

76—86%, 52—75% and about 50% of cases, respectively. When tonsils were used (frozen slices technique), only 3—7% of the investigated tonsils gave doubtful results. In this case either the second pig from the same farm ought to be investigated, or the fluorescent antibody-cell culture test must be performed. In pigs protectively vaccinated by the use of the attenuated strain of hog cholera virus (china

strain) the virus was revealed only in tonsils 5—7 days since the time of vaccination. The virus was not detected in pigs protectively vaccinated by means of CVV. There were also discussed the findings of the investigations in relation to the observed anatomopathological lesions and the results of bacteriological examinations.

ZDZISŁAW GLIŃSKI

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Streptococcus pluton*. V. Analiza immunochemiczna

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr S. WOŁOSZYN

Najdokładniej poznanym fizyko-chemicznie kompleksem antygenowym paciorkowców są struktury powierzchni komórki, głównie ściana komórkowa. Wiąże się to z łatwością izolowania serologicznie aktywnych składników ściany komórkowej prostymi metodami fizyko-chemicznymi oraz z faktem, że u większości paciorkowców ściana komórkowa i jej struktury powierzchniowe są siedliskiem antygenów grupowo i typowo specyficznych (26). W przypadku paciorkowców z grupy D antygen grupowo swoisty zbudowany z kompleksu kwasu glicerynoteichowego (33, 34) występuje we frakcji błony cytoplazmatycznej komórki (11). Swoistość serologiczną tego antygeny determinują węglowodany łańcucha bocznego kompleksu, który w przypadku *Str. faecalis* jest zbudowany z koibjozy, a w przypadku *Str. faecium* z koitrijozy (34). Antygeny typowo specyficzne paciorkowców z tej grupy, w większości o naturze węglowodanowej, stanowią integralny składnik ściany komórkowej (6, 35).

Pewne światło na skład jakościowy węglowodanów i aminokwasów paciorkowców z grupy D rzuciły badania Cumminsa i Harrisa (5), Jones i Shattock (11), Saltona (26), Coleman i Williamsa (4) oraz Ikawa (10).

Jednakże dopiero Kane i Karakawa (12) wyjaśnili rolę poszczególnych cukrów prostych w determinowaniu swoistości serologicznej antygenów polisacharydowych ściany komórkowej. Autorzy ci w oparciu o odczyn zahamowania precypitacji ilościowej i wyniki analizy chromatograficznej hydrolizatów ściany komórkowej wykazali, że N-acetylglukozamina odgrywa zasadniczą rolę w determinowaniu swoistości serologicznej *Str. bovis*.

Badania nad składem jakościowym antygenów typowo specyficznych o naturze węglowodanowej paciorkowców z grupy D miały również na celu określenie determinant ich swoistości serologicznej. Na szczególną uwagę zasługują badania Elliott (6), Bleiweis i Krause (3) oraz Willers i Michel (35). Elliott (6) określił skład jakościowy antygeny typowo swoistego

Str. faecalis i *Str. faecalis var. durans*, Bleiweis i Krause (3) w oparciu o odczyn zahamowania precypitacji ilościowej stwierdzili, że alfa-d-glukoza względnie alfa-d-N-acetylglukozamina determinują swoistość antygeny typowo specyficznych *Str. faecalis*, zaś Willers i Michel (35) wykazali, że w przypadku 4 antygenów typowo specyficznych *Str. faecalis* N-acetylglukozamina, N-acetylgalaktozamina oraz odpowiadające im heksozy są głównymi inhibitorami zahamowania odczynu precypitacji ilościowej.

W związku z występowaniem wspólnych komponent antygenowych u *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* (8) oraz brakiem w dostępnym piśmiennictwie prac odnośnie składu chemicznego ściany komórkowej, antygenów grupowo i typowo specyficznych *Str. pluton* postanowiono:

1. Określić skład jakościowy aminokwasów i cukrów ściany komórkowej oraz cukrów zawartych w wyciągach wg Lancefield i Fullera *Str. pluton* i porównać go ze składem analogicznych preparatów otrzymanych ze szczepów *Str. faecalis* i *Str. bovis*.

2. Potwierdzić immunochemiczną podstawę swoistości antygeny grupowo swoistego paciorkowców z grupy D i określić determinanty swoistości serologicznej antygeny typowo swoistego *Str. pluton* o naturze węglowodanowej.

3. Przeprowadzić analizę absorpcyjną w podczerwieni preparatów ściany komórkowej oraz serologicznie aktywnych wyciągów polisacharydowych badanych drobnoustrojów w celu określenia ewentualnych podobieństw lub różnic. Zdaniem niektórych badaczy analiza w podczerwieni (22, 24, 27) umożliwi określenie poszczególnych rodzajów, gatunków a nawet typów drobnoustrojów.

Materiał i metody

Do badań użyto 6 szczepów *Str. pluton* (1, 10, 18, M, S, Z), 2 szczepy *Str. faecalis* (I, M) i *Str. bovis* 503. Źródła pochodzenia szczepów i metody namnażania podano w poprzedniej części pracy (8). Wyciągi wielocukrowe F sporządzono wg metody Krause i McCarty (15) i oczyszczono wg Homma i Suzuki (9) Hapteny wg Lancefield otrzymano wg oryginalnej metody (16), oczyszczono przez wytrącanie acetonem

i etanolem (6) oraz chromatograficznie wg Michel i Kraussa (19). Preparaty ścianny komórkowej sporządzono wg Cummins i Harrisa (5). Skład jakościowy aminokwasów w hydrolizatach ścianny komórkowej (6 n HCl, 105°C — 24 godz.) oznaczono elektrochromatograficznie (1, 23). Elektroforozę wykonano w buforze o składzie: kwas mrówkowy 2,8%, kwas octowy 7,8% (1:1), pH 2,3 w ciągu 90 min. przy gradientcie napięcia 18—20 V/cm paska bibuły, zaś chromatogramy rozwijano w układzie n butanol I rz.-kwas octowy-woda (4:1:1) trzykrotnie przez około 18 godz., względnie w układzie fenol-woda (7:3), jednorazowo przez około 20 godz. Chromatogramy wywoływano 0,2% acetonowym roztworem ninhydryny (temp. pokojowa — 12 godz., 105°C przez 5 min.). Poszczególne plamy identyfikowano przy pomocy mapy aminokwasów i tzw. „metody świadka”. Obecność prolina potwierdzono wybarwiając elektroforegramy 0,2% acetonowym roztworem izatyny (21), zaś histydyny i tyrozyny przy pomocy wybarwienia odczynnikami Paule'go-Ehrlicha.

Analizę cukrów wykonano wg metody chromatografii cienkowarstwowej wstępującej na zbuforowanej ziemi okrzemkowej z gipsem (GF-254 Merck) (31). Chromatogramy rozwijano w układzie n butanol-bufor fosforanowy 0,1 M, pH 4,8 -aceton (4:1:5) w ciągu 1 godz. W celu rozdzielenia amino-cukrów i N-acetyloheksosamin stosowano jako nośnik żel krzemionkowy G przy czym chromatogramy rozwijano w układzie: n propanol-octan etylu-woda (5:4:1), dwukrotnie po 1 godz. Do identyfikacji cukrów stosowano alfa-naftol (100°C — 6 min.), zaś do identyfikacji aminocukrów odczynnik Elson-Morgana (7).

Oznaczono skład jakościowy cukrów zawartych w hydrolizatach ścianny komórkowej oraz w wyciągach wg Lancefield i Fullera. W zależności od kierunku badań materiał hydrolizowano 4 n H₂SO₄ (8 mg suchej masy na 1 ml kwasu (w zatopionych ampulkach przez 2 godz. w temp. 105°C, lub w 0,1 n HCl) 3 mg suchej masy/0,15 ml kwasu (w zatopionych ampulkach na łaźni wodnej w temp. 100°C przez 10, 20, 60 i 180 min.) (13). Próbkę po rozpuszczeniu w pirydynie nanoszono na płytki w ilości 10 i 15 µl. Poszczególne cukry identyfikowano na podstawie mapy cukrów przez porównanie wielkości R_f oraz za pomocą tzw. „metody świadka”. Dodatkową pomocą przy wykrywaniu N-acetyloaminocukrów i aminocukrów było zabarwienie plam po wywołaniu chromatogramów odczynnikami Elson-Morgana.

Do analizy absorpcyjnej w podczerwieni użyto oprócz preparatów ścianny komórkowej odwodnione acetonem i wysuszone w próżni ekstrakty wg Fullera (2 mg suchej masy/100 mg KBr). Oznaczenia wykonano na spektrofotometrze Unicam SP-200 w zakresie długości fal 4000-400 cm⁻¹ stosując jako nośnik Nujol (2) i uwzględniając przesunięcie widma charakterystyczne dla użytego nośnika (28).

Ilość białka w precipitatach określono wg Lowry i wsp. (17), ilość cukrów redukujących w badanych preparatach metodą antronową (20).

Odczyn precipitacji ilościowej surowic odpornościowych z ekstraktami wg Lancefield i Fullera w układach homologicznych i heterologicznych wykonano wg McCarty i Lancefield (18). Odczyn zahamowania precipitacji ilościowej przeprowadzono wg Willers i wsp. (36). W odczynie precipitacji ilościowej jako inhibitory stosowano: alfa-d-glukozę, beta-d-glukozę, fruktozę, galaktozę, mannozę, ksylozę, maltozę, trehalozę, glukozaminę, N-acetylglukozaminę i N-acetylgalaktozaminę w ilościach 2—20 mg/ml. Kontrolę stanowiła surowica inkubowana w tych samych warunkach z dodatkiem 0,85% NaCl zamiast inhibitora.

Wyniki

Skład jakościowy aminokwasów ścianny komórkowej.

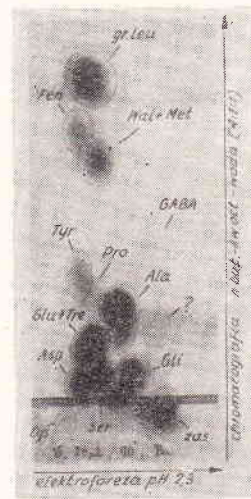
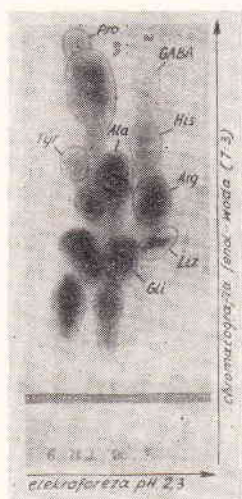
W hydrolizatach ścianny komórkowej *Str. pluton* wykazano obecność od 15 do 17 plam ninhydryno-dodatnich, z których jednej nie zidentyfikowano, pozostałe zaś utożsamiono z następującymi aminokwasami: grupa leucyny, fenyloalanina, metionina z walina, kwas alfa-aminomasłowy, kwas gamma-aminomasłowy (GABA), tyrozyna, prolina, alanina, treonina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, seryna, glicyna, cystyna, histydyna, arginina, lizyna ornityna, glutamina i tauryna (tab. 1). Plama niezidentyfikowana występowała jedynie w

Tab.1. Skład aminokwasowy hydrolizatów ścianny komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis*, i *Str. bovis*

Aminokwas	<i>Str. pluton</i>						<i>Str. faecalis</i>		<i>Str. bovis</i>
	1	10	18	M	S	Z	1	11	503
Grupa leucyny	++	++	+	+	++	++	+	+	++
Fenyloalanina	++	+	-	-	±	+	-	-	++
Metionina + walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas α-aminomasłowy	-	-	±	±	-	-	+	+	-
Kwas γ-aminomasłowy (GABA)	-	+	-	-	-	±	-	-	-
Tyrozyna	+	+	-	-	+	+	+	+	++
Prolina	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Alanina	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Treonina	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Kwas glutaminowy	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Kwas asparaginowy	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Seryna	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glicyna	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Cystyna	+	+	-	-	+	+	++	++	-
Histydyna	+	+	++	++	+	+	+	+	+
Arginina	++	+	++	+	++	++	++	++	++
Lizyna	+	+	+	+	+	++	+	+	+
Ornityna	+	-	+	+	±	-	+	+	+
Glutamina	-	-	++	++	-	-	++	++	++
Tauryna	-	-	+	+	-	-	++	++	-

++ duże stężenie aminokwasów, + średnie stężenie aminokwasów, ± śladowe ilości aminokwasów, - brak aminokwasów

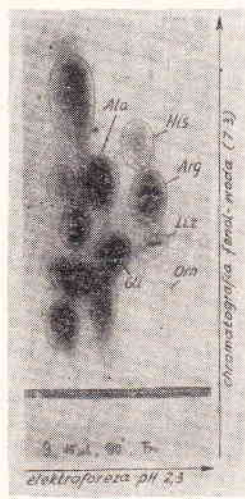
hydrolizatach ścianny komórkowej szczepu *Z Str. pluton* i znajdowała się na wysokości alaniny powyżej aminokwasów zasadowych (ryc. 10). Fenyloalanina, tyrozyna i cystyna występowały w szczepach 1, 10, S i Z (ryc. 9, 11), kwas alfa-aminomasłowy oraz glutamina i tauryna w szczepach 18 i M (ryc. 13), GABA i prolina w szczepach 10 i Z (ryc. 9) zaś ornityna



Ryc. 9. Elektrochromatogram aminokwasów ścianny komórkowej *Str. pluton Z*.
Ryc. 10. Elektrochromatogram aminokwasów ścianny komórkowej *Str. pluton Z*.

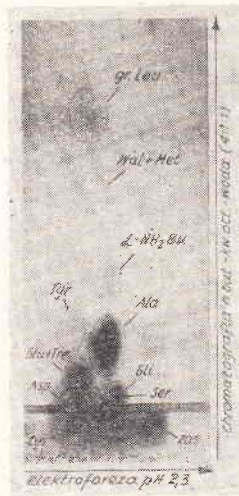
w szczepach 1, 18, M i S (ślady) (ryc. 12). W hydrolizatach ścianny komórkowej badanych szczepów *Str. faecalis* oprócz 12 aminokwasów, które występowały we wszystkich szczepach *Str. pluton* stwierdzono kwas alfa-aminomasłowy

wy (ryc. 13), tyrozyne, cystynę, ornitynę, glutaminę i taurynę. Ściana komórkowa *Str. bovis* oprócz aminokwasów występujących stale w ścianie komórkowej *Str. pluton* i *Str. faecalis* (ryc. 14) zawierała fenyloalaninę, tyrozyne, prolinę i glutaminę.



Ryc. 11. Elektrochromatogram aminokwasów ściany komórkowej *Str. pluton* S.

Ryc. 12. Elektrochromatogram aminokwasów ściany komórkowej *Str. pluton* S.



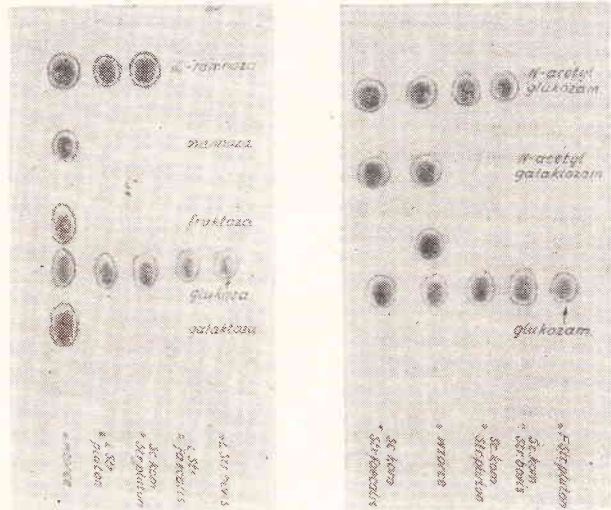
Ryc. 13. Elektrochromatogram aminokwasów ściany komórkowej *Str. faecalis* 18.

Ryc. 14. Elektrochromatogram aminokwasów ściany komórkowej *Str. faecalis* I.

Skład jakościowy węglowodanów ściany komórkowej i wyciągów wg Lancefield i Fullera.

Skład jakościowy węglowodanów ściany komórkowej oraz wyciągów wg Lancefield i Fullera *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* ujęto w tab. 2 i ryc. 15, 16, z których wynika, że ramnoza, glukoza, N-acetylglukozamina i glukozamina występowały w ścianie komórkowej trzech badanych gatunków paciorkowców. Ponadto ściana komórkowa *Str. faecalis* zawie-

rała mannozę i szczep I *Str. faecalis* N-acetylgalaktozaminę (ryc. 16). N-acetylheksozaminy i glukozaminę wykryto po 20 min. hydrolizie w 0,1 n HCl i wybarwieniu chromatogramu odczynnikami Elson-Morgana. Ilość cukrów redukujących w hydrolizatach ściany komórkowej wynosiła w przypadku *Str. pluton*- szczep nr 1 — 59,2 mg%, nr 10 — 52,2 mg%, nr 18 — 56,0 mg% nr M — 49,8 mg%, nr S — 53,0 mg%, nr Z — 56,7 mg%, w przypadku *Str. faecalis*: szczep nr I — 68,1 mg%, nr M — 77,4 mg% i *Str. bovis* 29,7 mg%.



Ryc. 15. Chromatogram cukrów ściany komórkowej *Str. pluton* (sc. kom) oraz wyciągów wg Lancefield (L) *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis*

Ryc. 16. Chromatogram N-acetylaminoocukrów i aminoocukrów ściany komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* oraz wyciągu wg Fullera (F) *Str. pluton*.

Skład jakościowy węglowodanów w wyciągach wg Lancefield i Fullera badanych szczepów podano w tab. 2. Jak z niej wynika wyciągi wg Lancefield *Str. pluton* zawierały glukozę i ramnozę, zaś wyciągi ze szczepów *Str. faecalis* i *Str. bovis* jedynie glukozę (ryc. 15). W hydrolizatach wyciągów Fullera ze szczepów *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* występowała zawsze ramnoza, glukoza i glukozamina. Fruktozę stwierdzano jedynie w haptenach wg Fullera ze szczepów *Str. pluton*, galaktozę ze szczepów *Str. faecalis*, zaś mannozę jedynie w wyciągu ze szczepu I *Str. faecalis*.

Tab. 2. Analiza chromatograficzna cukrów zawartych w ścianie komórkowej, wyciągach w Lancefield i Fullera *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis*

Ściana komórkowa	<i>Str. pluton</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. bovis</i>	Albanoza	Mannoza	Fruktaza	Glukoza	Sakharoza	N-acetylglukozamina	N-acetyl galaktozamina	Glukozamina
Ściana komórkowa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wyciąg wg Lancefield	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wyciąg wg Fullera	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

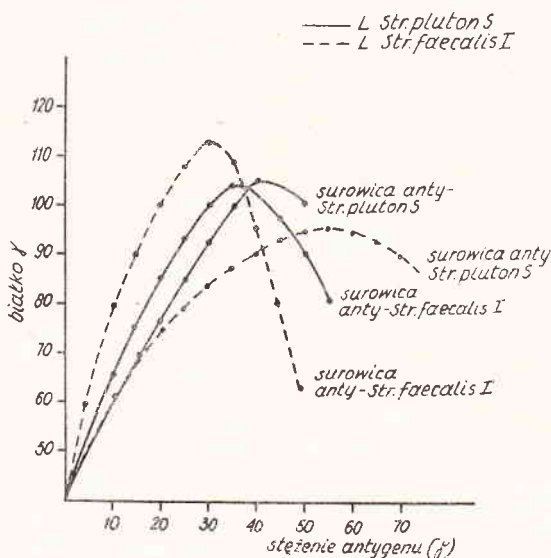
+ obecność cukru, - brak cukru, (c) występowanie nie we wszystkich badanych szczepach

Precypitacja ilościowa i odczyn zahamowania precypitacji ilościowej.

Odczyny te wykonano w układach: a) wyciąg wg Lancefield ze szczepu S *Str. pluton*, surowica odpornościowa dla szczepu S *Str. pluton* oraz dla szczepu I *Str. faecalis*, b) wyciąg wg

Fullera ze szczepów 18 i S *Str. pluton*, surowica dla szczepu 18 *Str. pluton* absorbowana wyciągiem wg Lancefield ze szczepu S *Str. faecalis* (surowica typowo specyficzna), c) wyciąg wg Lancefield ze szczepu I *Str. faecalis*, surowica dla szczepu I *Str. faecalis* oraz dla szczepu S *Str. pluton*. Strefę równowagi ustalono w oparciu o badanie krzywych precipitacji ilościowej potwierdzonej odczynem precipitacji pierścieniowej w której badano obecność antygeny względnie przeciwciał w supernatancie. Wyniki odczynu precipitacji ilościowej podano na ryc. 1 i 2. Jak wynika z ryc. 1 w strefie równowagi wyciąg wg Lancefield ze szczepu S *Str. pluton* (40 gamma cukru) precipitował w 1 ml surowicy homologicznej 105 gamma białka. W surowicy odpornościowej dla

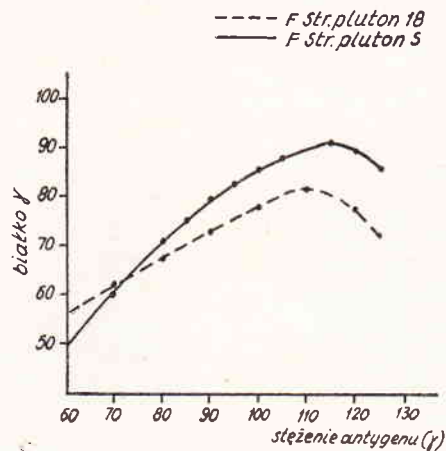
Ryc.1. Precypitacja ilościowa wyc. wg Lancefield *Str. pluton* S, *Str. faecalis* I z surowicami *Str. pluton* S, i *Str. faecalis* I



szczepu I *Str. faecalis* hapten ten (35 gamma cukru) precipitował w 1 ml surowicy 102 gamma białka. Otrzymany tą samą metodą hapten ze szczepu I *Str. faecalis* precipitował w surowicy homologicznej w strefie równowagi 113 gamma białka przy stężeniu cukru 30 gamma, zaś w surowicy dla szczepu S *Str. pluton* 94 gamma białka przy stężeniu cukru 55 gamma. Wyciągi wg Fullera ze szczepów 18 (110 gamma cukru) i S (115 gamma cukru) *Str. pluton* precipitowały w strefie równowagi w 1 ml surowicy typowo specyficznej odpowiednio 81 i 92 gamma białka (ryc. 2). Precypitacja ilościowa haptenu wg Lancefield ze szczepów *Str. pluton* i *Str. faecalis* z tą surowicą wypadła negatywnie.

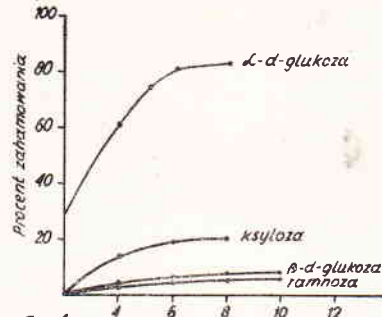
Wyniki zahamowania odczynu precipitacji ilościowej podano na ryc. 3—8. Jak wynika z ryc. 3 odczyn precipitacji wyciągu Lancefield *Str. pluton* z surowicą anty- *Str. pluton* ulegał zahamowaniu w ponad 84% przez alfa-d-glukozę w stężeniu 8 mg/ml. W tym stężeniu ksyloza

Ryc.2. Precypitacja ilościowa wyc. wg Fullera *Str. pluton* 18 i S z surowicą typowo specyficzną *Str. pluton*

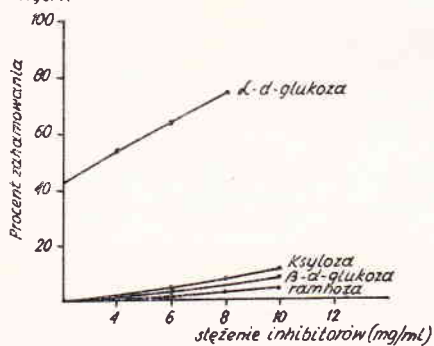


dawała 20% zahamowania odczynu, beta-d-glukoza 8,2%, ramnoza 6,3%. W układzie wyciąg wg Lancefield *Str. pluton* surowica anty- *Str. faecalis* (ryc. 4) alfa-d-glukoza hamowała 75% odczynu przy stężeniu 8 mg inhibitora/ml, zaś beta-d-glukoza, ksyloza i ramnoza hamowały odpowiednio 8,5; 12,0 i 4,5% odczynu. Zahamowanie odczynu w układzie: hapten wg Lancefield *Str. faecalis* surowica anty- *Str. pluton*

Ryc.3.

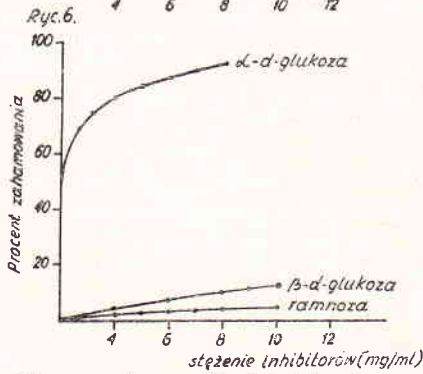
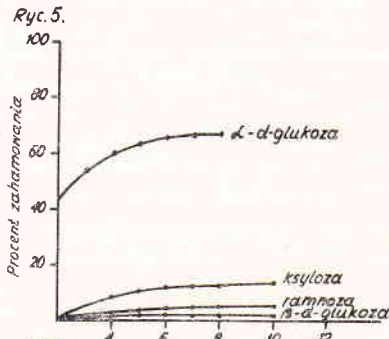


Ryc.4.



Zahamowanie precipitacji ilościowej przez cukry proste. Ryc.3. wyc. wg Lancefield *Str. pluton* z sur. homologiczną. Ryc.4. wyc. wg Lancefield *Str. pluton* z sur. *Str. faecalis* I

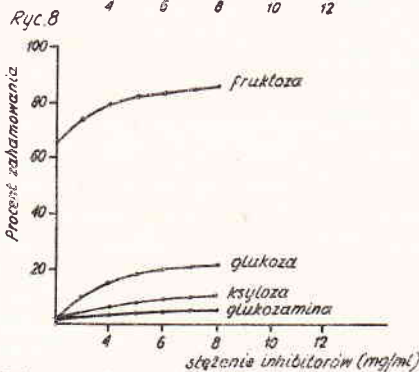
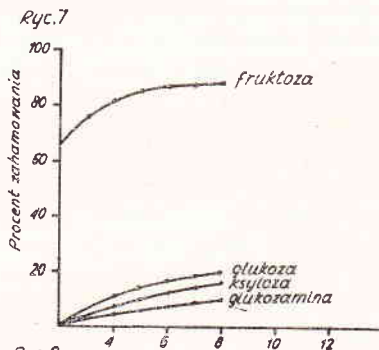
przy stężeniu 4 mg alfa-d-glukozy wynosiło 61,0%, przy stężeniu 8 mg inhibitora/ml, 68,0% (ryc. 5). Alfa-d-glukoza w tych samych stężeniach hamowała odczyn precipitacji tego haptenu z surowicą homologiczną w 81,0 i 92,5%.



Zahamowanie precipitacji 11osciowej przez cukry proste. Ryc. 5. wyc. wg Lancefield *Str. faecalis* I, sur. *Str. pluton* Z. Ryc. 6. wyc. wg Lancefield *Str. faecalis* I sur. hamologiczna.

Do 12,0% odczynu było hamowane w badanych układach przez ksylozę, ramnozę i beta-d-glukozę w stężeniach 4—10 mg inhibitora/ml (ryc. 5, 6).

W układzie wyciąg wg Fullera ze szczepów 18 i S *Str. pluton* i surowica typowo-specy-



Zahamowanie precipitacji 11osciowej przez cukry proste. Ryc. 7. wyc. wg Fullera *Str. pluton* Z. sur. typowo specyf. *Str. pluton*. Ryc. 8. wyc. wg Fullera *Str. pluton* 18 sur. typowo specyf. *Str. pluton*.

ficzna ponad 64,0% zahamowania odczynu precipitacji dawała fruktoza w stężeniach 2 mg/ml i ponad 80,0% w stężeniach 6 mg/ml (ryc. 7, 8). Przy tych samych stężeniach glukozy, ksylozy i glukozaminy zahamowanie odczynu nie przekraczało 20,0%, przy czym spośród tych trzech cukrów najsilniejsze działanie hamujące wywierała glukoza (20,0%), następnie ksyloza (10% i 13,2%), najsłabsze glukozamina (10,5% i 6,0%). W badanym układzie ramnoza, maltoza, sacharoza i N-acetylheksosaminy nie wywierały działania hamującego.

Analiza absorpcyjna w podczerwieni.

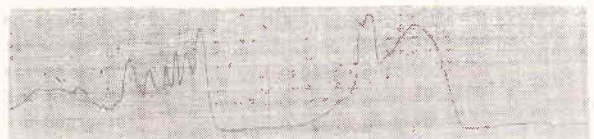
Wyniki analizy absorpcyjnej w podczerwieni ściany komórkowej oraz wyciągów wg Fullera ze szczepów *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* ujęto na spektrofotogramach (ryc. 17, 18, 19). Przy analizowaniu widm uwzględniono ekstrema absorpcji w zakresie 2960—2880 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} i 1380 cm^{-1} charakterystyczne dla



Ryc. 17. Spektrogram ściany komórkowej *Str. pluton*.



Ryc. 18. Spektrogram ściany komórkowej *Str. bovis*.



Ryc. 19. Spektrogram wyciągu wg Fullera *Str. pluton*.

użytego nośnika. Preparaty ściany komórkowej *Str. pluton* (ryc. 19), *Str. faecalis* i *Str. bovis* wykazywały zbliżony kontur widm. We wszystkich przypadkach stwierdzano: 1. Intensywne ekstremum w zakresie 3320—3300 cm^{-1} typowe dla drgań walencyjnych NH i OH. 2. Ostre pasmo w zakresie 1670—1650 cm^{-1} typowe dla drgań walencyjnych CO (I pasmo amidowe) i drgań deformacyjnych NH (II pasmo amidowe). 3. Ekstreum w zakresie 1580—1540 cm^{-1} i 1250 cm^{-1} typowe dla wiązań amidowych II rzędowych amidów cyklicznych. 4. Słabe ekstremum przy długości fali 1160 cm^{-1} związane z drganiami walencyjnymi CO estrowego fragmentu cząsteczki. To ekstremum nie występowało na spektrofotogramach ściany komórkowej *Str. bovis* (rys. 18). 5. Szerokie ekstremum

absorpcji w zakresie 1090—1040 cm^{-1} związane z drganiami walencyjnymi grup CO estrów alkoholi pierwszorzędowych oraz drganiami deformacyjnymi $\text{C}-\text{ARH}$, i słabe pasmo przy liczbie falowej 680 cm^{-1} typowe dla drgań walencyjnych CS. 6. Na podstawie dość słabego pasma w zakresie 860—870 cm^{-1} można sądzić o obecności związków o pierścieniu furanowym. Ekstremum absorpcji dla ściany komórkowej *Str. bovis* było nieco obniżone w porównaniu do ekstremów absorpcji ściany komórkowej pozostałych dwóch gatunków paciorkowców. Obniżenie to było szczególnie wyraźnie zaznaczone w obszarze 1750—400 cm^{-1} .

Wyciągi wg Fullera ze szczepów *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* (ryc. 17) dawały identyczne widma które cechowało: 1. Szerokie intensywne pasmo w zakresie 3330—3290 cm^{-1} charakterystyczne dla drgań walencyjnych OH grup karbonylowych. 2. Ostre pasmo w zakresie 1680—1670 cm^{-1} typowe dla drgań deformacyjnych NH i CO grup aldehydowych i w zakresie 1550—1560 cm^{-1} charakterystyczne dla drgań deformacyjnych NH w grupie NH_3^+ . Ostre ekstremum dla liczby falowej 1260 cm^{-1} typowe dla drgań walencyjnych OH grup karboksylowych. 4. Ostre ekstremum w zakresie 1250—1230 cm^{-1} związane z oddziaływaniem drgań deformacyjnych NH i walencyjnych CN oraz 5. Ekstremum przy liczbie falowej 1090 cm^{-1} odpowiadające drganiom walencyjnym C-C-C i deformacyjnym C-C-O-C.

O m ó w i e n i e w y n i k ó w

Przeprowadzone badania umożliwiły poznanie składu jakościowego aminokwasów i cukrów ściany komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* oraz składu cukrów serologicznie aktywnych frakcji antygenowych tych drobnoustrojów zawartych w wyciągach wg Lancefield i Fullera. Określenie roli poszczególnych cukrów prostych w odczynie zahamowania precypitacji ilościowej umożliwiło oznaczenie struktury chemicznej determinant swoistości serologicznej antygenów polisacharydowych (31). Podstawę badań immunochemicznych stanowiła elektrochromatografia aminokwasów, chromatografia cienkowarstwowa cukrów i aminocukrów oraz odczyn zahamowania precypitacji ilościowej przez cukry proste.

Analiza chromatograficzna aminokwasów ściany komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* wykazywała zawsze w badanych preparatach występowanie 12 wspólnych aminokwasów (tab. 1). Ponadto 9 aminokwasów występowało nieregularnie w ścianie komórkowej trzech badanych gatunków paciorkowców. Spośród zidentyfikowanych w badaniach własnych aminokwasów w ścianie komórkowej paciorkowców z grupy D wykryto uprzednio alaninę (29), glicynę (5, 29), lizynę i kwas glutaminowy (29), kwas asparaginowy i histydynę (11). Największą liczbę aminokwasów — 16 stwierdzili King i wsp. (14) w rozpuszczalnej

w formamidzie frakcji ściany komórkowej *Str. faecium*. Frakcja ta zawierała alaninę, kwas asparaginowy, argininę, kwas glutaminowy, glicynę, izoleucynę, leucynę, lizynę, metioninę, fenyloalaninę, prolinę, serynę, treoninę, histydynę, tyrozynę i walinę. Wydaje się, że zaobserwowane różnice w składzie aminokwasów ściany komórkowej paciorkowców z grupy D mogą się wiązać z jednej strony z metodami jej otrzymywania, z drugiej strony z metodami hydrolizy i rozdziału chromatograficznego.

Badania ilościowe wykazały dużą zawartość cukrów redukujących w ścianie komórkowej *Str. pluton* (49,8—59,2 mg%) i *Str. faecalis* (68,1—77,4 mg%) przy niskiej ich zawartości w ścianie komórkowej *Str. bovis* (29,7 mg%). Jednakże mimo tych różnic ilościowych ściana komórkowa *Str. pluton* i *Str. bovis* zawierała identyczne cukry proste — ramnoza, glukoza, glukozamina i N-acetylglukozamina (tab. 2). Bogatszy skład wykazywała ściana komórkowa *Str. faecalis*, w której stwierdzono ponadto mannozę i N-acetylgalaktozaminę i w jednym szczepie galaktozę. Uzyskane wyniki pokrywają się z rezultatami badań Cummins'a i Harris'a (5) w odniesieniu do paciorkowców z grupy D. Autorzy ci uważają ramnozę za charakterystyczny składnik ściany komórkowej wszystkich paciorkowców za wyjątkiem paciorkowców z grupy serologicznej O, K i R oraz niektórych szczepów z grupy F (36). Jones i Shattock (11) wykryli w ścianie komórkowej *Str. faecalis* ramnozę, galaktozę, glukozę, mannozę, glukozaminę i galaktozaminę, *Str. bovis* ramnozę, galaktozę, glukozę i glukozaminę. Glukozę, ramnozę i glukozaminę wykryli również w ścianie komórkowej paciorkowców z grupy D Elliott (6), zaś glukozę, ramnozę i N-acetylglukozaminę Kane i Karakawa (12).

Pomimo podobnego, a w przypadku *Str. pluton* i *Str. bovis* identycznego składu jakościowego cukrów ściany komórkowej badanych gatunków paciorkowców, istnienie różnic serologicznych pomiędzy nimi wydaje się potwierdzać pogląd, że odrębność serologiczna polisacharydowych frakcji antygenowych zależy nie tylko od składu jakościowego, ale głównie od rodzaju i konfiguracji stereochemicznej cukrów zajmujących położenie terminalne w łańcuchu polisacharydowym (25), oraz od charakteru wiązań pomiędzy poszczególnymi komponentami łańcucha.

Wyciągi wg Lancefield ze szczepów *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis*, które zawierają komponenty warunkujące przynależność do grupy serologicznej D zawierały w swoim składzie glukozę. Jedynie w przypadku *Str. pluton* oprócz glukozy zawierały ramnozę (ryc. 15). Wysoki stopień zahamowania odczynu precypitacji ilościowej przez alfa-d-glukozę zarówno w układach homologicznych (ponad 80% zahamowania przez 8 mg cukru/ml) jak i w układach heterologicznych (około 70% zahamowa-

nia przez 8 mg cukru/ml), w porównaniu do wartości zahamowania tego odczynu przez beta-d-glukozę i ramnozę (ryc. 3—6) przy identycznym stężeniu substratów wydaje się wskazywać, że w antygenie grupowo specyficznym D determinantą swoistości serologicznej jest glukozyd z alfa-d-glukozą w pozycji terminalnej łańcucha węglowodanowego. Obecność ramnozy w wyciągach wg Lancefield *Str. pluton* może się wiązać z zanieczyszczeniem tego wyciągu preparatami ściany komórkowej, tym bardziej, że nie była ona stwierdzana dotychczas w antygenie grupowo swoistym paciorkowców z grupy D (11). Dla potwierdzenia swoistości badanych inhibitorów włączono do badań cukry, których nie stwierdzano w wyciągach wg Lancefield badanych paciorkowców: N-acetylglukozamina, N-acetylgalaktozamina, ksyloza, maltoza i trehaloza. Spośród tych cukrów najwyższy stopień zahamowania odczynu precypitacji ilościowej wykazywała ksyloza. Ten wysoki stopień zahamowania odczynu przez ksylozę może się wiązać z identyczną konfiguracją grup OH przy węglu 3 i 4 pierścienia pyranowego glukozy i ksylozy (33).

Wyciągi wg Fullera ze szczepów *Str. pluton* oprócz antygeny grupowo swoistego zawierały antygen typowo specyficzny o naturze węglowodanu. W badaniach własnych (8) nie stwierdzono jednakże pokrewieństwa serologicznego pomiędzy antygenem typowo specyficznym *Str. pluton* i antygenami typowo swoistymi *Str. faecalis* i *Str. bovis*. Wyciągi wg Fullera trzech badanych gatunków paciorkowców różniły się również składem jakościowym cukrów (tab. 2, ryc. 16). Wyciąg ten w przypadku *Str. pluton* zawierał ramnozę, fruktozę, glukozę i glukozaminę, w przypadku *Str. faecalis* ramnozę, mannozę (jeden szczep), glukozę, galaktozę i glukozaminę, zaś w przypadku *Str. bovis* ramnozę, glukozę i glukozaminę. Wyniki własne odnośnie składu jakościowego wyciągów wg Fullera ze szczepów *Str. faecalis* pokrywają się częściowo z wynikami Willers i wsp. (35) i Elliott (6).

Na podstawie wyników zahamowania odczynu precypitacji ilościowej (ryc. 7, 8) w układach: wyciąg wg Fullera ze szczepów *Str. pluton* i surowica typowo specyficzna *Str. pluton* można sądzić, że determinantą polisacharydowego antygeny typowo specyficznego tego drobnoustroju jest glukozyd zawierający w pozycji terminalnej fruktozę i w pozycji przedostatniej glukozę. Fruktoza bowiem w stężeniach 4—8 mg/ml hamowała ponad 80% odczynu precypitacji ilościowej w badanych układach. W tym stężeniu glukozę hamowała odczyn w 10—20%, ksyloza i glukozamina w poniżej 10%. Pozostałe użyte w badaniach cukry nie posiadały własności inhibitorów.

Analiza absorpcyjna w podczerwieni wykazała zbliżony kontur widm dla preparatów ściany komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* oraz identyczny zarys widm dla wycią-

gów wg Fullera. Spektrogramy ściany komórkowej *Str. bovis* nie posiadały jedynie ekstremum przy liczbie falowej 1160 cm^{-1} (ryc. 18). W związku z brakiem istotnych różnic w spektrogramach badanych preparatów wydaje się, że pomimo uzyskiwania powtarzalnych wyników przy przestrzeganiu ujednoliconej metody hodowli, przygotowywania próbek i wykonywania oznaczeń, metoda analizy absorpcyjnej w podczerwieni nie rokuje większych nadziei w badaniach struktury antygenowej paciorkowców. Uzyskanie przez Riddle (24) dla bakterii i Wołoszyna (37) dla antygenów grzybiczych charakterystycznych widm absorpcyjnych można tłumaczyć dużą odrębnością immunochemiczną badanych drobnoustrojów.

Wnioski

1. Analiza elektrochromatograficzna aminokwasów ściany komórkowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* wykazała obecność od 15—18 aminokwasów. Dwanaście aminokwasów (grupa leucyny, metionina, walina, alanina, treonina, kwas glutaminowy, kwas asparaginy, seryna, glicyna, histydyna, arginina i lizyna) występowały zawsze w preparatach ściany komórkowej badanych drobnoustrojów.

2. Stwierdzono, że w ścianie komórkowej *Str. pluton* i *Str. bovis* występowała ramnoza, glukozę, glukozaminę i N-acetylglukozaminę, a ściana komórkowa *Str. faecalis* zawierała ponadto w swoim składzie mannozę, galaktozę i N-acetylgalaktozaminę.

3. Wykazano, że wyciągi wg Lancefield sporządzone ze szczepów *Str. pluton* zawierają glukozę i ramnozę, natomiast ekstrakty wg Fullera sporządzone z tych szczepów ponadto fruktozę i glukozaminę.

4. W oparciu o wyniki odczynu zahamowania precypitacji ilościowej można przypuszczać, że spośród badanych cukrów najbardziej istotną rolę w determinowaniu swoistości serologicznej antygeny grupowo specyficznego *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* odgrywa alfa-d-glukoza, zaś determinantą swoistości serologicznej polisacharydowego antygeny typowo specyficznego *Str. pluton* jest najprawdopodobniej fruktoza w położeniu terminalnym i glukozę w pozycji przedostatniej w łańcuchu węglowodanowym.

Piśmiennictwo

1. Avaparu J., Landau A. J., Fuerst R.: J. biol. Chem. 187, 35, 1959.
2. Barker S. A., Bourne E. J., Whiffen D. H.: Methods Biochem. Anal. 3, 214, 1960.
3. Bleiweis A. S., Krause R. M.: J. exp. Med. 122, 237, 1965.
4. Coleman G., Williams R. E.: J. gen. Microbiol. 41, 3, 1965.
5. Cummins C. S., Harris H.: J. gen. Microbiol. 14, 583, 1956.
6. Elliott S. D.: J. exp. Med. 111, 621, 1966.
7. Gal A. E.: Analyt. Biochem. 24, 452, 1968.
8. Gliński Z.: Medycyna Wet. 1972, w druku.
9. Homma J. Y., Suzuki N.: J. Bact. 87, 630, 1964.
10. Ikawa M.: J. biol. Chem. 236, 1087, 1961.
11. Jones D., Shattock P. M.F.: J. gen. Microbiol. 23, 335, 1960.
12. Kane J. A., Karakawa W. W.: J. gen. Microbiol. 56, 157, 1969.
13. Karakawa W. W., Wagner J. O., Pazur H. J.: J. Immunol. 107, 554, 1971.
14. King J. R., Prescott B., Coldes G.: J. Bact. 104, 276, 1970.
15. Krause R. M., McCarty M.: J. exp. Med. 114, 127, 1961.
16. Lancefield R. C.: J. exp. Med. 57, 571, 1933.

17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. biol. Chem. 193, 263, 1951.
18. McCarty M., Lancefield R. C.: J. exp. Med. 102, 11, 1955.
19. Michel M. F., Krause R. M.: J. exp. Med. 125, 1075, 1967.
20. Mookrash J.: J. biol. Chem. 55, 208, 1954.
21. Noworytko J., Sarnecka-Keller M.: Acta. bioch. pol. 2, 1, 1955.
22. O'Connor R. T., McCall E. R., Dupre E. F.: J. Bact. 73, 303, 1957.
23. Opińska-Blauth J., Tomaszewski L.: Metody chromatograficzne w badaniach aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem aminocydurow, PZWL, 1966.
24. Riddle J. W.: J. Bact. 72, 593, 1956.
25. Salton M. R. J.: Biochim. biophys. Acta. 8, 510, 1952.
26. Salton M. R. J.: Biochim. biophys. Acta. 10, 512, 1953.
27. Schwarz H. P.: Adv. clin. chem. 3, 1, 1960.
28. Silverstein R. M., Bassler G. C.: Spectrophotometric identification of organic compounds. J. Wiley Inc. NY, London, Sydney, 1967.
29. Stade H. D., Stamp W. C.: J. Bact. 84, 345, 1962.
30. Stacey M., Baker S. A.: Polysaccharides of microorganisms. Oxford Univ. Press, London 1960.
31. Stahl E.: Thin layer chromatography. Acad. Press, NY, 1965.

Adres autora: dr Zdzisław Gliński, Lublin, ul. Akademicka 12.

Глиński З. — Исследования свойств и антигенной структуры *Streptococcus pluton*. V. Иммунохимический анализ.

Исследовали состав аминокислот и сахаридов в препаратах из клеточных стен 6 штаммов *Str. pluton*, 2 штаммов *Str. faecalis* и 1 штамма *Str. bovis*. Кроме того проанализировали состав сахаридов и аминокислот серологически активных экстрактов по Lancefield и по Fuller тех же бактерий. Качественный состав аминокислот определяли методом бумажной электрохроматографии, состав сахаридов — методом тонкослойной хроматографии на обуференной инфузорной земле и гипсом, а состав аминокислот и N-ацетилгексозаминов на инфузорном желе G. Для определения детерминантов групповой и типовой антигенной структуры *Str. pluton* провели реакцию торможения количественной преципитации моносахаридами. Кроме того провели анализ препаратов клеточных стен и серологически активных полисахаридов методом абсорбции в инфракрасной части спектра.

Установили, что в препаратах клеточных стен *Str. pluton*, *Str. faecalis* и *Str. bovis* имеется 15—18 аминокислот. Двенадцат аминокислот (группа лейцина, метионин, аланин, треонин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, серин, глицин, гистидин и аргинин) выступали в стене клеток во всех исследованных случаях. Стена клеток *Str. pluton* и *Str. bovis* содержала рамнозу, глюкозу, глюкозамин и N-ацетилглюкозамин. Стены *Str. faecalis* содержали кроме того маннозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин. Экстракты по Lancefield из штаммов *Str. pluton* содержали глюкозу и рамнозу а из штаммов *Str. faecalis* и *Str. bovis* только глюкозу. В экстрактах по Fuller идентифицировали в случае *Str. pluton* рамнозу, фруктозу, глюкозу и глюкозамин, в случае *Str. faecalis* — рамнозу, маннозу, глюкозу, галактозу и глюкозамин, а в штамме *Str. bovis* рамнозу, глюкозу и глюкозамин.

В реакции торможения количественной преципитации установили, что существенную роль в детерминации серологической специфичности группового антигена *Str. pluton* играет альфа-д-глюкоза. Детерминантом серологической специфичности типового антигена является фруктоза (терминальная) и глюкоза.

Gliński Z. — Investigations on the properties and antigenic structure of *Streptococcus pluton*. V. Immunohemical analysis.

There was carried out the analysis of: i. amino acids and sugars from cell walls of 6 strains of *Str. pluton*, 2 strains of *St. faecalis* and 1 strain of *Str. bovis*; ii. sugars and amino sugars of serologically active fractions (acc. to Lancefield and Fuller) from these bacteria. The qualitative composition of amino acids was determined electrochromatographically on paper. The composition of sugars was estimated in thin-layer chromatography on buffered silica earth

with gypsum, and amino sugars and N-acetylaminosugars on silica gel G. In order to determine the serological specificity of group and type antigens of *Str. pluton* there was performed the inhibition of quantitative precipitation test with simple sugars. In addition, there was done infra-red analysis of cell wall and serologically active polysaccharide fractions. The presence of 15—18 amino acids was revealed in the cell walls of *Str. pluton*, *Str. bovis* and *Str. faecalis*. Twelve amino acids, i.e. leucine group, methionine, valine, alanine, threonine, glutamic acid, aspartic acid, serine, glycine, histidine, arginine and lysine were always present in the cell walls of the bacteria under study. The cell wall of *Str. pluton* and *Str. bovis* contained rhamnose, glucose, glucosamine and N-acetylglucosamine. The cell wall of *Str. faecalis* contained also mannose, galactose and N-acetylgalactosamine. In the extracts of *Str. pluton* acc. to Lancefield there were revealed glucose and rhamnose; but in the same extracts from *Str. faecalis* and *Str. bovis* only glucose. In Fuller's extracts from *Str. pluton* there were noted rhamnose, mannose, glucose, galactose and glucosamine, and in the case of *Str. bovis* rhamnose, glucose and glucosamine. In the inhibition of quantitative precipitation test with simple sugars it was found that alpha-d-glucose played the main role in the determination of serological specificity of group specific antigen of *Str. pluton*. Serological specificity of type-specific antigen of *Str. pluton* was determined by fructose (in terminal position) and by glucose.

POTGIETER L. N. D., ROSS R. F.: Wykrywanie *Mycoplasma hyorhinis* i *Mycoplasma hyosynoviae* przy pomocy odczynu immunofluorescencji w zmianach u świń zakażonych doświadczalnie. (Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in lesions of experimentally infected swine by immunofluorescence). Am. J. vet. Res., 33, 99—105, 1972 (1).

Stosując metodę immunofluorescencji pośredniej wykazano w tkankach doświadczalnie zakażonych świń *Mycoplasma hyorhinis* i *Mycoplasma hyosynoviae*. W celu usunięcia niespecyficznego fluorescencji koniugatę oczyszczano chromatograficznie na kolumnie z DEAE celulozy. Dodatkowo wyniki odczynu immunofluorescencji uzyskiwano dla powierzchniowych warstw błon maziowych oraz z 15 z 45 próbek mazi stawowej. Z próbek mazi stawowej reagujących dodatnio w odczynie immunofluorescencji wyizolowano mykoplazmy.

Z.

ACKERMAN L. J., MOREHOUSE L. G., OLSON L. D.: Wirusowe zapalenie żołądka i jelit świń w trzytygodniowych prosiąt: badania nad niedokrwistością i absorpcją żelaza. (Transmissible gastroenteritis in three week-old pigs: study of anemia and iron absorption). Am. J. vet. Res., 33, 115—120, 1972 (1).

Badania nad wpływem wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń na absorpcję żelaza, oraz wpływ niedokrwistości na przebieg kliniczny choroby przeprowadzono na 9 klinicznie zdrowych prosiątach i 21 prosiątach, u których występowała anemia. Grupę kontrolną stanowiło 7 prosiąt z niedokrwistością i 5 prosiąt klinicznie zdrowych. Po 26 godzinach po doustnym zakażeniu wirusem zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (200 tys. jednostek zakaźnych dla świni/ml) i po 2 godz. po doustnym podaniu siarczaniu żelaza poziom żelaza w surowicy prosiąt z niedokrwistością wynosił 95 µg/100, zaś u prosiąt zdrowych 220 µg/ml. U prosiąt z niedokrwistością choroba przebiegała ciężiej. Na czoło objawów klinicznych wysuwała się biegunka, silna depresja, znaczne obniżenie przyrostów wagowych. Czternastego dnia po zakażeniu nie obserwowano zmian makroskopowych i mikroskopowych charakterystycznych dla wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń.

Z.