

ZOFIA KAPP, EDWARD NOLEWAJKA, KRYSZYNA PAWLAK, JERZY SZAFLARSKI

Przydatność wybranych odczynów serologicznych w diagnostyce fasciozy u bydła*) I. Precypitacja w żelu agarowym

Katedra Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej
Zabrze — Rokitnica
Kierownik: prof. dr J. SZAFLARSKI

Jedną z metod rozpoznawczych fasciozy u bydła może stanowić wykrywanie w surowicy krwi zwierzęcia przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowo czynnym składnikom pasożyta. Obok białek działanie immunizujące wykazały polisacharydy i mukoproteiny *Fasciola hepatica* (5, 7, 8, 9). Dotychczas nie ma jednomyślności co do przydatności poszczególnych odczynów serologicznych w diagnostyce fasciozy. Wydawało się więc celowym zastosowanie wybranych odczynów serologicznych do wykrywania przeciwciał powstających w fasciozie naturalnej.

Przedmiotem niniejszego doniesienia jest określenie przydatności odczynu precypitacji w żelu agarowym do wykrywania przeciwciał przeciwko *Fasciola hepatica* przy użyciu następujących antygenów: a) pełnego wyciągu z pasożyta, g) frakcji polisacharydowej, c) frakcji mukoproteinowej.

Materiał i metody

Materiał do badań serologicznych stanowiły surowice bydła, u którego w czasie uboju stwierdzano motylicę. Pobrane surowice w ilości 113 próbek po sklasyfikowaniu w zależności od charakteru zmian i intensywności inwazji przechowywano w temp. -20°C . Do badań kontrolnych pobrano 45 próbek surowic zwierząt zdrowych.

W celu uzyskania antygeny pełnego somatycznego ekstrahowano, sproszkowaną masę motylicy wątrobowej, płynem fizjologicznym (10% zawiesinę suchej masy motylicy wątrobowej w soli fizjologicznej trzymano w temp. $+4^{\circ}\text{C}$ przez 9 dni okresowo wstrząsając). Tak przygotowany wyciąg poddawano wirowaniu; płyn nad osadu stanowiły pełny antygen i materiał wyjściowy do wyizolowania frakcji mukoproteinowej.

Mukoproteiny otrzymywano każdorazowo z 5 ml 10% wyciągu wodnego. Po odbiałczeniu materiału 20% kwasem sulfosalicylowym (1) wytrącano z roztworu mukoproteiny przez dodanie 2 cz. 95% etanolu. Otrzymany osad rozpuszczano w stałej objętości soli fizjologicznej.

Polisacharydy otrzymywano wg metody podanej przez Hoppe-Seyler (4) każdorazowo z 1 g suchej masy motylicy dodając 25 ml roztworu do trawienia białek (3). Taką mieszaninę inkubowano w temp. $60-75^{\circ}\text{C}$ przez 10–12 godz. Po odwirowaniu płyn nad osadu dializowano wobec 0,9% NaCl przez 48 godz. Następnie materiał ponownie wirowano i wytrącano polisacharydy przez dodanie 2 cz. 95% etanolu.

Przeciwciała wykrywano metodą precypitacji w żelu agarowym wg Ouchterlony'ego (6). Używano 1,5% agaru Bacto-Difco w zbuforowanej soli fizjologicznej o pH 7,2–7,4. Odległość między basenami wynosiła 0,7 mm. Średnica basenu dla surowicy

10 mm, dla antygeny 5 mm. Po nastawieniu odczynu płytki umieszczano w komorze wilgotnej w temp. pokojowej. Brak linii precypitacyjnych po 7 dniach od nastawienia odczynu traktowano jako wynik ujemny.

Przebieg doświadczeń i wyniki

Na początku doświadczeń wykonywano precypitację w żelu agarowym używając jako antygeny pełnego wyciągu z motylicy wątrobowej w 4 kolejnych rozcieńczeniach. Precypitację stwierdzono w przypadku 61 surowic, co stanowi 53,9% badanego materiału. Surowice zwierząt zdrowych nie precypitowały używanego antygeny.

Wśród surowic dodatnich zauważono różnice w ilości i intensywności linii precypitacyjnych. Największą ilość linii stwierdzano w przypadku dużej inwazji pasożyta.

Surowice wykazujące dodatni odczyn precypitacji w żelu agarowym z pełnym antygenem badano następnie używając jako antygeny frakcji polisacharydowej i mukoproteinowej. Wyniki zamieszczono w tab. 1.

Surowice pochodzące od zwierząt, u których obserwowano dużą inwazję pasożyta i zmiany stare (zwapnienia) wykazywały wyższy odsetek wyników dodatnich (78,1%) niż w przypadku zmian świeżych i nieznacznym stopniu inwazji (43,9%).

Omówienie wyników

W przedstawionej pracy wykorzystywano odczyn precypitacji w żelu agarowym do wykrywania w surowicy bydła chorego na fasciozę przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom *Fasciola hepatica*.

Przy użyciu jako antygeny 10% wyciągu z pasożytów sporządzonego przy pomocy soli fizjologicznej dodatnie wyniki uzyskano w 53,9%. Frakcja polisacharydowa była precypitowana przez 50,4%, a frakcja mukoproteinowa przez 42,5% surowic. Wynika z tego, że zastosowanie frakcji polisacharydowej w bardzo niewielkim stopniu obniża odsetek wyników dodatnich. Niższy odsetek wyników dodatnich otrzymywano z frakcją mukoproteinową. Szczególnie uwydatnia się to w przypadku dużej inwazji pasożyta oraz w przypadku chronicznego procesu (zwapnienia). Znalazłyby tutaj potwierdzenie wyniki badań Gundlacha (3), który w eksperymentalnej fasciozie królików stwierdził największą aktywność antygenów pełnych i wielocukrowych. Zdaniem tego autora takie antygeny mogłyby znaleźć zastosowanie w serologicznej diagnostyce fasciozy. Antygen pełny i wielocukrowy wykorzystywane w przedstawionej pracy były izolowane innymi metodami i dlatego nie można stwierdzić ich

*) Praca finansowana przez Komitet Parazytologiczny PAN.

Tab. 1. Dodatnie wyniki w odczynie precypitacji w żelu agarowym z surowicami bydła chorego na fasciozę w zależności od użytych antygenów i charakteru obserwowanych zmian

Ilość zwierząt z fasciozą			Intensywność inwazji				Zmiany			
113 sztuk			duża 51 sztuk		mała 62 sztuki		świeże 58 sztuk		chroniczne 55 sztuk	
Rodzaj antygeny	Ilość +	+ %	Ilość +	% +	Ilość +	% +	Ilość +	% +	Ilość +	% +
Pełny antygen	61	53,9	32	62,7	29	46,8	24	41,4	37	67,3
Polisacharady	57	50,4	30	58,8	27	43,5	22	37,9	35	63,6
Mukoproteiny	48	42,5	22	43,1	26	41,9	20	34,5	28	50,9

identyczności z antygenami otrzymywanymi przez Gundlacha (3). Analizując wyniki otrzymane przy użyciu pełnego antygeny, stwierdzono, że w przypadku dużej intensywności inwazji i chronicznego procesu odsetek dodatnich wyników był znacznie wyższy i wynosił 78,1%, a w przypadku małej inwazji i zmian świeżych wynosił 43,9%.

Capron i wsp. (2) badając dynamikę zjawisk odpornościowych w eksperymentalnej fasciozie królików stwierdzili wcześniejsze pojawianie się przeciwciał precypitujących w przypadku zakażenia większą dawką inwazyjną. Klimienko (5) posługiwał się odczynem precypitacji w żelu agarowym w eksperymentalnej fasciozie owiec. We wcześniejszych stadiach zakażenia obserwował większą ilość linii precypitacyjnych, w późniejszych okresach ich ilość ulegała zmniejszeniu. Autor tłumaczy to istnieniem antygenów specyficznych dla określonego stadium rozwojowego pasożyta. Po usadowieniu się pasożyta w przewodach żółciowych np. mukoproteiny miałyby tracić znaczenie jak czynnik antygenowy.

Podsumowując otrzymane rezultaty należałoby podkreślić stosunkowo niski odsetek wyników dodatnich uzyskiwanych przy stosowaniu odczynu precypitacji w żelu agarowym.

Dalsze badania nad wykorzystaniem innych odczynów serologicznych są w opracowaniu.

Piśmiennictwo

1. Brdicka R.: Research 1, 25, 1947.
2. Capron A., Rose G., Luffau G., Biguet I., Rose F.: Rev. Immunol. 29, 1965.
3. Gundlach J. L.: Badania nad aktywnością serologiczną antygenów *Fasciola hepatica* L. i zjawiskiem odpornościowym w przebiegu doświadczalnej fasciozy królików. Praca doktorska, Lublin, 1969.
4. Hoppe-Seyler F.: Thierfelder, t. 2. Springer Verlag, 1960.
5. Klimienko W. W.: Wlad. parazyt. 14, 707, 1968.
6. Ouchterlony O.: Arkiv Kemi Miner. Geol. B. 26, 1, 1948.
7. Sewell M. M. H.: Immunology 7, 671, 1964.
8. Spuchler V., Moosbrugger G. A.: Schweizer Arch. Tierheilk. 100, 1958.
9. Szaflarski J., Dudziak Z., Kapp Z., Szurman J.: Proc. 17-th World Congr. Hannover 1, 789, 1963.

Adres autora: dr Zofia Kapp, Zabrze — Rokitnica, ul. K. Marksa 19, Katedra i Zakład Mikrobiologii Śląskiej AM.

Камп З., Нолевайка Э., Павлак К., Шафлярски Е. — Пригодность избранных серологических реакций для диагностики фасциоза крупного рогатого скота. I. Метод иммунодиффузии.

Сыворотки 113 животных больных фасциозом по методу иммунодиффузии в геле агара с разными фракциями антигенов *Fasciola hepatica*. Применяя полный антиген положительные результаты получили в 53,9%. Установили зависимость количества положительных результатов от интенсивности и времени существования инвазии. При применении в качестве антигенов полисахаридовой или мукопротеиновой фракции *Fasciola hepatica* процент положительных результатов был ниже чем при полной антигене.

Kapp Z., Nolewajka E., Pawlak K., Szaflarski J. — Usefulness of chosen serological reactions in the diagnosis of fasciolosis in cattle. I. Precipitation in agar gel.

Sera of 113 animals suffering from fasciolosis were examined by means of different antigenic fractions of liver fluke in agar gel precipitation test. The positive results with full antigen were obtained in 53.9%. The correlation between the intensity of invasion, duration of the disease and the number of positive findings was noted. There were obtained a lower percentage of positive findings with polysaccharidic mucoproteic fractions.

MIERGIEL I. W.: Należy polepszyć naturalne oświetlenie pomieszczeń dla zwierząt. (Ułuczysz jestestwiennemu oświeczennost' żywotnowodczeskich pomieszczenij). Wietierinaria (Moskwa), 47, 12, 14—15, 1970.

W okresie stałego przebywania krów w oborze (od października do sierpnia następnego roku) zbadano różne parametry odporności ustroju i wydajność mleka przy różnej intensywności oświetlenia pomieszczeń: K — 149 luksów (wskaźnik geometryczny okien 1:14), DI — 15 luksów (1:44) i DII — 9 luksów (1:72).

Stwierdzono, że wydajność mleka w grupie K była o 172 kg (9,5%) wyższa niż w grupie DII. Na wytwarzanie 100 kg mleka u krów w grupie K zużyto 108 j. pokarmowych, a w grupie DII — 119 j. Aktywność fagocytarna leukocytów neutrofilnych była wyraźnie wyższa w grupie K. Jeśli np. indeks fagocytarny grupy K w maju przyjąć za 100% to w grupie DI wynosił on 69,5%, a w grupie DII — 75,7%. Ilość ogólnego białka surowicy w końcu okresu oborowego zmniejszyła się u zwierząt DI o 7% i DII — o 3%.

Autor wyraża pogląd, że dobre oświetlenie naturalne na poziomie 149 luksów (1.27% KEO — wskaźnik geometryczny 1:14) jest potrzebne nie tylko w celu podtrzymania wysokiej odporności ustroju ale także z punktu widzenia ekonomiki.

T. J.