami uodpornionych *M. avium* królików oraz kur gruźliczych.

2. Wyciągi antygenowe prątków odtłuszczonych sporządzone wg różnych metod cechuje niejednakowa aktywność w odczynie HAb, przy czym szczególnie aktywne były wyciągi formamidowe.

3. Dezintegraty ultradźwiękowe gotowane i wyciągi formamidowe uzyskane z *M. avium* wykazały w odczynie HAb z surowicami kur gruźliczych wyższą (statystycznie znamioną) aktywność niż analogiczne wyciągi *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. phlei*, *M. smegmatis* IG, *M. friburgensis*, a częściowo także *M. rabinovitschi*.

Piśmiennictwo w liczbie 47 pozycji u autora.

Adres autora: dr Jerzy Rzedzicki, Lublin, ul. Akademicka 11.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

LECH JAŚKOWSKI, JÓZEF ROMANIUK, JERZY MAJEWSKI *)

Badania nad występowaniem wrodzonych anomalii reprodukcyjnych u buhajów aukcyjnych w województwie bydgoskim

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Inseminacji, Instytut Weterynarii w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr L. JAŚKOWSKI

Szerokie zastosowanie sztucznego unasienienia zmniejszyło znacznie liczbę buhajów użytkowanych do rozplodu, co z kolei zwiększyło szanse spokrewnienia pogłowia objętego inseminacją, z jego dodatkimi i ujemnymi skutkami. Pewne sygnały, które pojawiły się w ostatnich latach wskazywały, że odsiew młodych buhajów z powodu nieprzydatności rozplodowej wzrósł. Rosłanowski i Wyszczanowski w 1965 r. odrzucili na 537 przebadanych buhajów, 19 z powodu anomalii anatomicznych układu płciowego, i 20 wskutek obniżonej jakości nasienia. Również nasze spostrzeżenia z lat 1963—4 wskazywały na powolny lecz stały wzrost liczby buhajów od-

rzucanych na aukcjach wskutek różnych wad reprodukcyjnych. W celu dokładnego przeanalizowania tego zagadnienia podjęliśmy w latach 1965—67 szczegółowe badanie wszystkich buhajów zgłaszanych na aukcję w województwie bydgoskim, ze szczególnym uwzględnieniem ich przydatności rozplodowej.

Materiał i metody

Badaniu poddano 658 buhajów w wieku 10—18 miesięcy (przeciętnie 13,5 miesiąca). Każdy buhaj podlegał szczegółowemu badaniu klinicznemu narządów płciowych, ocenie zachowania płciowego, zdolności kopulacyjnej oraz jakości nasienia.

Ocenę zachowania płciowego opierano na 3 stopniowym określeniu libido, według schematu podanego przez Bielańskiego (3). Przy ocenie zdolności kopulacyjnej zwracano szczególną uwagę na zdol-

*) Z Państwowego Zakładu Unasieniania Zwierząt w Bydgoszczy.