

18. Vanbreuseghen R., De Vroey Ch., Takashio M.: Practical guide to medical and veterinary mycology. Masson publ., New York 1978.
19. Wawrzekiewicz K., Ziółkowska G.: Medycyna Wet. 39, 539, 1983.
20. Wawrzekiewicz K., Ziółkowska G., Klimont S.: Pol. Arch. Wet. (w druku).

Adres autora: prof. dr Krystyna Wawrzekiewicz, ul. B. Chrobrego 1/19, 20-336 Lublin

Вавжевич К., Зюлковская Г. — Хламидоспоры *Trichophyton verrucosum*

Для исследований применили 6 по жребии избранных штаммов *T. verrucosum*, которые высевали классическим и двухслойным методом на различные модификации питательной среды Sabourauda. Легче всего получали типичные хламидоспоры на бессахарной питательной среде Sabourauda и на питательной среде Sabourauda, в которой глюкозу замещено аналогическим количеством сахарозы. Введение в питательную среду вместо глюкозы галактозы или сорбитола также индуцировало продукцию спор, но в ограниченном количестве. В среде с маннитом хламидоспоры появлялись лишь изредка.

Двухслойный метод позволял обнаружить рост гриба и образование хламидоспор уже на 3 день инкубации, тогда как классический метод посевов удлинял процесс до 5—7 дней.

Полученные результаты показывают, что хотя *T. verrucosum* может размножаться на среде Sabourauda без глюкозы, то, однако, правильное его развитие происходит в среде с глюкозой.

Wawrzekiewicz K., Ziółkowska G. — Chlamydospores of *Trichophyton verrucosum*

For examinations six strains of *T. verrucosum*, chosen at random, were seeded according to classic method and two-layer method on different Sabouraud's modified media. Most easily typical chlamydospores were achieved on Sabouraud's medium without sugar and on the medium in which glucose was replaced by analogous amount of sucrose. Introduction of galactose or sorbitol instead of glucose also induced the production of spores though in a limited number. In the medium with mannitol chlamydospores appeared sporadically only. Two-layer method enabled to observe the growth of the fungus and chlamydospores production as soon as on day 3rd, while the classic method of seeding prolonged this process to 5—7 days. The findings indicate that *T. verrucosum* may be propagated on Sabouraud's medium without glucose but its characteristic growth occurs in the presence of glucose contained in that medium only.

ZOFIA GOS, ANTONI J. FUROWICZ, ALINA HEJMAN

Badania nad wpływem uodporniania bukatów inaktywowaną formaliną zawiesziną szczepu *Propionibacterium acnes* na kształtowanie się odporności typu komórkowego*

Zakład Mikrobiologii Zootechnicznej Instytutu Biologicznych Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydziału Zootechnicznego A.R. ul. dr. Judydy 12, 71-460 Szczecin

Z poznanych dotychczas immunostymulatorów, niezwykle silną aktywność wykazują bez-tlenowce „maczugowce” *P. acnes* (1, 2, 3, 8, 10, 27). Według Adlana i Reida (2) podobnie silną aktywność wykazują także szczepy *P. avidum* (typ I i II), nieco mniejszą natomiast *P. acnes* typ II (ATCC 12930). Stwierdzono, iż drobnoustroje te działaniem swoim przewyższają endotoksyny, a nawet prątki (10).

Antygeny *P. acnes* (PA) mogą powodować stymulację, a w niektórych przypadkach supresję odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też działanie tych drobnoustrojów określa się terminem immunomodulacji (8). Mechanizm ten nie został do końca wyjaśniony. Zależy on od wielu czynników, takich jak: gatunek oraz szczep *Propionibacterium*, czas preimmunizacji, dawka immunostymulatora i antygeny, droga podania oraz gatunku zwierząt użytych do badań (13, 26).

Stwierdzono, że aktywność immunostymulacyjna (związana z glikopeptydem, lipowielocukrami oraz estrami 6,6'-L-trehalozą występującymi w komórkach *P. acnes*), manifestuje się w organizmie zwierząt wzmożeniem proliferacji makrofagów i aktywowaniem fagocytarnych funkcji (1, 3, 15, 24). Powodują one

również wzrost monocytów krwi obwodowej, które pełnią zasadniczą rolę w obronie przeciwbakteryjnej (5). Procesowi aktywizacji monocytów i makrofagów towarzyszy wydzielanie pozakomórkowe lizosomalnych enzymów, przy czym lizozym uznano za wyznacznik sprawności głównie przeciwnowotworowej fagocytów (19). Stwierdzono ponadto, iż pobudzanie przez szczepy PA makrofagów ma pośrednio bardzo duży wpływ na zwiększenie się w organizmie wyższym liczby komórek cytotoksycznych NK (typu — natural killer) oraz limfocytów T (typu — helper i CLT), jak również K (15). Obecność tych elementów decyduje o sprawnej obronie przeciwnowotworowej oraz przeciwbakteryjnej, uzależnionej od mechanizmów swoistej i nieswoistej odporności komórkowej.

Wzbudzona przez *P. acnes* odporność chroni przeciw niektórym zakażeniom bakteryjnym (6, 16) i wirusowym (8). Odnosnie działania antywirusowego zwrócono uwagę, że niektóre szczepy PA, zwłaszcza t. I, mają właściwości indukowania substancji o charakterze interferonu, działającej inhibicyjnie na replikację wirusowych kwasów nukleinowych w komórkach zakażonego organizmu (6). Sugiyama i Epstein (25) opisali ciekawe zjawisko stymulacji proliferacji ludzkich limfocytów T oraz jednoczes-

* Praca wykonana w ramach problemu badawczego MR.II. 10, Kontrakt Nr 3-C-IV.

ne pobudzenie tych komórek do produkcji interferonu. Stwierdzono również, że podanie PA zwierzętom dotkniętym procesem nowotworzenia powodowało regresję pierwotnych guzów i hamowanie wtórnych przerzutów (3, 11, 22).

Brak jednoczesnych danych o oddziaływaniu tych bakterii na stymulację procesów odpornościowych u zwierząt z objawami hipogammaglobulinemii (powstałymi w wyniku różnych schorzeń) oraz z zaburzeniami w zakresie odporności komórkowej, skłonił nas do podjęcia takich badań.

Pierwszym etapem badań było określenie kształtowania się odporności typu komórkowego bukatów immunizowanych szczepem *Propionibacterium acnes*.

Materiał i metody

Określenie poziomu aktywności immunostymulacyjnej szczepu *P. acnes* przeprowadzono na 15 bukatach rasy ncb, klinicznie zdrowych, w wieku 8–10 miesięcy, o wadze 160–180 kg.

Do uodporniania bukatów użyto inaktywowanej formuły szczepionki, przygotowanej z 4-dniowej hodowli bulionowej szczepu *P. acnes* — CN 5936, o gęstości 9×10^8 komórek/ml. Użyty szczep pochodził z kolekcji Wellcome Research Laboratories (Beckenham, UK), reprezentował on ustalone, wysokie właściwości immunostymulacyjne. Szczepionkę podawano podskórnie w ilości 8 ml na sztukę. Przed immunizacją i po 21 dniach od szczepienia przeprowadzono badania, w oparciu o wymienione testy, których celem było określenie wpływu stymulacji na poziom odporności komórkowej. W tym celu pobierano krew żylną do próbek z heparyną (10 j./ml krwi). Dla określenia poziomu aktywnych granulocytów obojętnochołnych zastosowano test fagocytny wg metody Wrighta w modyfikacji Doleżala (7). Do 1 ml heparynowanej krwi dodawano po 0,5 ml zawiesiny szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o gęstości komórek/ml, po czym przeprowadzano inkubację w temperaturze 37°C przez 30 min. Po wirowaniu zbierano kożuszek białych krwinek i wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych. W preparatach, po wybarwieniu metodą Giemzy, liczone 100 granulocytów obojętnochołnych, określając liczbę Hamburgera i indeks fagocytny Wrighta. Jednocześnie określano aktywność enzymatyczną granulocytów obojętnochołnych przy pomocy redukcji błękitu nitroterazoliowego (NBT/20).

Mieszaninę heparynowanej krwi z 0,2% roztworem NBT inkubowano 30 min. w temperaturze 37°C, a następnie wykonywano rozmazy, które barwiono roztworem zieleni metylowej z pyroniną. Liczono odsetek komórek obladowanych formazanem — NBT dodatnich.

Limfocyty T w surowicy krwi oceniano metodą testu rozetowego E wg Bacha w modyfikacji Grewala i wsp. (9). Izolowano je metodą Bóyma w modyfikacji Hermanowicza (12) w gradiencie Ficoll (Pharmacia, Uppsala) — Uropolina (Polfa). Po sprawdzeniu żywotności i czystości, zawieszano je w 100% płodowej surowicy cielęcej (FCS) inaktywowanej i wyabsorbowanej. Czerwone krwinki baranie (RBC) przed użyciem do testu traktowano papainą, a następnie zawieszano w 100% FCS. Mieszaninę limfocytów o stężeniu 2×10^6 i 1% krwinek barana inkubowano wstępnie przez 10 minut w temperaturze pokojowej, a po wirowaniu — przez 24 godziny w 4°C. Następnie określano odsetek limfocytów tworzących rozetki E. Za dodatni test rozetkowy przyjęto układ, w którym do limfocytu przylegały co najmniej 3 erythrocyty.

U badanych zwierząt określano również odsetek limfocytów esterazododatnich i esterazoujemnych posługując się metodą Koski podaną przez Yanga i wsp. (27). Jako substratu używano octanu alfanaftylu, a jako czynnika sprzęgającego azowanej paraozaniliny. Po barwieniu kontrastowym 1% zielenią metylową, określano odsetek limfocytów esterazododatnich (licząc 300 komórek).

Zdolność transformowania limfocytów T pod wpływem mitogenu fitohemaglutyniny (PHA) określano wg metody Angusa — Yanga (4). Limfocyty krwi hodowano na podłożu Hanksa z dodatkiem inaktywowanej surowicy cielęcej, antybiotyków — penicyliny i streptomycyny oraz L-glutaminy. Czas hodowli stymulowanych PHA i bez mitogenu wynosił 72 godziny. Po inkubacji przepłukiwano osad 0,5% roztworem cytrynianu sodu, a następnie mieszaniną kwasu trójchlorooctowego (TCA) z metanolem. Po wirowaniu z otrzymanego osadu wykonywano rozmaz, który po utrwaleniu metanolem barwiono metodą Papenheima. W preparatach określano odsetek limfoblastów licząc 200 limfocytów.

Porównania wartości średnich uzyskanych wyników dokonano testem t-Studenta.

Tab. 1. Profil odporności komórkowej bukatów immunizowanych szczepem *P. acnes* — CN 5936

Testy		Grupa zwierząt	$\bar{x} \pm s$		V
Rozetki E %		I	21,7 **	2,04	9,4
		II	29,6	4,17	14,0
Limfocyty %	Esterazododatnie	I	65,1 **	3,19	4,9
		II	72,4	3,89	5,37
	Esterazoujemne	I	34,9 **	3,19	9,14
		II	27,6	3,89	14,09
	Stymulowane PHA	I	70,6 **	2,79	3,95
		II	76,4	4,25	5,56
Fagocytoza	Liczba Hamburgera	I	20,9 **	5,36	25,6
		II	66,0	6,15	9,31
	Indeks fagocytny Wrighta	I	10,9 *	3,68	33,76
		II	14,7	2,96	20,13
	Granulocyty NBT-dodatnie	I	9,3 **	2,25	24,1
		II	34,4	4,67	13,5

Objaśnienia: * — istotność przy $p \leq 0,01$, ** — istotność przy $p \leq 0,001$, grupa I — przed immunizacją, grupa II — po immunizacji.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1. Z zawartych w niej danych wynika, iż stymulacyjny efekt szczepu *P. acnes* — CN 5936 manifestuje się przede wszystkim silną aktywnością fagocytną funkcji granulocytów obojętnochołnych. Wskazuje na to wysoce istotny wzrost liczby Hamburgera tj. odsetka granulocytów obojętnochołnych, aktywnych w procesie fagocytozy w stosunku do użytego szczepu gronkowca oraz indeksu fagocytnego Wrighta.

Jedną z metod badania nieswoistej odporności komórkowej jest test redukcji błękitu nitroterazoliowego w układzie enzymatycznym wewnątrzkomórkowego unieszkodliwiania drobnoustrojów (17, 18, 20). U zwierząt po immunizacji obserwowano wysoce istotny wzrost

granulocytów obojętnochołonnych aktywnych enzymatycznie — NBT dodatnich, co świadczy o pobudzeniu aktywności komórkowego systemu obrony nieswoistej. Przyjęto, że prawidłowa liczba komórek NBT dodatnich w zdrowym organizmie wynosi około 10% (20, 23).

Poza badaniem aktywności fagocytarnej, analizowano wpływ immunostymulatora — PA na kształtowanie swoistej odporności komórkowej, w której zasadniczą rolę odgrywają grasiczozależne limfocyty T, wykrywalne metodą rozetek E. Zastosowano równocześnie metodę cytochemiczną, która pozwala ustalić jednocześnie procent limfocytów T jak i B (27). Posługując się powyższymi metodami zanotowano istotny wzrost limfocytów we krwi obwodowej, tworzących rozetki E i zawierających enzym esterazę, co wskazywałoby na wzrost populacji limfocytów T. Rozbieżność w ilości limfocytów T wykrywanych metodą rozetkową a cytochemiczną jest najprawdopodobniej wynikiem niewychwycenia na tych komórkach receptorów dla heterologicznych erytrocytów. Należy również liczyć się z faktem, że pewien procent limfocytów B wykazuje obecność esterazy (27).

Podkreślić trzeba, iż istotnym wskaźnikiem poziomu odporności organizmu zwierzęcego jest nie tylko ilość limfocytów T, ale także ich aktywność (zdolność transformowania w limfoblasty) w procesie odporności komórkowej. W badaniach własnych po immunizacji badanych zwierząt zaobserwowano wzrost możliwości proliferacyjnych limfocytów T.

Wniosek

Użyty do badań szczep *P. acnes* jest dobrym stymulatorem odporności typu komórkowego u bukatów.

Piśmiennictwo

1. Adam C., Broughton E. S., Scott M. T.: Nature New Biol. 235 219, 1972.
2. Adam C., Reid D. E.: Inter. symp. biol. preparations in the treatment of cancer. London 1977, Develop. biol. Stand. vol. 38, p. 115 (S. Karger, Basel 1978).
3. Adam C., Scott M. T.: J. med. Microbiol. 9, 261, 1973.
4. Angus K., Yang T. J.: J. Immun. Met. 21, 261, 1978.
5. Cline M. J., Lehrer R., Territo M. C., Golde D. W.: Ann. intern. Med. 88, 78, 1978.
6. Cygan Z.: Medycyna Wet. 36, 323, 1980.
7. Dolezal M., Walker R., Bak S.: Pol. Tyg. lek. 12, 1171, 1955.
8. Glasgow L. A., Fischbach J., Bryant S. M., Kern E. R.: J. infect. Dis. 135, 763, 1977.
9. Grewal A. S., Rouse B. T., Babiuk L. A.: Can. J. comp. Med. 40, 298, 1978.
10. Halpern B. N., Prevost A. R., Blozzi G., Stiffel C., Mouton D., Morard J. C., Bouthillier Y., Deceusefond C.: J. Reticuloendothel. Soc. 1, 77, 1963.
11. Hattori T., Mori A.: Gann 64, 7, 1973.
12. Hermanowicz A., Marek E., Gadowska-Cicha A., Woźniakowa M., Krzyszkowska A., Zmudziński J.: Pol. Arch. Med. wew. 54, 267, 1975.
13. Howard J. G., Christie G. H., Scott M. T.: Cell. Immun. 7, 290, 1973.
14. Jakubowska L., Gos Z., Furwicz A. J.: Życie wet. 56, 236, 1981.
15. Janiak M., Lipski S.: Post. Hig. 36, 95, 1982.
16. Kobayashi F., Nagaya T., Koski T., Saito Y.: Infect. Immun. 27, 391, 1980.
17. Nikolajczuk M.: Arch. Immun. Ther. 26, 1, 1978.
18. Nikolajczuk M.: Medycyna Wet. 35, 604, 1979.
19. Osseman E. F.: New Engl. J. Med. 292, 424, 1975.
20. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M.: Lancet 22, 532, 1968.

21. Ranki A., Töfterman T. H., Häyry P.: Clin. exp. Immun. 26, 375, 1976.
22. Roszkowski W., Ko H. L., Roszkowski K., Szmigielski S., Jędraszewicz J., Pulverer G.: Med. Microbiol. Immun. 169, 1, 1980.
23. Salwa A.: Medycyna Wet. 36, 737, 1980.
24. Scott M. T.: Develop. biol. Stand. 38, 273, 1978.
25. Sugiyama M., Epstein L. B.: Cancer Res. 38, 4467, 1978.
26. Wawrzkievicz K., Wawrzkievicz J.: Medycyna Wet. 38, 559, 1982.
27. Yang T. J., Janzen P. A., Williams L. F.: Immunology 38, 85, 1979.

Adres autora: mgr Zofia Gos, ul. Metalowa 22 c/6, 70-744 Szczecin

Гос З., Фурович А., Гейман А. — Исследования влияния иммунизации убойных телят инактивированной формалином суспензией штамма *Propionibacterium acnes* на формирование иммунитета клеточного типа

Определение уровня иммуностимуляционной активности штамма *P. acnes* CN 5936 проведено на 15 убойных телятах нч-п породы, клинически здоровых. Для определения иммунопотенции исследуемых животных перед и после иммунизации использовали фагоцитарный тест, тест нитротетразолевого синия, розетковый тест Е, эстеразный тест и тест бластической трансформации.

Через 21 день после вакцинации иммуностимулятором РА отмечено у телят рост клеточного иммунитета, выражающийся статистически существенным ростом процента нейтрофильных фагоцитирующих гранулоцитов, а также их энзиматических активностей, увеличением числа лимфоцитов, образующих розетки Е и показывающих наличие эстеразы, возбуждением свойств бластической трансформации лимфоцитов Т под влиянием митогена фитогемагглютинаина

Gos Z., Furwicz A. J., Hejman A. — Influence of immunization of calves past the vealer stage with and inactivated suspension of *Propionibacterium acnes* on the cellular type of immune response

The degree of immunostimulative activity of *P. acnes* — CN 5936 (PA) was examined on 15 normal calves past the vealer stage, black and white breed. For determining of immunopotency of the animals under study there were used phagocytic test, NBT, rosette E test, esterase test, and blastic transformation test. After 21 days since vaccination with PA there was found an increase of cellular type immunity expressed by the growth of neutrophils, their enzymatic activity, a rise of lymphocytes with E rosettes showing the presence of esterase, and stimulation of blastic transformation in T lymphocytes under the influence of phytohaemagglutinine.

HINTON M., LINTON A. H.: Oporność szczepów *Escherichia coli* izolowanych od cieląt otrzymujących karmę z dodatkiem substytutów mleka. (Antibacterial drug resistance among *Escherichia coli* isolated from calves fed milk substitute diet). Vet. Rec. 112, 567—568, 1983 (24).

Obserwacje przeprowadzono w trzech grupach cieląt (A, B, C). Cielęta z grupy B przez okres pierwszych 5 dni pobytu na fermie otrzymywały pokarm z dodatkiem substytutów mleka i furazolidonem (100 ppm). *E. coli* izolowano z wymazów rektalnych. Indeks oporności określono dla ampicyliny, chloramfenikolu, kanamycyny, nitrofurantoiny, streptomycyny, sulfatazolu i tetracykliny. Wrażliwe szczepy *E. coli* izolowano z pierwszych wymazów z prostrnicy cieląt z grup A i C, przy czym większość szczepów wyizolowanych w tym okresie posiadała do trzech determinant R. Po tygodniu znaczna większość szczepów izolowanych od cieląt posiadała co najmniej 4 determinanty R.

G.