

CHOROBY INWAZYJNE

JERZY SZAFIARSKI, JAN NAWROCKI

Zastosowanie frakcji wielocukrowej i białkowej przy diagnostyce motylicy u owiec

Państwowy Instytut Weterynaryjny — Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach
Kierownik: dr JERZY SZAFIARSKI

Praca niniejsza jest dalszą częścią badań przeprowadzanych w Wojewódzkim Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Katowicach, wykonywanych na zlecenie Min. Rol. i Ref. Rol. Departament Weterynarii i Dyrekcji P. I. W. w Puławach.

Do roku 1923 wielocukrom nie przypisywano jako wywoływancom większej roli. Dopiero w tym roku Avery i Heidelberger wyodrębnili z pneumokoków wielocukier reagujący z surowicą pneumokokową, a w następnym roku Przesmycki wyisobnił go z meningokoków. Dalsze lata przyniosły doniesienia o otrzymaniu wielocukrów z szeregu bakterii i grzybków. Antygeny wielocukrowe reagują z odpowiednimi surowicami przeciwbakteryjnymi w wysokich rozcieńczeniach. Wg Campbella uzyskana przez niego frakcja polisacharydowa szczególnie nadawała się jako wywoływanca przy glistnicy u koni. Według Mikulaszka w tkankach robaków pasożytujących wykazać można obecność przynajmniej trzech frakcji antygenowych, a mianowicie: nukleoproteinowej, lipinowej i wielocukrowej.

Frakcja nukleoproteinowa jest na ogół słabym antygenem, o swoistości raczej grupowej; daje słabe odczyny z surowicami uodpornionych królików, a zupełnie ujemne z surowicami chorego bydła. Frakcja ta nie może być użyta do rozpoznawania serologicznego motylicy.

Frakcja lipinowa daje jako antygen cząstkowy czułe, lecz grupowo nieswoiste odczyny. Frakcja lipinową wiąże dopełniacz zarówno w obecności surowicy królików uodpornionych sztucznie, jak i surowicy chorego na motylicę bydła. Odczyn wiązania dopełniacza z wyciągiem wodnym pasożytów motylicy i frakcją lipinową wykazuje dostateczną zgodność z badaniem anatomo-patologicznym.

Frakcja wielocukrowa, prawdopodobnie glikogen, jest antygenem czułym, o swoistości gatunkowej; daje czułe odczyny z surowicą króliczą, a bardzo niałe lub ujemne z surowicami bydłecymi. Frakcja ta nie może być użyta do serologicznego rozpoznawania motylicy (odczyn wiązania dopełniacza). Obok serologicznie czynnej frakcji wielocukrowej występuje w tkankach pasożyta motylicy jeszcze dalszy, natury wielocukrowej, materiał serologicznie nieczynny.

Wyciąg alkoholowy pasożyta motylicy zawiera znaczne ilości antygeny Wassermanowskiego, który może być przyczyną nieswoistych odczynów rozpoznawczych.

Przeciwciała zwrócone przeciwko antygenom motylicznym wykazują gatunkowe różnice.

Chcąc ulepszyć wywoływanca dotychczas w Polsce stosowany (Trawiński, Sobiech, Szafiarski, Michalski) do rozpoznawania motylicy na zwierzęciu żywym, opierając się na wyżej podanych danych, zastosowano przygotowane frakcje wielocukrową i białkową do rozpoznawania tej choroby paszżytniczej u owiec.

Materiałem wyjściowym do przygotowania frakcji były pobrane z wątroby motylice, które po dokładnym przemyciu jałowym roztworem fizjologicznym NaCl, umieszczano w suszarce o ciepłocie $+42^{\circ}\text{C}$, na przeciąg kilku dni aż do zupełnego wysuszenia, poczym rozcierano w jałowym moździerzyku porcelanowym i zalewano w stosunku 1:50 jałowym fizjologicznym roztworem NaCl w jałowej kolbce, którą umieszczano w lodówce o ciepłocie $+4^{\circ}\text{C}$ na przeciąg kilku dni, wstrząsając kilkakrotnie w ciągu dnia. Następnie całość odwirowano i otrzymano płyn o zabarwieniu żółto-żłocistym i ciemno-brązowy osad, który użyto w dalszej pracy. Z płynem przeprowadzono frakcjonowane wytrącanie 96% alkoholem dla uzyskania frakcji wielocukrowej. Otrzymano gruboziarnisty szaro-biały osad, który po odwirowaniu i wysuszeniu stał się brunatnym ciałem bezpostaciowym, w ilości 12 do 14% materiału wyjściowego. Tak otrzymane ciało rozpuszczano w stosunku 1:100 w jałowym fizjologicznym roztworze NaCl. Frakcja ta w ten sposób uzyskana przedstawiała się jako brunatne ciało bezpostaciowe, rozpuszczalne we wodzie. Po całkowitej inwersji, próby Fehlinga i Nylander'a dały odczyn dodatni. Frakcja ta została określona jako wielocukrowa.

Osad z poprzedniej frakcji, zalewano płynem buforowym o $\text{pH} = 8,6$, umieszczano w chłodni o ciepłocie $+4^{\circ}\text{C}$ na przeciąg 48 godzin, wstrząsając w ciągu tego czasu kilkakrotnie, następnie całość odwirowano i otrzymany płyn zalano kwasem octowym lodowatym. Uzyskano drobnoziarnisty szaro-biały osad, który po odwirowaniu i wysuszeniu stał się jasno-brunatnym bezpostaciowym ciałem w ilości 1 do 4% materiału wyjściowego. Tak uzyskane ciało rozpuszczano w płynie buforowym o $\text{pH} = 8,6$ w stosunku 1:100.

Frakcja ta przedstawiała się jako ciało bezpostaciowe, jasnobrunatne, nierozpuszczalne w wodzie, zaś rozpuszczalne dosyć łatwo w słabych zasadach ($\text{pH} = 8,5$ do $9,0$). Reakcja biuretowa i reakcja wg Boedekera dały odczyn dodatni. Frakcja ta została określona jako białkowa.

Uzyskano dwie frakcje wielocukrową i białkową,

które po przesączeniu aż do uzyskania klarownego płynu, przechowywano w chłodni w ampułkach szklanych, po uprzednim umieszczeniu ich w kąpeli wodnej w ciepłocie $+55^{\circ}\text{C}$ przez 45 minut.

Kontrola bakteriologiczna i na zwierzętach doświadczalnych. Kontrolę bakteriologiczną wykonywano przez posianie tak przygotowanych wywoływaczy na pożywkach stałych i płynnych; brak wzrostu bakteryjnego decydował o zastosowaniu w terenie. Każdorazowo wyprodukowane wywoływacze zaszczepiano podskórnie myszkom białym celem stwierdzenia braku toksycznego działania.

Kontrola własności wywoływacza w terenie. Kontrolę własności wywoływacza w terenie wykonano przez wstrzykiwanie 0,2 ml. 1% jałowego roztworu peptonu w płynie fizjologicznym na ewentualne uczulenie badanych zwierząt na obce białko.

Przed wyjazdem w teren przeprowadzono kontrolę własności wywoływaczy na 9 zwierzętach rzeźnych (krowy) w rzeźni w Katowicach. Wywoływacze wstrzykiwano w ilości 0,2 ml. na sztukę w obie powieki dolne. Po 2 i pół godzinach odczytywano odczyn. Po zabiciu zwierząt wykonywano badanie poubojowe ze szczególnym uwzględnieniem wątroby. Wyniki przedstawiają się następująco:

L. p.	Zmiany anatomo-patologiczne	Wywoływacz	
		wielocukrowy	białkowy
w y n i k			
1.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	słabo dodatni	ujemny
2.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	dodatni	ujemny
3.	Bez zmian	ujemny	ujemny
4.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	dodatni	ujemny
5.	Bez zmian	ujemny	ujemny
6.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	dodatni	ujemny
7.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	słabo dodatni	ujemny
8.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	dodatni	ujemny
9.	Stare zmiany pomotylicze i żywe motylice w wątrobie	dodatni	ujemny

Wywoływacz wielocukrowy dał odczyn dodatni u 7 sztuk, a u 2 ujemny, co całkowicie pokrywało się z wynikiem sekcji, wywoływacz białkowy dał we wszystkich przypadkach wynik ujemny.

Z tak przygotowanymi wywoływaczami przystąpiono do dalszej pracy w terenie.

Celem konieczności zorganizowania walki z moty-

licą na terenie naszego kraju podajemy statystykę konfiskat wątrób owczych w rzeźni w Zakopanem w latach 1940 do 1949, obrazującą ogrom zniszczenia, wywołanego przez motylicę.

Rok	Ilość ubitych sztuk	Ilość skonfiskowanych wątrób	Procentowo
1940	815	554	63%
1941	1051	425	40%
1942	1605	654	40%
1945	481	215	45%
1944	415	217	52%
1947	596	154	34%
1948	1099	518	29%
1949	1599	458	29%
Razem	7559	2953	39%

Badania przeprowadzono w miesiącu listopadzie 1950 roku na terenie rzeźni w Zakopanem. Przebadano 93 sztuki owiec wywoływaczem frakcją wielocukrową i 21 sztuk wywoławczami-frakcjami wielocukrowymi i białkowymi. Te ostatnie badania przeprowadzono dlatego na tak małej ilości, ponieważ przygotowano tylko ograniczoną ilość frakcji białkowej jako wywoływacza. Wywoływacze wprowadzano



Odczyn dodatni

w ilości 0,15 ml. na sztukę w dolne powieki zwierząt. Odczyn śródskórno-powiekowy odczytywano po 1, 2, 2½ i 3 godzinach. Nasilenie odczynu określano jako silnie dodatni (+++), dodatni (++) słabo dodatni (+), wątpliwy (±) i ujemny (—). Po odczycie każda sztuka została poddana ubojowi, a po uboju dokładnemu badaniu poubojowemu ze szczególnym uwzględnieniem sekcji wątroby.

Przebieg odczynu śródskórno-powiekowego. W miejscu zastrzyku przy odczynie śródskórno-powiekowym powstaje po 20-tu minutach obrzęk zwolna powiększający się, osiągający szczytowe nasilenie w 4 godziny po iniekcji (wahania od 1 do 5 godzin), obejmując prawie całą powiekę dolną.

U pojedynczych zwierząt powstaje dosyć silny wyciek łzowy. Od 6-tej godziny następuje cofanie się odczynu, który po 7 do 12 godzinach znika zupełnie. Przy odczynie ujemnym powstaje lekkie zgrubienie powieki dolnej, które znika w przeciągu 2-ch godzin.

Dla ustalenia charakteru zmian chorobowych obserwowanych po zastrzykach wywoływaczy — frakcji wielocukrowej i białkowej pobrano do badań histo-



Odczyn dodatni

patologicznych 8 powiek (4 po zastrzyku frakcji wielocukrowej i 4 po białkowej). Wynik badania przedstawiał się następująco:

W preparatach histopatologicznych wykonanych na przekroju poprzecznym powiek po zadziałaniu wywoływacza wielocukrowego stwierdzono znaczny obrzęk wszystkich warstw skóry i tkanki podskórnej. W powierzchniowej warstwie błony śluzowej spojówki tuż pod nabłonkiem widoczne ogniska zapalne złożone z leukocytów specjalnych. Dokoła tych ognisk oraz w głębszych warstwach widoczne nacieki leukocytarne o licznie reprezentowanych leukocytach eozynoficznych. Na dużych terenach włókna kolagenowe są rozsunięte, między nimi w wytworzonych szczelinach znajduje się jednorodna masa (homogenna), zawierająca pojedyncze eozynofile oraz leukocyty specjalne. Na terenie mięśni i gruczołów łojowych brak nacieków. Pomiedzy komórkami nabłonka spojówki i na powierzchni tegoż nabłonka znajdują się liczne leukocyty specjalne oraz eozynofile. Leukocyty specjalne wykazują budowę jądrową w postaci dwóch, trzech płatów.

W preparatach histopatologicznych wykonanych również w przekroju poprzecznym powiek po zastosowaniu wywoływacza białkowego stwierdzono obrzęk znacznie słabszy niż przy zastosowaniu wywoływaczy wielocukrowych. Zmiany zapalno-naciekowe o podobnym obrazie, lecz o znacznie mniejszym nasileniu, oraz o mniejszej ilości eozynofiliów. W tkance łącznej

około pęczków mięśni znajdują się stazy naczyniowe, silnie zaznaczone.

Na przebadanych 93 owiec przy zastosowaniu wywoływacza frakcji wielocukrowej u 6 sztuk (nr nr 4, 23, 32, 52, 62, 76) badanie poubojowe w kierunku motylicy wypadło ujemnie. Z tych 6 sztuk u 2-ch (nr nr 52, 62) stwierdzono w wątrobie silne zakażenie motyliczką (*Dicrocoelium lanceolatum*) u 2-ch (nr nr 23, 32) robaczyęc płuc, u 1-go (nr 76) bąblowce, a u 1-go (nr 4)) nie znaleziono żadnych zmian. Odczyn alergiczny tych wszystkich sztuk wypadł ujemnie.

U 4-ch sztuk (nr nr 20, 26, 70, 77) odczyn był wątpliwy. Z tych u 3-ch sztuk stwierdzono tylko stare zmiany pomotyliczne, a u 1-go (nr 77) słabe zakażenie motylicą.

U pozostałych 83 sztuk twierdzono żywe pasożyty u 31, żywe pasożyty i zmiany pomotyliczne w wątrobie u 46, a tylko zmiany pomotyliczne u 6-ciu sztuk. We wszystkich wypadkach wynik próby alergicznej z frakcją wywoływaczem wielocukrowym potwierdził sekcje.

Stwierdzone zmiany anatomo-patolog.	Siła odczynu	Ilość sztuk	Procent
Żywe pasożyty 31	silnie dodatni (+++)	—	—
	dodatni (++)	19	61%
	słabo dodatni (+)	12	39%
Żywe pasożyty i zmiany pomotylicze 46	silnie dodatni (+++)	6	13%
	dodatni (++)	20	43,5%
	słabo dodatni (+++)	20	43,5%
Zmiany pomotylicze 6	silnie dodatni (+++)	1	16,5%
	dodatni (++)	2	33,5%
	słabo dodatni (+)	3	50%

Nasilenie odczynu (patrz tabela) jest zależnie nie od ilości pasożytów, ale od czasu trwania zakażenia; im dłuższy czas upłynął od chwili zakażenia, tym bardziej odczyn słabnie.

Na 21 sztuk owiec przebadanych frakcjami wywoływaczami wielocukrowymi (patrz tabela) i białkowymi, odczyn z frakcją wywoływaczem wielocukrowym potwierdził w zupełności badanie poubojowe, natomiast frakcja wywoływacz białkowy tylko w 26% dała wyniki zgodne, w 26% wątpliwe, a w 47% wyniki niezgodne.

Wnioski. Frakcja wielocukrowa, przygotowana z suszonego ciała pasożyta zastosowana jako wywoływacz do prób śródskórno-powiekowych przy rozpoznawaniu motylicy u owiec okazała się swoista. Frakcja ta nadaje się po dalszym opracowaniu na obszerniejszym materiale, jako wywoływacz do prób alergicznych. Frakcja białkowa okazała się tylko w części swoista i nie może w tej postaci być użyta do dalszych prób alergicznych w rozpoznawaniu motylicy u owiec. Dodatkowe zakażenia innymi pasożytami nie miały żadnego wpływu na przebieg reakcji

na żywym zwierzęciu. Natężenie odczynu jest zależne nie od ilości pasożytów, lecz od czasu trwania zakażenia; im dłuższy czas upłynął od chwili zakażenia, tym odczyn jest słabszy. Przeprowadzone próby chemiczne z wywoływaczem wykonanym wg metody Trawińskiego wykazały w nim zawartość tylko wielocukrów, reakcje na białko były ujemne. Frakcja wielocukrowa jest więc jednym z ciał biorących udział w odczynie alergicznym śródskórno powiekowym jako wywoływacz. Dalsze badania, celem potwierdzenia tego faktu są w toku.

Na zakończenie chcielibyśmy podziękować za pomoc w przygotowaniu frakcjonowanych wywoływaczy in gr E. Streich z P. Z. H. filia Katowice, kol. dr Kozłowskiemu z Akademii Med. w Rokitnicy za przygotowanie preparatów histopatologicznych oraz kol. dr W. Porawskiemu za umożliwienie przeprowadzenia prób alergicznych na terenie rzeźni w Zakopanem.

И. ШАФЛАРСКИ, Я. НАВРОЦКИ

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОЙ И БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ФАСЦИОЛЁЗА У ОВЕЦ.

Резюме

Авторами велись исследования антигена — полисахаридной фракции на 93 овцах и антигенов — полисахаридных и белковых фракций на 21 овцы. Животные были обрабатываны путем введения 0,15 мл. антигена на голову в нижнее веко. После оценки реакции животных убивалось проводя после этого тщательное послеубойное исследование со специальным учётом печени.

Пробег интрадермо — пальпебральной реакции производился идентично как в прежних исследованиях (Med. Wet. 10 — 1950).

Наши исследования указывают, что приготовленная с тела паразита полисахаридная фракция примененная как антиген обладает специфичностью. Она пригодна, после изучения на более широком материале, как антиген при аллергической диагностике. Белковая фракция оказывает только частичную специфичность, она не является пригодной в этой форме к дальнейшим аллергическим пробам для диагностирования фасциолёза овец. Интенсивность реакции не зависит от количества паразитов, но от продолжительности инфекции — чем больше времени с момента инфекции, тем более слабая реакция. Химическое исследование антигена приготовленного по методу Гиравинского указали наличие в ней только полисахаридов; пробы на белок были отрицательны. Как видно с наших исследований в аллергической интрапальпебральной пробе полисахариды являются одним из веществ имеющих участие в реакции.

Исследования по этому пути ведутся нами дальше.

J. SZAFIARSKI, J. NAWROCKI

THE APPLICATION OF THE POLYSACCHARIDE AND PROTEIN FRACTIONS FOR THE DIAGNOSIS OF DISTOMIASIS IN SHEEP

Summary

Using the polysaccharide provocative fraction 93 heads of sheep were examined and for 23 sheep the polysaccharide and protein fractions were used. The provocatives in doses 0.15 ml per an individual were administered to the sheep into the lower eyelid. After the interpretation of the result each of the sheep was slaughtered and subsequently meat inspection followed with particular attention paid to the liver. The course of the intradermo-palpebral test was identical with the course in previous examinations (Medycyna Weterynaryjna Nr. 10, 1950). The examinations proved, that the prepared from the dried body of the parasite polysaccharide fraction used as a provocative in the intradermo-palpebral test for the diagnosis of distomiasis in sheep is group specific. This fraction should be suitable, after further elaboration on an abundant material, as a provocative for allergic tests. The protein fraction appeared to be only partly specific and cannot in this form be used in further allergic tests for the diagnosis of distomiasis in sheep. The infection other parasites did not exert any influence on the course of the reaction on the live animal. The intensity of the reaction is not dependent on the number of parasites, but on the duration of infection—the longer the lapse of time of infection the less marked was the reaction. Chemical tests performed with the provocative, prepared according to Trawiński's method proved the presence of polysaccharides only; protein reactions remained negative. The polysaccharide fraction is then one of the agents taking part in the intradermo-palpebral allergic reaction. Further investigations to prove this are conducted.

Piśmiennictwo

1. Kozar Z.: Med. Wet. 1 — 1948.
2. Michalski T.: Zastosowanie próby alergicznej śródskórno-powiekowej w diagnostyce motylicy u bydła (przygotowane do druku).
3. Mikulaszek E.: Med. Dośw. i Społ. Tom. XXV, 5. — 1948.
4. Szafiariski J.: Med. Wet. 10 — 1950.