

WIESŁAW DEPTUŁA

Nieswoista i swoista odporność komórkowa u buhajów zakażonych naturalnie wirusem IBR/IPV (Bovid herpes virus 1-BHV1)

Katedra Mikrobiologii Wydziału Biologii i Nauk o Morzu Uniwersytetu Szczecińskiego,
ul. Felczaka 3a, 71-417 Szczecin

Summary

Unspecific and specific immunity of bulls infected naturally by the Bovid herpesvirus 1 (BHV-1)

The observations were done on 10 bulls at the age of 3—4 years in two experimental groups. Group A — 5 bulls with the coital exanthema and group B — 5 healthy bulls. Clinical, bacteriological, virological (serology, immunofluorescence, cultivation) and immunological examinations were performed on days 1, 14, 28, 58 and 84. Serological examinations included a spontaneous and stimulated leukocyte migration and PMN's migration, number of PMN's, phagocytic activity of PMN, the NBT and the test of intracellular killing. Moreover, there was examined a specific cellular immunity by the skin test (DTH) against a specific antigen, by migration inhibition test of leukocytes (LMIF) and granulocytes (LIF). The presence of specific antibodies against PI-3, BHV-1, VDMD, RSV, adeno-2 and 5, BLV was determined by HI, SN, CF, immunodiffusion and ELISA. Moreover culture studies and the direct immunofluorescence test were used to detect BHV-1. Cultural studies to detect aerobic and anaerobic bacteria, mycoplasmas, ureaplasmas and sero-cultural studies to exclude chlamydial infections were performed.

In bulls with the coital exanthema besides changes in reactivity of lymphocytes B and T a profound changes concerned also the phagocytic activity of PMN's and/or leukocytes confirming the role of unspecific cellular immunity in bulls with coital exanthema.

Wirusowa etiologia otrętu była znana jest od prawie 80 lat, ale wiele zagadnień związanych z wywołującym tę chorobę wirusem, a głównie z reakcją organizmu na zakażenie wymaga wyjaśnień. W piśmiennictwie tylko nieliczne prace (6, 10) dotyczą nieswoistej i swoistej odpowiedzi komórkowej u buhajów chorujących z objawami otrętu.

Badania własne miały na celu prześledzenie dynamiki rozwoju nieswoistej i swoistej odporności komórkowej u buhajów rozplodowych chorych na otręt.

Materiał i metody

Badania wykonano na 10 buhajach rozplodowych w wieku 3—4 lat, przebywających w stacji nasieniowania bydła (SUB). Zwierzęta podzielono na dwie grupy po 5 zwierząt: chore z objawami otrętu (grupa A) i zdrowe (grupa B). Zwierzęta chore pochodziły z grupy buhajów dotkniętych otrętem, zaś buhaje zdrowe wysegregowano ze zwierząt, u których nie stwierdzono jakichkolwiek objawów nasuwających podejrzenie choroby.

U wszystkich zwierząt (grupa A i B) wykonano badania kliniczne, bakteriologiczne, wirusologiczne — (serologiczne, immunofluorescencyjne i hodowlane) oraz immunologiczne. Badania przeprowadzono 1, 14, 28, 56 i 84 dnia od rozpoczęcia obserwacji.

Wymazy do badań bakteriologicznych i wirusologicznych (hodowlane, immunofluorescencyjne) pobrano z błony śluzowej napletka i żołądź prącia, zaś krew z żyły szyjnej zewnętrznej.

Badania kliniczne oraz bakteriologiczne na obecność drobnoustrojów tlenowych i beztlenowych wykonano metodami rutynowymi. Wykluczenia u buhajów infekcji ureaplazmami, mykoplazmami dokonano metodą hodowlaną w Pracowni Instytutu Weterynarii w Puławach, prowadzonej przez doc. Pilaszka. Diagnostykę zakażeń chlamydiami wykonano badaniami hodowlanymi na zarodkach

kurzych oraz serologicznymi w teście OWD wobec antygeny firmy Dessau (NRD).

Badania wirusologiczne w kierunku izolacji wirusa BHV1 z wymazów z błony śluzowej napletka i nasienia przeprowadzono na pierwotnej hodowli komórek cieląt (pHKNC) oraz próbę immunofluorescencji bezpośredniej (IFb) wobec koniugaty firmy Bioveta Nitra (Czechosłowacja). Swoiste przeciwciała dla tego zarazka w surowicy zwierząt badano testem seroneutralizacji (SN) wobec wirusa „IBR-oko” (kolekcja prof. Buczka) (cyt. 8). Przeprowadzono także u buhajów (grupa A i B) wirusologiczne badania serologiczne na obecność wirusa PI-3 (HI), VDMD (SN), adenowirusa 2 i 5 oraz RSV (OWD) i BLV (test immunodiffuzji — ID i ELISA). Do odczynu HI użyto krajowego szczepu wirusa PI-3 (cyt. 8), zaś do testu SN dla wirusa VDMD wykonanego w pierwotnej hodowli komórek jąder buhaja (pHKJB), szczepu tego zarazka z kolekcji dr Barthya (cyt. 8). Antygen adenowirusa szczep 2 oraz swoistą króliczą surowicę odpornościową wobec tego zarazka, używaną w teście OWD, uzyskano od prof. Buczka (cyt. 8), zaś adenowirus szczep 5 i RSV, a także swoiste surowice dla nich, pochodziły z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Występowanie przeciwciał dla wirusa białaczki bydła (BLV) wykonano testem ID na firmowych zestawach Rinderleukose (Behring — RFN) oraz za pomocą zestawu ELISA — RLV, produkcji Bioveta Ivanovice (Czechosłowacja). Badania wirusologiczne na pHKNC i pHKJB wykonano metodami podanymi przez Mayra i wsp. (cyt. 8), zaś serologiczne (test SN, HI, OWD) — według instrukcji obowiązujących w ZHW w kraju.

Badania immunologiczne dotyczące określenia nieswoistej odporności komórkowej oznaczono poprzez spontaniczną i ukierunkowaną zdolność migracji leukocytów i komórek polimorfonuklearnych (PMN), aderenację i agregację komórek PMN oraz ich zdolność pochłaniania i redukcji NBT, jak też siłę wewnątrzkomórkowego zabijania leukocytów. Izolację leukocytów i komórek PMN z krwi obwodowej oraz ich test spontanicznej migracji (MS) w agarozie wykonano metodą opisaną przez Nowackiego oraz Naylora i Littlego (cyt. 8). Chemotaksję (MU) tych komórek, wobec surowicy po działaniu zymosanu, wykonano metodą Nelsona i wsp., Hermanowicza oraz Rotha i Kaerberlea (cyt. 8) i przedstawiono ją jako różnicę między MS a MU. Zdolność aderenacji (przylegania) komórek PMN oznaczono metodą Lorente i wsp., zaś agregację metodą Religi i wsp. (cyt. 8). Pochłanianie przez komórki PMN *Staphylococcus aureus* szczep 209 P wykonano metodą Brzuchowskiej i Ładosz w modyfikacji Gliškiego i wsp. oraz własnej (cyt. 8). Spoczynkowy i stymulowany lateksem test redukcji NBT przez komórki PMN wykonano zmodyfikowaną metodą Parka (cyt. 8). Oznaczono także swoistą odporność komórkową testem skórny (DTH) oraz zahamowania migracji leukocytów (LMIF) i granulocytów (LIF). Test DTH, LMIF i LIF wykonano i oceniono według metod i wobec antygenów BHV1 podanych we wcześniejszej pracy (7).

Otrzymane wyniki badań klinicznych przedstawiono opisowo, zaś badań immunologicznych (oprócz wyników testu DTH) poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy $p = 0,05$ i przedstawiono wraz z rezultatami badań wirusologicznych w tab. 1—3.

Wyniki i omówienie

U buhajów chorych objawy kliniczne o różnym nasileniu, w postaci zmian otrętowych, to jest od zaczerwienienia do punkcikowatych krwawych wylewów i ubytków na błonie śluzowej napletka i żołądź prącia, stwierdzono przez cały czas obserwacji. Były one najbardziej widoczne 1, 14 i 84 dnia. Wirus z wymazów z napletka oraz nasienia izolowano tylko od jednego buhaja, w 1 dniu badania (tab. 1). Wyniki odczynu IFb

Tab. 1. Wyniki badań wirusologicznych u 3—4-letnich buhajów zakażonych naturalnie BHV 1

Dni badania	1		14		28		56		84	
Grupa zwierząt	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Miano przeciwciał w odczynie SN	1:4 (4) 1:2 (1)	1:2 (5)	1:4 (4) 1:2 (1)	1:2 (5)	1:8 (3) 1:2 (2)	1:2 (5)	1:8 (3) 1:2 (2)	1:2 (5)	1:32 (2) 1: 8 (3)	1:2 (5)
Izolacja wirusa w hodowli komórek	p.s. (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dodatni odczyn IFb	p.s. (3)	—	p.s. (3)	—	p.s. (3)	—	p.s. (4)	—	p.s. (5)	—

Objaśnienia: A — zwierzęta chore; B — zwierzęta zdrowe, w nawiasach podano liczbę zwierząt, p — napletek; s — nasienie; „—” wynik ujemny.

Tab. 2. Wskaźniki nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej u 3—4-letnich buhajów zakażonych naturalnie BHV 1

Dni badania				1		14		28		56		84	
Grupa zwierząt				A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Migra- cja	Sponta- niczna (S) w mm	L	$\bar{x}$ min. max.	5,5 5,1—6,0	6,4 * 6,0—7,2	5,3 5,0—5,5	6,1 * 6,0—6,3	7,0 6,5—7,3	8,8 * 8,5—9,0	6,3 6,0—7,1	7,8 * 7,5—8,3	4,8 4,5—5,1	7,0 * 6,5—7,5
		G	$\bar{x}$ min. max.	5,2 5,0—5,5	5,8 * 5,5—6,3	3,9 3,5—4,3	4,9 * 4,5—5,6	4,5 4,0—5,1	5,8 * 5,3—6,2	4,8 4,5—5,0	6,3 * 6,0—7,1	4,8 4,5—5,2	6,9 * 6,5—7,2
	Ukierun- kowana (U-S) w mm	L	$\bar{x}$ min. max.	0,8 0,5—1,0	1,3 * 1,0—1,9	0,35 0,35—0,35	0,6 * 0,5—0,9	0,2 0,1—0,5	0,4 * 0,4—0,4	0,6 0,5—0,8	0,9 * 0,5—1,3	0,5 0,5—0,5	0,9 * 0,5—1,7
		G	$\bar{x}$ min. max.	0,5 0,5—0,5	1,1 * 1,0—1,3	0,3 0,1—0,5	0,5 * 0,4—1,0	0,2 0,1—0,5	0,4 * 0,2—0,5	0,3 0,1—0,5	0,7 * 0,2—1,0	0,4 0,4—0,4	0,8 * 0,5—1,3
Adherencja (%)			$\bar{x}$ min. max.	65 * 53—73	50 40—55	76 * 55—83	57 52—59	71 * 65—78	51 43—61	62 * 55—68	51 49—57	79 * 75—85	47 37—57
Agregacja (l. b.)			$\bar{x}$ min. max.	452 * 382—589	152 145—169	403 * 375—425	113 107—131	375 * 316—412	98 78—182	273 * 192—351	111 98—121	256 * 192—292	76 56—92
Zdolność pochłania- nia (indeks fagocy- tarny lif) (l. b.)			$\bar{x}$ min. max.	13,0 11,0—15,0	12,0 9,5—14,3	15,7 14,7—18,3	14,9 7,8—16,9	10,6 9,5—12,1	10,4 8,5—12,1	9,2 7,5—17,3	10,8 9,8—13,5	10,4 7,6—17,3	10,0 8,3—13,1
Procent komórek fagocytujących — % kf			$\bar{x}$ min. max.	35 * 28—41	10 8—16	14 12—19	12 10—17	16 * 14—21	8 7—11	19 * 17—24	8 4—12	16 13—23	15 14—27
Liczba kom. NBT dodat- nich	Test spon- taniczny (l. b.)	$\bar{x}$ min. max.	1 0—3	6 * 5—9	2 0—4	5 * 3—7	3 2—5	6 * 3—9	2 1—3	7 * 6—9	3 2—4	5 2—7	
	Test stymu- lowany (l. b.)	$\bar{x}$ min. max.	4 2—8	12 * 9—17	8 5—11	16 * 7—19	9 6—11	14 * 11—19	9 7—12	16 * 13—28	5 4—6	7 6—8	
Test wewnątrz- komórkowego zabijania (l. b.)			$\bar{x}$ min. max.	2,4 * 2,1—2,7	1,5 1,2—1,7	2,8 * 2,3—3,5	1,3 1,1—1,7	1,8 * 1,5—2,9	0,7 0,5—1,1	2,3 * 1,8—2,9	1,3 1,1—1,7	2,2 * 1,9—3,5	1,5 1,4—1,9

Objaśnienie: A — zwierzęta chore; B — zwierzęta zdrowe; * — różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$, l.b. — liczby bezwzględne.

Tab. 3. Wskaźniki swoistej odporności komórkowej u 3—4-letnich buhajów zakażonych naturalnie BHV 1

Dni badania			1		14		28		56		84	
Grupa zwierząt			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Reakcja testu skór-nego (DTH) po:	24 h	1	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	48 h	1	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	72 h	1	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Odczyn za-hamowa-nia migra-cji (mm ²)	Leuko-cytów	$\bar{x}$ min. max.	4,5 4,2—4,7	6,1 * 5,3—6,2	4,3 4,0—4,6	6,0 * 4,9—6,1	6,3 5,8—6,4	8,6 * 7,8—8,7	6,0 5,5—6,2	7,4 * 6,3—7,5	3,6 2,8—3,9	6,9 * 5,5—7,0
	Granu-locytów	$\bar{x}$ min. max.	4,5 4,0—4,8	5,5 * 5,3—5,8	3,8 2,9—3,9	4,7 * 4,0—4,8	3,2 2,5—3,5	5,3 * 4,3—5,5	4,1 3,5—4,2	6,1 * 5,8—6,2	4,0 3,3—4,2	6,8 * 5,5—7,0

Objaśnienia: A — zwierzęta chore; B — zwierzęta zdrowe; 1 — antygen BHV1; 2 — antygen kontrolny; * — różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$, + — odczyn DTH dodatni; + — odczyn DTH wątpliwy; — — odczyn DTH ujemny.

wykazały, że wirus IBR/IPV, tak w wymazach, jak i nasieniu, występował przez cały czas obserwacji u większości chorych sztuk (tab. 1). Miano przeciwciał dla BHV1 było dodatnie (miano równe lub powyżej 1:2) przez cały czas obserwacji i wykazywało tendencje wzrostowe (tab. 1). Maksymalne jego wartości (1:32) stwierdzono u dwóch chorych zwierząt w 84 dniu.

Badania immunologiczne (tab. 2 i 3) wykazały, że zmiany w zakresie nieswoistej odporności komórkowej (NOK) u buhajów chorych, manifestujące się wzrostem lub spadkiem ich wartości, występowały w różnym czasie i dotyczyły (oprócz IF) wszystkich badanych parametrów. Wzrost wartości obejmował zdolność adherencji, agregacji, wewnątrzkomórkowego zabijania i %kf i przypadał dla pierwszych trzech wymienionych cech na 1–84 dzień, zaś dla %kf na 1–56 dzień. Spadek wartości dotyczył spontanicznej i ukierunkowanej migracji leukocytów i komórek PMN (1–84 dzień) oraz zdolności redukcji NBT (1–56 dzień). Swoista odporność komórkowa określana testem DTH, LMIF i LIF była podwyższona przez cały czas obserwacji (1–84 dzień).

U buhajów zdrowych (grupa B) wyniki badań klinicznych oraz laboratoryjnych były negatywne. Analogiczne rezultaty zarejestrowano u zwierząt chorych (grupa A) w zakresie izolacji bakterii, ureaplazm, mykoplazm, chlamydii, jak również w zakresie obecności przeciwciał dla wirusa PI-3, VDMD, adenowirusów serotyp 2 i 5, RSV i BLV.

Analizując uzyskane wyniki badań u buhajów chorych, tak w zakresie objawów klinicznych, jak i laboratoryjnych, trzeba stwierdzić, że powstały one i są wynikiem naturalnej infekcji spowodowanej przez wirus otrętu (BHV1). Obserwowane zmiany kliniczne, jednokrotna izolacja wirusa od zwierząt dotkniętych chorobą, a nawet częściowo wartości miana przeciwciał dla BHV1, były zbliżone do badań wcześniej przeprowadzonych w kraju przez Baczyńskiego, Malewskiego, Bacharewicza i Żmudzińskiego oraz za granicą przez Boutersa, Bitscha, Strauba, Koklesa i Studderta (cyt. 6, 7). Autorzy ci, podobnie jak w badaniach własnych, wskazali także na duże kłopoty izolacji BHV1 od buhajów chorych na otręt. Trudności te, jak wynika z badań i cytowanego w nim piśmiennictwa, tłumaczy się specyfiką tej choroby, na którą składa się m.in. stan immunologiczny zwierząt, czas trwania zakażenia oraz rodzaj infekcji (1, 5, 6, 17, 20). Natomiast niewielką zbieżność wyników między testem IFb a badaniami hodowlanymi (tab. 1), potwierdziły obserwacje Neetteltona oraz Wellemansa i Leunena (cyt. 5, 6). Wynika z nich jednakże, że test IFb może być dość przydatny, głównie w badaniach wstępnych i/lub przesiewowych. Potwierdzają to wyniki badań własnych obecnych i wcześniejszych (5, 6), w których wykazano, że test IFb ściśle koreluje z odpowiedzią serologiczną i obrazem klinicznym u buhajów chorych na otręt, na co także zwrócił uwagę u bydła zakażonego BHV1 Assaf i wsp. (cyt. 6).

Obserwowane u buhajów chorych zmiany wśród parametrów immunologicznych udowadniają w pełni, jak się wydaje, udział i rolę, nie zawsze uznawaną, nieswoistej odporności komórkowej (NOK) u bydła dotkniętego wirusem IBR/IPV, jak też potwierdzają rolę swoistej odporności komórkowej (SOK). Dodać należy także, że wyniki NOK, choć także SOK u buhajów chorych na otręt, można jedynie odnosić do rezultatów badań uzyskanych u zwierząt będących w analogicznym wieku. Jak wykazano w wielu badaniach mechanizmy

NOK oraz SOK w infekcjach wirusowych u bydła są sprzężone z wiekiem i płcią (cyt. 6), a także czasem trwania infekcji (1, 20). Stąd rezultaty w zakresie NOK i SOK u badanych buhajów porównać można jedynie do wyników wcześniejszych badań własnych (6, 10), zaś wyniki SOK — dodatkowo jeszcze do badań przedstawionych przez Ruttena i wsp. (22). Rezultaty te (1, 6, 10, 20) potwierdzają obecne obserwacje, tak w zakresie dynamiki zmian, jak i ich jakości. Należy jednak uzupełnić, że rolę i udział NOK i SOK opisywało wcześniej wielu autorów (cyt. 5–12 oraz 1, 2, 4, 14, 16, 17, 20), jednak dotyczyły one bydła w wieku 2–16 miesięcy oraz krów zakażonych naturalnie i eksperymentalnie BHV1.

Powyższe fakty dotyczące udziału NOK u bydła zainfekowanego BHV1 przedstawiane w badaniach i cytowane w piśmiennictwie (cyt. 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12), a także ścisła korelacja między wynikiem NOK a wynikami badań serologicznych i klinicznych u buhajów chorych na otręt, udowadniają przeciwwirusową rolę procesu fagocytozy komórek PMN i (lub) leukocytów krwi obwodowej. Tezę tę potwierdzają także, w sposób bezsporny, badania z ostatnich 2 lat, dotyczące metabolizmu tlenowego tych komórek i udziału jego form jako elementów przeciwwirusowych (13, 15, 19, 21), a także wykazanie, iż komórki PMN syntetyzują u bydła IL-1 (3) substancję gwarantującą łączenie elementów nieswoistej i swoistej odporności.

Obserwowana u buhajów chorych na otręt odmienna reakcja poszczególnych badanych cech procesu fagocytozy potwierdza wyniki Ward i Varani (23), lecz także jest w pewnym stopniu niezgodna z wynikami przedstawionymi w modelowych badaniach przez Laurenta i wsp. (18). Ci ostatni autorzy (18) stwierdzają, że adherencja komórek PMN u osobników zdrowych zwiększa się wraz z ich aktywnością tlenową. Wydaje się, że stwierdzony spadek metabolizmu tlenowego komórek PMN oraz zwiększona ich adherencja i agregacja jest efektem zainfekowania buhajów BHV1. Potwierdzałoby to założenia Ward i Varni (23), którzy podali, że przemiany tlenowe komórek PMN nie muszą dodatnio korelować z wewnątrzkomórkowym zabijaniem tych elementów. Należy również dodać, że obserwowany wzrost i spadek wartości oznaczanych parametrów procesu fagocytozy u buhajów chorych na otręt potwierdza badania Briggsa i wsp. (1) oraz Noela i wsp. (20), którzy analogiczne zmiany, wprowadzie u cieląt, tłumaczą różnym czasem trwania zakażenia BHV1, co w konsekwencji może prowadzić do różnej reaktywności komórek PMN.

Analizując wyniki badań w zakresie SOK należy stwierdzić, że są one zgodne z rezultatami przedstawionymi przez wielu autorów (cyt. 5–8 oraz 2, 4, 14, 16, 22), a także z wynikami wcześniejszych badań własnych (5–8, 10–12) u bydła (cielęta, krowy) w wieku od 2 miesięcy do 6 lat, zakażonego wirusem IBR/IPV. W badaniach tych każdorazowo rejestrowano podwyższenie SOK, niezależnie czy odporność ta była mierzona testem DTH, DTH i LMIF; DTH, LMIF i LIF, czy testem transformacji blastycznej limfocytów i sekrecji IL-1.

Reasumując wyniki badań stwierdzić należy, że u buhajów rozplodowych chorych na otręt dochodzi nie tylko do zmian w obrębie reaktywności limfocytów T i B, ale równoległe z nimi stwierdza się bardzo duże zmiany w procesie fagocytozy komórek PMN i leukocytów. Zmia-

ny te dokumentują w pełni udział i rolę procesu fagocytozy komórek PMN i leukocytów w obronności u buhajów zakażonych wirusem otruętu.

Piśmiennictwo

1. Briggs R. E., Kehrli M., Frank G. H.: *Am. J. vet. Res.* 49, 681, 1988.
2. Brown G. A., Partridge L., Field H. J.: *Vet. Record* 127, 454, 1990.
3. Canning P. C., Neill J. D.: *J. Leuk. Biol.* 45, 21, 1989.
4. Carter J. J., Weinberg A. D., Pollard A., Reeves R., Magnuson J. A., Magnuson N. S.: *J. Virol.* 63, 1525, 1989.
5. Deptuła W.: *Proc. 15th World Buiatrics Congress* 1, 191, 1988.
6. Deptuła W.: Wskaźniki odporności u bydła zakażonego wirusem IBR/IPV (Bovine herpes virus 1 — BHV1) oraz ich wykorzystanie w profilaktyce otruętu w wychowalni buhajów. *Rozprawy Naukowe AR*, nr 107, Lublin, 1988.
7. Deptuła W.: *Medycyna Wet.* 46, 385, 1990.
8. Deptuła W.: *Pol. Arch. Wet.* 31, 29, 1991.
9. Deptuła W., Buczek J.: *Medycyna Wet.* 40, 200, 1984.
10. Deptuła W., Buczek J.: *Mat. IV Symp. Wirusol. Łódź*, 1985, s. 47.
11. Deptuła W., Buczek J.: *Acta microbiol. polonica* 33, 293, 1988.
12. Deptuła W., Buczek J.: *Proc. XVI World Buiatrics Congress* 1, 1139, 1990.
13. Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D.: *Int. Immunity* 57, 3142, 1989.
14. Griebel P. J., Quattiere L., Davis W. C., Gee A., Ohmann H. B., Lauman M. J. P., Babiuch L. A.: *Viral Immun.* 1, 287, 1987/88.
15. Heidel J. R., Taylor S. M., Laegreid W. W., Silflow R. M., Liggitt H. P., Leid R. W.: *J. Leuk. Biol.* 46, 41, 1989.
16. Hutchings D. L., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A.: *J. Virol.* 64, 5114, 1990.
17. Kutish G., Mainprize T., Rock D.: *J. Virol.* 64, 5730, 1990.
18. Laurent F., Bendiel A. M., Capo C., Bongrad P.: *J. Leuk. Biol.* 49, 217, 1991.
19. Mayer S. J., Keen P. M., Craven N., Bourne F. J.: *J. Leuk. Biol.* 45, 239, 1989.
20. Noel E. J., Israel B. A., Letchworth III G. J., Czupryński C. J.: *Vaccine* 6, 433, 1988.
21. Romeo D., Skerlavaj D., Bolognesi M., Gennaro R.: *J. Biol. Chemistry* 263, 9573, 1988.
22. Rutten V. P. M. G., Wentint G. H., De Jong W. A. C., Van Etsel A. C. A., Hensen E. J.: *Vet. Immun. Immunopathol.* 25, 259, 1990.
23. Ward P. A., Varani J.: *J. Leuk. Biol.* 48, 97, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Wiesław Deptuła, ul. Falczaka 3a, 74-417 Szczecin

PRAKTYKA LABORATORYJNA

KATARZYNA SKORUPA, ZDZISŁAW E. SIKORSKI

Otrzymywanie peptonów dla celów mikrobiologicznych z niejadalnych części filetów dorsza

Katedra Technologii Utrwalania Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, ul. Majakowskiego 11/12 80-952 Gdańsk

Summary

Utilization of fishery wastes for the production of peptones for microbiological purposes

Belly flaps of frozen cod fillets not suitable for consumption because of parasitic contamination were used as a raw material to obtain peptones for microbiological purposes. Hydrolysis on a laboratory scale was being performed for 6 hours in a reaction mixture; it contained 5 parts of minced fish meat and 1 part of minced porcine pancreas (temperature 40°C, pH 7.0). The hydrolysates contained 0.8% of total nitrogen, 0.1% of alfa-amino nitrogen and 3.8% of ash. The colour of the hydrolysates was similar to that of standard peptones. Their slightly perceptible fish smell was not assessed as a negative feature. The growth promoting activity of the cod peptones was compared with that of Bacto-Tryptone, Bacto-Tryptose, Bacto-Peptone, and Proteose-Peptone. The growth of *E. coli* and *Staph. aureus* strains was better on media based on the fish peptones than that on commercially available peptones.

Podłoża mikrobiologiczne winny zawierać składniki niezbędne do prawidłowego rozwoju hodowanych na nich drobnoustrojów. Bazą do ich sporządzania są peptony — hydrolizaty białkowe składające się przede wszystkim z wolnych aminokwasów i peptydów.

Do przemysłowego wytwarzania peptonów stosuje się najczęściej mięso wołowe, wieprzowe, cielęce lub końskie bardzo dobrej jakości, tzn. bez tkanki tłuszczowej i zawierające niewiele tkanki łącznej. Nie gorsze efekty można by uzyskać wykorzystując surowce rybne nie nadające się do konsumpcji np. z powodu małej przydatności do przetwórstwa, niepożądanych cech sensorycznych lub dużego zarażenia pasożytami (2, 3, 4). Wśród takich surowców mogłyby być również ryby dorszowate. Płaty brzuszne tych ryb są bardzo często zarażone pasożytami i w związku z tym oddziela się je

już w trakcie filetowania. Są one szczególnie przydatne, ponieważ są bogate w białka mięśniowe i zawierają mniej niż 1% tłuszczu, nie jest więc konieczne odtłuszczenie w trakcie procesu wytwarzania peptonu.

Celem badań było ustalenie parametrów procesu wytwarzania peptonów mikrobiologicznych z nieprzydatnych do spożycia części filetów dorsza.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na płatach brzusznych filetów dorszowych, które ze względu na skażenie martwymi pasożytami nie zostały dopuszczone do konsumpcji w RFN. Zgodnie z procedurą opracowaną przez Dunajskiego i wsp. (1) mięso dorsza, przechowywane przez około 5 miesięcy w temp. -20°C, po częściowym rozmrożeniu mielono przez siatkę o średnicy oczek 3 mm i po porcjowaniu ponownie zamrażano w temp. -20°C. Bezpośrednio przed reakcją hydrolizy rozdrobnione mięso rozmrażano i homogenizowano z dodatkiem wody (stosunek mięsa do wody 2:1). Hydrolizę 50 g mięsa przeprowadzano z użyciem trzustki wołowej w temp. 40°C w kolbie stożkowej umieszczonej w termostatawanej wstrząsarce. Czas hydrolizy oraz udział trzustki były parametrami zmiennymi.

Świeżą trzustkę, otrzymaną z Gdańskich Zakładów Mięsnych w dniu uboju zwierzęcia, po oczyszczeniu z tkanki łącznej i tłuszczowej i zmieleniu (podobnie jak mięso), przetrzymywano w temp. 4°C przez 24 godziny w celu wstępnej aktywacji enzymów. Następnie przechowywano ją w temp. -20°C. Rozmrożoną trzustkę dodawano do homogenatu o określonym pH, ograniczając do temp. reakcji. W celu przerwania hydrolizy ogrzewano mieszaninę reakcyjną do wrzenia. Gorący hydrolizat filtrowano na lejek Büchnera. Po jednokrotnej filtracji otrzymywano klarowny przesącz. Do oznaczeń chemicznych pobierano próbki z mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio po zmieszaniu substratów oraz z hydrolizatu. Nie opracowano jeszcze w tym stadium doświadczeń optymalnych parametrów suszenia hydrolizatów. Uzyskane produkty ciekłe przeznaczone do badań mikrobiologicznych przechowywano w temp. -20°C.

W mieszaninach reakcyjnych i hydrolizatach oznaczano: suchą masę — metodą suszarkową w temp. 105°C, azot ogólny — metodą Kjeldahla i azot aminowy — metodą Sørensen. Ponadto oznaczano suchą masę i azot ogólny