

15. Pinkiewicz E., Madej E.: Acta parasit. pol. 15, 225, 1967.
16. Peters E., Weingärtner E.: Dt. tierärztl. Wschr. 78, 535, 1971.
17. Ross J. G., Todd J. R., Dow C.: J. comp. Path. 76, 67, 1966.
18. Sinclair K. B.: Vet. Rec. 72, 17, 1960.
19. Sinclair K. B.: Br. vet. J. 118, 37, 1962.
20. Simensen G. H., Eriksen L., Nansen P., Andersen S., Nielsen K.: Nord. Vet. Med. 20, 638, 1968.
21. Sykes A. R., Coop R. L., Rushton B.: Res. vet. Sci. 28, 63, 1980.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Lech Gundlach, ul. Sowińskiego 8/37, 20-040 Lublin

Гундлах Е. Л., Садзиковский А., Ухач С. — Изменения уровня избранных минеральных веществ в сыворотках телят в ходе экспериментальной инвазии и сверхинвазии *Fasciola hepatica*

Уровень Са, Mg, Na, К, Zn, Cu и Fe в сыворотках телят определяли методом ASA, а Р — методом Фиске-Суббарова. У телят, зараженных однократно метацирками *F. hepatica*, отметили понижение уровня Са и Zn во всем периоде опыта и понижение уровня Р и Cu только в патентном периоде. Похоже в патентном периоде наблюдали понижение уровня Fe. Рост уровня Na отметили

лишь на 8 и 13 нед. инвазии, не наблюдали же изменений уровня Mg. Влияние одно- либо двукратной сверхинвазии выражалось более отчетливыми изменениями исследуемых минеральных веществ, особенно в конечной фазе опыта.

Gundlach J. L., Sadzikowski A., Uchacz S. — Changes of chosen mineral elements in blood sera of calves in the course of experimental invasion and hyperinvasion of the Liver fluke, *Fasciola hepatica*

In blood sera of calves the level of Ca, Mg, Na, K, Zn, Cu and Fe was determined by the method of ASA, the content of P was determined by the method of Fiske-Subbarow. In calves infested once with *F. hepatica* metacercariae the level of Ca and Zn decreased during the experiment and the level of P and Cu lowered only in a patent period. Similarly, in a patent period decreased the level of Fe. The content of Na increased only at 8 and 13 week of invasion, however, the level of Mg was unchanged. One fold invasion or two-fold superinvasion affect more clearly the content of the examined minerals in blood, especially at the end of the experiment.

ANDRZEJ STRYSZAK

Próba określania swoistości niskich mian aglutynacyjnych z antygenem *Francisella tularensis*

Pracownia Badania Brucelozy Instytutu Weterynarii, filia w Gdańsku, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

W latach siedemdziesiątych ukazały się w polskim piśmiennictwie dwie znaczące monografie poświęcone tularemii autorstwa Bileckiego (2) i Skrodzkiego (13), będące efektem długoletnich badań nad tą chorobą. Obecnie obserwuje się spadek zainteresowania tularemią w kraju, co w odniesieniu do weterynarii związane jest z jej rzadkim rozpoznawaniem w Polsce oraz niewielkimi stratami, jakie powoduje w hodowli.

Zawsze jednak aktualny pozostaje problem tularemii jako zoonozy, pomimo jedynie sporadycznych przypadków zachorowań u ludzi. Wskazuje on na potrzebę doskonalenia metod diagnozowania zakażeń wywoływanych przez *Francisella tularensis* zarówno u ludzi, jak i u zwierząt.

Wśród tych metod poczesne miejsce zajmuje serodiagnostyka. Najpowszechniej zaś stosowaną w świecie i często jedyną metodą serologicznego rozpoznawania tularemii jest odczyn aglutynacji — OA (8, 17). Odczyn ten, pomimo znacznej wartości, obarczony jest jednak poważnym błędem nieswoistości. Powoduje to dużą rozpiętość w wysokości mian, które poszczególni autorzy uważają za diagnostycznie istotne. Pionierzy badań nad tularemią, Francis i Evans (cyt. 17), za takie miano u ludzi przyjęli ≥ 80 . Natomiast według Skrodzkiego (13) każde miano tego odczynu należy brać pod uwagę, gdyż miana 1:20 i niższe mogą wystąpić

we wczesnej fazie choroby oraz w okresie zdrowienia. U zwierząt zdaniem Adamowicza i wsp. (cyt. 2), miano OA 1:10 jest nieswoiste zaledwie w 1—5% przypadków; w ognisku tularemii autorzy ci stwierdzili miana od 1:10 do 1:160, najczęściej zaś 1:10 i 1:20. Mörner i Sandsedt (12) natomiast miana poniżej 1:100 u zwierząt uważają za nieswoiste.

W celu potwierdzenia infekcji zaleca się śledzenie dynamiki narastania mian u badanego osobnika. Niektórzy autorzy przyjmują, że czterokrotny lub wyższy wzrost miana w kolejnym badaniu świadczy o zakażeniu *Fr. tularensis* (8, 17). Ma to jednak znaczenie w przypadku procesu świeżego, zwłaszcza u ludzi, w celu zastosowania odpowiedniej terapii. Natomiast utrzymujące się niskie miana aglutynin zawsze budzą wątpliwość (2). Mogą one być efektem zakażenia chronicznego, lub też mogą posiadać charakter nieswoisty.

Celem pracy była próba różnicowania swoistych i nieswoistych reakcji w OA z antygenem *Fr. tularensis* w zakresie niskich mian. Zamierzano to osiągnąć poprzez równoczesne zastosowanie obok OA, odczynów dotąd nie używanych rutynowo w serodiagnostyce tularemii. Wyniki tych odczynów, z których każdy wykrywa inny rodzaj przeciwciał, pozwoliłyby ocenić swoistość dodatniej reakcji w OA. Zastosowano zestaw testów służących w Pracowni Badania Brucelozy Instytutu Weterynarii do

określenia swoistości mian aglutynacyjnych przy brucelozie, tj. odczyn z 2-markaptoetanolem (OME), odczyn wiązania dopełniacza (OWD) oraz odczyn antyglobulinowy (OAG). W realizacji tego celu, jako surowice zawierające aglutyniny nieswoiste reagujące z antygenem *Francisella* wykorzystano surowice bydła zakażonego brucelozą. Wiadomo bowiem, że aglutyniny anti-*Br. abortus* wykazują zdolność krzyżowego zlepiania pałeczek tularemii (4).

jących przy rozpoznawaniu brucelozy bydła (6, 9, 10, 18). Stosowano pięciopunktową skalę ocen od — do +++++. W celu określenia niskich mian z antygenem *Fr. tularensis* odczyn nastawiano od rozcieńczenia surowic 1:5. W OWD na tularemii wprowadzono modyfikację polegającą na użyciu 4 jednostek dopełniacza (4C_{H50}). Antygen w tym odczynie wymianowano w układzie szachownicy wobec surowicy anti-*Francisella*; w badaniu użyto optymalnego jego rozcieńczenia 1:50. W OAG w kierunku tularemii surowicę antyglobulinową stosowano w rozcieńczeniu roboczym jak przy brucelozie (18).

Materiał i metody

Surowice: a) 35 surowic krów ze stad zakażonych brucelozą, którą stwierdzono na podstawie wysokich mian OA, OWD i OAG oraz na podstawie izolacji pałeczek *Br. abortus*, biotyp 1, od wybranych zwierząt z tych stad; b) dodatnia surowica anti-*Francisella*, produkcji Bioweta, Czechosłowacja.

Antygeny: a) standaryzowana zawiesina *Br. abortus* S₁₉ do aglutynacji (Brucellognost) oraz do OWD, produkcji Biowet, Puławy; b) zawiesina standardowych szczepów *Fr. tularensis*, produkcji Bioweta, Czechosłowacja.

Odczyny serologiczne: OA, OWD, OAG i OME wykonywano według technik standardowych obowiązujących

Wyniki i omówienie

Występowanie aglutynin reagujących krzyżowo z pałeczkami franciseli i bruceli było opisywane wielokrotnie (1, 2, 4, 13). Przyjmuje się, że odpowiednio wyższe miano z danym antygenem świadczy o zakażeniu odnośną jednostką chorobową (1, 3). Wyniki badań własnych oraz dane o pochodzeniu surowic jednoznacznie potwierdzają ten pogląd. Spośród 35 badanych surowic bydła chorego na brucelozę (tab. 1), w 30 stwierdzono niskie miana w OA z antygenem *Fr. tularensis*, które należy uznać za nieswoiste (tab. 2): Wskazać trzeba, że jako roz-

Tab. 1. Końcowe miana z antygenem *Br. abortus* uzyskane w badaniu serologicznym 35 surowic krów zakażonych brucelozą

Odczyn	Liczba surowic o mianie końcowym 1:											
	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800	25 600	51 200
OA	1		2	9	11	7	3	2				
OAG*)					1	2		10	10	9	1	2
OVD	Liczba surowic o mianie końcowym 1:											
	20	40	80	160	320	640	1280					
OVD	2	1	6	13	6	4	3					

Objaśnienia: *) miana OAG wykazywały co najmniej trzykrotne przewyższenie nad miano OA, co stanowi wynik dodatni — tylko w 2 surowicach uzyskano dwukrotne przewyższenie (wynik wątpliwy) przy dodatnich wynikach OWD i OA.

Tab. 2. Końcowe miana z antygenem *Fr. tularensis* uzyskane w badaniu serologicznym 35 surowic krów zakażonych brucelozą oraz w surowicy kontrolnej anti-*Francisella*

Odczyn	Liczba (%) surowic anti- <i>Brucella</i> o mianie końcowym:								Razem	Miano końcowe surowicy anti- <i>Francisella</i>
	1:5			1:10		1:20				
	+	++	+++	+	++	+	++			
OA	6 (17,1)	6 (17,1)	1 (2,9)	9 (25,7)	4 (11,4)	3 (8,6)	1 (2,9)	30 (85,7)	1:640+	
OME	1 (2,9)	—	—	—	—	—	—	1 (2,9)	1:40++	
OVD	—	—	—	—	—	—	—	0	1:160+	
OAG	—	—	—	—	—	—	—	0	*)	

Objaśnienie: *) nie wykonano z powodu braku informacji o pochodzeniu gatunkowym surowicy.

ciężczalnik w OA na tularemię, podobnie jak i na brucelozę, stosowano 5% roztwór NaCl, w miejsce stosowanego w innych placówkach roztworu fizjologicznego (13). Podwyższona w ten sposób siła jonowa środowiska reakcji powoduje większą aktywność IgG₁ (5), zwiększając swoistość odczynu. Mimo to miana nieswoiste wystąpiły w znacznym odsetku — 85,7% (tab. 2)

W podobnych badaniach Behan i Klein (1), w 34 surowicach ludzi podejrzanych o zakażenie brucelozą na podstawie miana OA ≥ 160 , w 8 surowicach (23,5%) stwierdzili krzyżowe reakcje aglutynacji z antygenem *Fr. tularensis*. Reakcje te uległy znacznej redukcji pod wpływem ditiotreitolu (DTT — powodujący redukcję IgM podobnie jak 2-merkaptoetanol — 2-ME), co sugeruje, że odpowiedzialne za reakcje krzyżowe są przeciwciała klasy IgM. Wskazuje to na szczególne znaczenie odczynów redukujących IgM przy określaniu swoistości mian OA. Przeciwciała tej klasy wykazują bowiem najwyższą aktywność w reakcji aglutynacji, wyższą niż IgG, także w diagnozowaniu tularemii (8). W badaniach własnych nieswoiste miana OA na tularemię uległy również redukcji pod wpływem 2-ME, tylko w jednym przypadku zanotowano w OME wynik 1:5+. Dowodzi to, że zostały one wywołane przez IgM. Natomiast w OME wykonanym z surowicą anty-*Francisella* uzyskano wynik 1:40+, przy mianie aglutynacji 1:640+ (tab. 2). Wskazuje to na obecność przeciwciał zarówno klasy IgM, jak i IgG anty-*Fr. tularensis* w tej surowicy. Wspomniani wyżej autorzy (1) nie polecają jednak stosowania odczynu z DTT do rozpoznawania tularemii, gdyż powoduje on także redukcję swoistych przeciwciał IgM anty-*Francisella*.

Uwzględniając słuszność powyższego zastrzeżenia, zastosowano w badaniach własnych obok OME, również OWD i OAG. Wyniki uzyskane w tych odczynach miały dostarczyć dodatkowych informacji pomocnych w ocenie swoistości aglutynin IgM. Aby to uzasadnić, celowe wydaje się podanie opisu odpowiedzi humoralnej na zakażenie pałeczką tularemii. Badania ostatnich lat wykonane przez autorów fińskich u ludzi wskazują, że ma ona przebieg nietypowy (8, 17).

Przeciwciała klas IgG, IgM i IgA anty-*Francisella* pojawiają się równocześnie w surowicy od 1 do 18 dnia po wystąpieniu objawów, przy czym IgG mają tendencję do wcześniejszego występowania. Najwyższy poziom IgG osiągają średnio 41 dnia IgM — 38 dnia oraz IgA — 33 dnia od momentu stwierdzenia objawów tularemii. Z badań wspomnianych autorów (8) wynika, że synteza wszystkich trzech klas Ig odbywa się w sposób ciągły w okresie co najmniej 11 lat.

Wczesne występowanie IgG oraz obecność IgM przez wiele lat po zakażeniu stanowią o wyjątkowym charakterze odpowiedzi humoral-

nej przy tularemii. Z reguły bowiem aktywność IgM związana jest z pierwotną odpowiedzią immunologiczną, IgG pojawiają się później, a te pierwsze po kilku miesiącach od zakażenia zanikają w surowicy.

Występowanie przetrwałych IgM anty-*Francisella* wydaje się wyjaśniać wysoką wartość OA w diagnozowaniu tularemii w każdym okresie zakażenia w związku z ich wysoką aglutynabiłnością. Natomiast w przypadku brucelozы swoiste IgM zanikają po kilku miesiącach od momentu zakażenia, stąd w chronicznej fazie tej choroby OA daje często wyniki fałszywie ujemne (15).

Powyższe uwagi wskazują, że w odniesieniu do brucelozы redukcja IgM w OME w kilku kolejnych badaniach w zasadzie wystarcza do określenia ich nieswoistego charakteru, z uwagi na ich brak w okresie chronicznym choroby. Natomiast w przypadku tularemii ujemny wynik OME przy dodatnim wyniku OA, wskazujący na obecność IgM, jest jedynie sygnałem, że wywołana przez nie reakcja aglutynacji może mieć charakter nieswoisty. Wykonanie kilku kolejnych badań nie ma w tym przypadku znaczenia z uwagi na ich stałe występowanie w surowicy po zakażeniu *Fr. tularensis*.

Stąd istotne jest określenie występowania innych rodzajów przeciwciał anty-*Francisella*. W przebiegu tularemii obok aglutynin występują również przeciwciała wiążące dopełniacz (7, 8, 14). Koskela i Salminen (8), stosując technikę CF-ELISA (Complement fixing-ELISA) stwierdzili, że przeciwciała wiążące C' pojawiają się u ludzi równocześnie z aglutyninami od 4 do 11 dnia po wystąpieniu objawów choroby i podobnie jak one utrzymują się w surowicy przez okres co najmniej 11 lat. Wskazuje to na podobną wartość OWD jak OA w rozpoznawaniu tularemii. Klasyczny OWD jest jednak odczynem bardziej swoistym, gdyż przeciwciała IgG₁ wykazują w nim znacznie wyższą aktywność niż IgM, zaś IgG₂ i IgA w ogóle nie wiążą C' (cyt. 16). Wskazuje to, że na podstawie wyniku OWD można z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić lub zanegować swoistość dodatniej reakcji aglutynacji spowodowanej przez IgM. W badanych surowicach bydłych wykazujących nieswoiste miana w OA na tularemię, OWD był ujemny w każdym przypadku, zaś w surowicy anty-*Francisella* wykazał miano 1:160+ (tab. 2).

W diagnozowaniu tularemii OWD nie znalazł szerszego zastosowania (14). Należy zaznaczyć, że w badaniach własnych zastosowano precyzyjną metodę tego odczynu, opartą na technice 50% lizy krwinek (10), zwiększającą powtarzalność metody. Ponadto użyto 4 jednostek dopełniacza (4C'H₅₀), co zmniejsza aktywność antykomplementarną niektórych badanych surowic. Ten ostatni czynnik jest istotną przeszkodą w stosowaniu OWD na tularemię (7).

Niewiele jest informacji o stosowaniu OAG w diagnostyce tularemii (11, 13). W dostępnym

piśmiennictwie brak ich zupełnie w odniesieniu do zwierząt. Natomiast u ludzi stwierdzono występowanie aglutynin niekompletnych w późniejszym okresie po zakażeniu oraz OAG przewyższał OA pod względem czułości (11). Zdaniem Bileckiego (2), przez analogię do brucelozy, przeciwciała niekompletne winny również występować u zwierząt zakażonych *Fr. tularensis*. Pogląd ten wydaje się słuszny. W chronicznej postaci brucelozy u bydła OAG okazał się odczynem czulszym od OA i OWD (15). Przytoczone dane pozwalają sądzić, że OAG ma znaczną wartość w rozpoznawaniu tularemii u zwierząt. Jego wynik, podobnie jak wynik OWD, pozwala wnikliwiej ocenić dodatnią reakcję aglutynacji. W badaniach własnych wyniki OAG były ujemne we wszystkich surowicach krów chorych na brucelozę, wykazujących nieswoiste miana w OA z antygenem *Fr. tularensis* (tab. 2).

Przedstawiona wyżej metoda oceny swoistości niskich mian OA z antygenem *Fr. tularensis* uwzględnia zarówno specyfikę odpowiedzi humoralnej w przebiegu tularemii, jak również udział poszczególnych Ig w zastosowanych w tym celu odczynach serologicznych. Nieswoisty charakter aglutynin reagujących z pałeczką tularemii w surowicach krów zakażonych brucelozą potwierdziły ujemne wyniki OME, OWD i OAG. Natomiast swoistość tych aglutynin w surowicy anty-*Francisella* potwierdziły dodatnie reakcje w OWD i OME. OAG nie wykonano ze względu na nieznanne pochodzenie gatunkowe tej surowicy.

Jest zrozumiałe, że OWD i OAG mogą być stosowane nie tylko do oceny swoistości mian OA. Ich rutynowe użycie zwiększa nie tylko prawdopodobieństwo trafności diagnozy tularemii, ale w ogóle możliwość jej wykrycia zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Oparcie rozpoznania serologicznego tylko na wyniku OA może być niekiedy błędne z powodu zdarzających się w tym odczynie wyników fałszywie ujemnych (11, 17). W celu wszechstronnego określenia wartości diagnostycznej zastosowanych odczynów wymagane są dalsze badania, głównie z użyciem surowic zawierających przeciwciała anty-*Fr. tularensis*.

Wnioski

1. Aglutyniny anty-*Br. abortus* reagujące krzyżowo z antygenem *Fr. tularensis* występują w klasie IgM.

2. Swoistość niskich mian OA z zawiesiną franciseli można określić przez dodatkowe badanie surowicy w OME, OWD i OAG.

Piśmiennictwo

- Behan K. A., Klein G. C.: J. Clin. Microbiol. 16, 756, 1982.
- Bilecki S.: Tularemia, PWRiL, Warszawa, 1974.
- Bilecki S., Dymśa-Stypukowska A.: Pol. Arch. wet. 15, 237, 1972.
- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S.: Microbiology, Harper & Row, Publishers, Inc., 1980, s. 685.
- Hajdu S., Beseda I., Polek B.: Vet. Med. Praga. 19, 141, 1974.

- Instrukcja nr 15 Min. Rol. Dep. Wet. z 27.10.1964 r. w sprawie wykonywania badań na brucelozę aglutynacji probówkowej.
- Koskela P.: Vaccine, 3, 389, 1985.
- Koskela P., Salmiinen A.: J. Clin. Microbiol., 22, 973, 1985.
- Królak M., Stryszak A.: Standardowa technika odczynu z 2-merkaptotetanolem (OME) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. Instytut Wet., Puławy, 1979.
- Królak M., Truszczyński M., Błaszczak B.: Instrukcja nr 52 Min. Rol. Dep. Wet. z 31.05.1980 r. w sprawie standardowej techniki odczynu wiązania dopełniacza w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
- Lutyński R., Doleżał M.: Post. Hig. Med. Dośw., 12, 537, 1958.
- Mörner T., Sandsedt K.: Nord. Vet.-Med., 35, 82, 1983.
- Skródzki E.: Tularemia, PZWL, Warszawa, 1978.
- Skródzki E., Tomaszunas S., Kubanek Z.: Prz. epid. 10, 347, 1956.
- Stryszak A.: Odczyn kwasnej aglutynacji płytowej (OKAP) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. Praca doktorska, Instytut Wet., Gdańsk, 1983.
- Stryszak A., Królak M.: Medycyna Wet., 37, 328, 1981.
- Syrjälä H., Koskela P., Ripatti T., Salmiinen A., Herwa E.: J. Infect. Dis., 153, 142, 1986.
- Wiśniewski J., Królak M., Drożdżyńska M.: Standardowa technika odczynu antyglobulinowego (OAG) w rozpoznawaniu brucelozy bydła. Instytut Wet., Puławy 1978.

Adres autora: dr Andrzej Stryszak, ul. Czerwonych Kosynierów 106/11, 81-216 Gdynia

Стрешак А. — Попытка определения специфичности низких агглютинационных титров с антигеном *Francisella tularensis*

Антигенное средство между *Br. abortus* и *Fr. tularensis* вызывает появление агглютининов реагирующих перекрестно с этими микроорганизмами. Это подтверждено в исследовании 35 сывороток коров, зараженных бруцеллезом — в 30 из них (85,7%) отмечено низкие неспецифические реакции в OA с антигеном *Francisella*. Они редуцировались в OME, что показывает, что они были вызваны IgM. Редукция IgM, не достаточна, однако, для подтверждения их неспецифического характера в исследовании неизвестных сывороток из-за нетипичного, постоянного наличия также специфических противотел этого класса в сыворотках животных, зараженных туляремией. Поэтому дополнительно применено OWD и OAC, отрицательные результаты которых в исследуемых сыворотках подтвердили неспецифичность титров OA с антигеном *Francisella*. На пригодность OME и OWD к распознаванию туляремии показали положительные результаты этих реакций в сыворотке анти-*Fr. tularensis*. В работе внушается применение всех употребленных реакций в рутинной серодиагностике туляремии.

Stryszak A. — An attempt to determine the specificity of low titres of agglutinins against *Francisella tularensis*

The antigenic relationship between *Brucella abortus* and *Francisella tularensis* results in the occurrence of agglutinins cross-reacting with the germs. That was confirmed when 35 cow sera coming from infected animals with *Brucella* sp. were examined; in 30 (85,7%) sera non-specific antibodies against *Francisella* antigen were observed, in low titres. The titres were reduced after the action of mercaptoethanol that pointed to the presence of IgM antibodies. The negative results in the complement fixation test and agglutination test with *Francisella* antigen confirmed the presence in those sera non-specific agglutinins. The usefulness of the CFT and treatment with mercaptoethanol in the diagnosis of tularemia was supported by positive serologic reactions of the tests with specific antisera against *Fr. tularensis*. The author suggests to employ all the tests in the routines serodiagnostics of tularemia.