

JERZY WIŚNIEWSKI

Miana fałszywie dodatnie w aglutynacji, ich występowanie i interpretacja w diagnostyce brucelozy bydła

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Bydgoszczy
Kierownik: doc. dr JERZY WIŚNIEWSKI

Pojęciem miana nieswoistego (niespecyficznego) w aglutynacji określano dotychczas — nie ściśle — różnego typu reakcje fałszywie dodatnie. Reakcji tych nie można było odróżnić drogą normalnych rutynowych badań laboratoryjnych od pozytywnej aglutynacji wywołanej przez aglutyniny anty-Brucella. W badaniach masowych wyniki takie uchodziły uwadze.

W miarę jednak postępu w walce z brucelozą, po utworzeniu obór, a nawet całych rejonów wolnych od tej choroby — pojawiające się wśród takiego pogłowia wyniki dodatnie nieuzasadnione wywiadem wzbudzały podejrzenie, że mogą to być wyniki fałszywe. Te konflikty serologiczno-anamnestyczne stały się powodem większego zainteresowania się tego rodzaju błędnymi wynikami aglutynacji.

Dotychczas na ogół stosowane w piśmiennictwie określanie takich wyników jako nieswoiste jest w świetle obecnych ustaleń nauki nieprawidłowe. Dlatego należy używać określenia wynik lub miano fałszywie dodatnie. Ponadto określenie „dodatni” jest tu odpowiednikiem pojęcia „pozytywny”, w rozumieniu powstałej reakcji, tj. niezależnie od wysokości miana. Nie wiąże się to wobec tego z oceną wyniku, jaką stawia się w rozpoznaniu w uzależnieniu od wysokości miana.

Istnieją co najmniej dwie przyczyny powstawania mian fałszywie dodatnich w aglutynacji: przeciwciała naturalne i reakcje krzyżowe.

Przeciwciała naturalne mogą występować w normalnej surowicy. Cechują się aktywnością aglutynacyjną i powodują reakcje fałszywie dodatnie występujące raczej w niskich mianach, zwane także „mianem fizjologicznym”. Na temat genetyki tych przeciwciał wypowiadają się m. in. *Wilson i Miles* (cyt. wg 42). Przyjmuje się, że powstają niezależnie od środowiska. Zdaniem niektórych autorów (23, 36, 37, 38, 39) tego rodzaju przeciwciała wykrywane w surowicy bydłowej różnią się od przeciwciał odpornościowych anty-Brucella biofizycznie i biochemicznie. Między innymi ich cechą charakterystyczną jest większa wrażliwość na temperaturę.

Reakcje krzyżowe spowodowane są natomiast aglutynowaniem bruceli przez przeciwciała skierowane przeciw bakteriom antygenowo spokrewnionym z brucelami. Różnicy pomiędzy przeciwciałami anty-Brucella a przeciwciałami wzbudzonymi przez bakterie spokrewnione antygenowo zasadniczo nie ma. Inna jest tylko koncentracja, tj. miano, które

zazwyczaj jest niskie. Przyczyną powstawania przeciwciał aglutynujących brucele krzyżowo mogą być zakażenia różnego typu, zupełnie niezależne od brucelozy.

Aby zapobiec pomyłkom spowodowanym fałszywie dodatnimi mianami — zwykle niskimi — ustalono na drodze empirycznej, że w serodiagnostyce brucelozy miano aglutynacyjne odpowiadające dopiero 1/10 części aglutynin zawartych w międzynarodowej surowicy standardowej (100 j.m.) jest mianem diagnostycznie istotnym przy badaniu zwierząt nieszczepionych, lub przy nieznanym anamnezie (1, 58, 59). W Polsce wartość ta odpowiada mianu 50, przy czym wobec niestandardowego jeszcze antygeny jest to wartość zbliżona*. Komitet Ekspertów FAO d/s brucelozy zaleca, aby dla sztuk w wieku 30 miesięcy, lub starszych, o ile jest pewność anamnezy, że były za młodu szczepione — za miano diagnostycznie istotne przyjmować dopiero obecność 200 m.j. agl./ml surowicy, co w naszych warunkach odpowiada w przybliżeniu mianu 1:100. Szczegóły dotyczące formułowania miana w jednostkach międzynarodowych podano w innej publikacji (54). Zaleca się ponadto, aby wyniki wykazujące wartość o połowę niższą, a zatem miana 1:25 i 1:50 uznawać dla określonych wyżej dwóch grup zwierząt za miano wątpliwe (podejrzone). Komitet Ekspertów zastrzega się, że w tzw. oborach problemowych konieczne jest stosowanie surowszych kryteriów i użycie również innych odczynów (59). Jest to szczególnie ważne dla naszych warunków krajowych. Wobec zwiększonych wysiłków w kierunku zwalczania brucelozy w Polsce i nie zawsze jeszcze ścisłej anamnezy (co do szczepień), w większości przypadków służba wet. styka się z oborami, które można by nazwać „problemowymi”. W Polsce ze względu na specyfikę warunków chowu bydła w komentarzu serologicznym (52) przyjęto kryteria rozpoznawcze bez uwzględnienia czy zwierzęta są szczepione, czy nie, uznając że miano 1:25 jest wynikiem wątpliwym, a 1:50 wynikiem dodatnim.

Tak ustalone — zgodnie z zaleceniem Komitetu Ekspertów — miano rozpoznawcze obarczone są pomimo tego tą niedogodnością, że jednak w pewnych przypadkach uwzględniać mogą miana fałszywie dodatnie, gdy te — choć rzadko — osiągają wysoką wartość.

* Jak wynika z badań (55, 56) antygen dotychczas stosowany w Polsce daje wartości mian zbliżone z antygenem wystandaryzowanym, tak że bez większego błędu można przy tego rodzaju omówieniach przyjąć przeliczenie miana na m.j. agl.

Dla lekarza wet. bezpośrednio w terenie zwalczającego brucelozę zagadnienie mian fałszywych w aglutynacji pojawia się dopiero w końcowej fazie walki, a zwłaszcza gdy kontrola lekarsko weterynaryjna obejmuje pogłowie wolne od brucelozy. To zresztą najtrudniejsze z zadań, tj. utrzymanie bydła wolnego od brucelozy i nieszczepionego, a tylko zabezpieczonego podwyższonym poziomem higieny, lepszymi warunkami chowu i zaostrzoną kontrolą epizootologiczną, wymaga bardzo szczegółowego analizowania wyników badania serologicznego. W takich właśnie warunkach napotyka się niekiedy na wyniki aglutynacji, kolidujące z anamnezą i zachodzi konieczność stosowania odczynów uzupełniających dla wyświetlenia czy aglutynacja nie jest fałszywie dodatnia.

Do tego celu okazała się przydatna tzw. aglutynacja gorąca. Mianowicie, wśród cech wyróżniających aglutyniny odpornościowe od aglutynin naturalnych powodujących wynik fałszywie dodatni, największe znaczenie dla praktyki posiada większa ich wrażliwość na podwyższoną temperaturę. Należało zatem na drodze doświadczalnej przyjąć taką temperaturę przebiegu aglutynacji, aby przez jej podwyższenie zniszczyć aktywność przeciwciał naturalnych nie powodując równocześnie trwałego i całkowitego zniesienia właściwości aglutynacyjnych przeciwciał odpornościowych (17, 27). Okazało się, że wrażliwość termiczna aglutynin naturalnych leży pomiędzy temperaturą unieczynnającą dopełniacz a temperaturą unieczynnającą aglutyniny odpornościowe (15). Przyjęto zatem, że dla inaktywacji przeciwciał naturalnych można surowicę ogrzać nawet do 60—65° przez 30 minut. Z uwagi jednak na fakt, że jest to temperatura zbliżona do tej, w której (70°) następuje unieczynnienie aglutynin normalnych (odpornościowych), co mogłoby doprowadzić z kolei do wyników fałszywie ujemnych, wielu autorów przyjęło stosowanie temperatury 56° przez wiele godzin. Nawet i ta temperatura może upośledzić aglutynację, powodując wytwarzanie się zespołów globulinowo-albuminowych (6, 26), ale nie dotyczy to surowicy bydła, lecz surowicy człowieka i niektórych gatunków zwierząt. Zastrzeżenia co do stosowania temperatury +56° wnoszono również z tego powodu, że jak wykazano, można było wprawdzie uzyskiwać nawet wyższe miana pod wpływem tej temperatury, ale równocześnie tworzyła się strefa wstępna (prozone) zahamowania aglutynacji. Było to jednak tylko nieznaczne osłabienie reakcji, nie wpływające na ostateczną ocenę wyniku (24).

Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że w wielu krajach w ostatnich latach włączono dla bardziej wszechstronnej interpretacji aglutynacji (agl. 37°), dotychczas stosowanej, aglutynację przeprowadzaną w t. +56° (agl. 56°).

Odczyn przeprowadzany w wyższej temperaturze nazywany jest odczynem gorącym (Hitzetest, Heat-test); można nazwać go też aglutynacją gorącą. Należy przy tym zaznaczyć, że istnieją jednak dość duże różnice techniczne wykonania. Niektórzy autorzy ograniczają się tylko do podgrzania rozcieńczonej surowicy bez antygenu do 65° przez 18 minut (19), lub do 63° przez 30 minut (47). Większość autorów stosuje jednak — za *Westphalem* i *Dickelem* (46) — nastawienie całej aglutynacji w t. +56° na łaźni wodnej przez 16—22 godzin. *Kunter* (31) wykazał, że z równym skutkiem można najpierw dokonać inaktywizacji surowicy w t. 56° przez 30 minut, a później po dodaniu antygenu inkubować już normalnie, tj. w cieplarni o t. +37°.

Spostrzeżone w praktyce kolizje anamnestyczno-serologiczne skłoniły wielu autorów do badań zmierzających do wyjaśnienia, jak często mogą występować w aglutynacji reakcje fałszywie dodatnie. W badaniach doświadczalnych zajęto się zarówno reakcjami przebiegającymi wskutek aglutynacji krzyżowej, jak i wywołanymi przez aglutyniny ciepłochwiejne, tj. reakcjami znoszonymi przez ograniczenie surowicy. Badania te miały duże znaczenie dla epizootologii brucelozy, a ponadto wniosły dużo obserwacji bardzo wartościowych dla oceny przydatności aglutynacji gorącej.

Przez wiele lat utrzymywała się opinia, że reakcje krzyżowe nie posiadają większego znaczenia w zwalczaniu brucelozy, gdyż zwykle miana tego typu są niskie i poniżej mian stanowiących kryteria oceny. Z badań lat ostatnich wynika jednak, że niekiedy spotyka się w tych reakcjach również miana wysokie. *Rissling* (35) stwierdził w surowicach bydła wolnego od brucelozy zdolność zlepiania gronkowców, przecinkowców cholery i włoskowców różycy, przy czym miano sięgało niekiedy do 1 : 100. Niektórzy autorzy wykazali (9), że spośród badanych surowic zwierzęcych, surowica bydła aglutynowała największą ilość różnych gatunków bakterii, zastosowanych jako antygeny. Podobne spostrzeżenia co do *E. coli*, *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. suispestifer*, *S. dublin* — poczynił *Wirth* (48), który uzyskał reakcję krzyżową z surowicami bydłecy, pozytywnie reagującymi w aglutynacji z antygenem *Brucella*. *Hochstein-Mintzel* (25) w badaniu 600 surowic bydłecy przy zastosowaniu 7 różnych gatunków bakterii wykazał, że zdolność aglutynowania bruceli niezależna była od zdolności aglutynowania wymienionych antygenów. To znaczy miano anty-*Brucella* pozostawało niezmiennione po wysyceniu aglutynin skierowanych przeciw tym innym bakteriom. Do tego samego wniosku doszli i inni autorzy (10, 41). Gdy podobne badania wykonywano z surowicami bydłecy wykazującymi niskie miano aglutynacyjne (1 : 20+) wówczas okazało się, że w jednej trzeciej przypadków usunięto

też zdolność zlepienia bruceli (10). Badania takie wykonano także i u owiec (13). Z tych badań wynika, że gdy surowice wykazują niskie miano, spowodowane to jest często — w 1/3 przypadków — reakcjami krzyżowymi. Gdy miano anty-Brucella jest wysokie — zwykle nie jest fałszywie dodatnie.

Podobne badania wykonano z surowicami ludzi i stwierdzono, że fałszywie dodatnią aglutynację z antygenem *Brucella* można otrzymać w przypadkach tularemii, lub u szczepionych przeciw cholerze (14, 57).

Tego rodzaju badania mają wprawdzie znaczenie dla praktyki, ale nie dla diagnostyki rutynowej. Orientują jednak z jakimi antygenami należałoby wykonać odczyn wysycania w przypadku uzasadniającym potrzebę tak wyjątkowo szczegółowego badania. Opłacalność takiego badania może zaistnieć np. przy bardzo cennych zwierzętach importowanych.

Równie istotnych dla praktyki wiadomości dostarczają te publikacje, które informują o wysokości stwierdzanych mian fałszywie dodatnich. Załączone zestawienie ilustruje jakiej wysokości miana fałszywie dodatnie spowodowane oboma rodzajami przeciwciał rejestrowali poszczególni autorzy.

| Autor | Wysokość miana i natężenie reakcji |
|-------------------------|------------------------------------|
| Artemow (4) | 1:20 + |
| Klein i Langkamp (28) | 1:20 + |
| Kunter (31) | 1:20 + |
| Beinhauer (7) | 1:40 +++ |
| Willinger (49) | 1:40 +++ |
| Bakshi i Narain (5) | 1:80 + |
| Kötsche (30) | 1:80 + |
| Stryszak, Karnicki (43) | 1:80 + |
| Orłow (34) | 1:100+ |
| Wirth (48) | 1:200+ |

Jak widać miana te wkraczają w granice mian uznawanych w Polsce za miana diagnostyczne. Jeżeli dodamy ponadto, zgodnie z obserwacjami niektórych autorów (11, 12, 41, 43, 45), że miana zupełnie niskie (1:12,5, 1:20, 1:25) mogą występować przy zakażeniu, co zaobserwował również Kunter (31) w 9% przypadków w oborach zakażonych, to staje się zrozumiałe, że schematyczny podział i wyznaczenie granicy dla mian diagnostycznie istotnych nie jest możliwe. Dla dokonania właściwej interpretacji wyniku odczynu aglutynacyjnego są więc potrzebne zarówno wywiad epizootologiczny, jak i odczyn uzupełniające.

Odczyn uzupełniające aglutynację próbkową przeprowadzaną w t. +37°, która jest odczynem podstawowym, posiadają zasadnicze znaczenie dla praktyki terenowej, szczególnie przy zapobieganiu brucelozie. Spośród tych odczynów należy omówić tylko znaczenie agl. +56°, gdyż odczyn antyglobulinowy (OAG) był przedmiotem poprzednich naszych publikacji (52, 53), podobnie jak i odczyn wiązania

dopełniacza (29, 50), którego przydatność potwierdziło wielu autorów (3, 8, 16, 24, 30, 31, 32, 49). Aglutynacja gorąca nie była dotychczas tematem doniesień krajowych. Z tego względu postanowiono podać dostępne piśmiennictwo na ten temat, dla zorientowania, jak odczyn ten jest wykorzystywany w serodiagnostyce usługowej.

Zainteresowanie agl. 56° datuje się mniej więcej od czasu, kiedy zaczęto zwracać uwagę na utrudnienia w diagnostyce, spowodowane występowaniem błędnych wyników w aglutynacji (8, 21, 22). O tym jak często praktyk spotkać się może z wynikami fałszywie dodatnimi w aglutynacji świadczą m. in. dane Kötschego (30). Wykazał on występowanie mian fałszywie dodatnich sięgających nawet wartości 1:80 ± w 0,9% przypadków. Badania swoje oparł na bogatym materiale (87 000 surowic) z 10 powiatów NRD wolnych od brucelozy. Na podstawie uzyskanych wyników doszedł do wniosku, że zastosowanie oprócz agl. 37° także agl. 56° i odczynu wiązania dopełniacza, oraz odczynu Meinickego pozwala wyeliminować wyniki niepewne w agl. 37° w 90% przypadków*.

Również Lambert i Amerault (32) uważają, że koniecznym uzupełnieniem agl. 37° jest OWD i agl. 56°. Ta ostatnia — ich zdaniem — daje bardziej efektywne wyniki, niż OWD, w okresie do 60 dni po zakażeniu. Autorzy podkreślają, że wprawdzie w pierwszej fazie zakażenia wszystkie te 3 odczyny mają ograniczone znaczenie, jednakże istnieją przypadki (przy zakażeniu eksperymentalnym), gdy OWD i agl. 56° wcześniej dały wyniki pozytywne, niż agl. 37°. Zdaniem autorów, odczyny uzupełniające są szczególnie przydatne w przebiegu brucelozy bezobjawowej (bez poronień). Ważne jest stwierdzenie, że sama agl. 56° nie może być wyłącznym uzupełnieniem dla wyświetlania mian fałszywie dodatnich w agl. 37°. Potwierdzają to m. in. Klein i Langkamp (28). Wyczerpujące badania terenowe wykonał Andersen (3), w niektórych przypadkach powtarzając je wielokrotnie w ciągu roku. Doszedł on do wniosku, że za wynik pozytywny w agl. 37°, wywołany przez aglutyniny anty-Brucella można uznać tylko te przypadki, w których równocześnie nastawiona agl. 56° i OAG dadzą wyższe miana, a ponadto dodatni będzie wynik OWD. Przeciwnie, miana pozytywne w agl. 37° należy — zdaniem autora — uznać za fałszywie dodatnie, gdy równocześnie agl. 56° wykaże miano niższe lub ujemne, a w OAG i w OWD wynik będzie też ujemny.

Również i inni autorzy oceniali przydatność agl. 56° ((20) na podstawie obserwacji terenowych. Zwrócono uwagę, że odsetek prób dających miano wyższe w agl. 56°, niż w agl.

* Można by na tej podstawie wnioskować, że wyniki fałszywie dodatnie spowodowane reakcją krzyżową są rzadkie.

37° jest wyższy w przypadkach badania surowic zwierząt z obór zakażonych, niż w oborach szczepionych (19,31). Zmiana wysokości miana w porównaniu do agl. 37° spowodowana przez agl. 56° ma — zdaniem tych autorów — szczególnie znaczenie w oborach szczepionych, zmniejsza się bowiem ilość wyników wątpliwych i dodatnich.

Ważne są także informacje dotyczące zależności jaka zachodzi pomiędzy zwiększoną ilością wyników błędnych a czynnikami środowiska i porą roku. Dane takie mają duże znaczenie dla praktyki terenowej. Jak wynika z publikacji, opinie co do wpływu pory roku są podzielone. Jedni autorzy stwierdzają, że miana fałszywie dodatnie występują najczęściej w lecie (30,40), a najmniej ich wiosną (30) i w zimie (44). Zdaniem natomiast innych autorów najczęściej takich wyników należy spodziewać się zimą (10,18) lub wiosną (34). Miana fałszywie dodatnie występujące u danej sztuki, np. w lecie, zanikają całkowicie wiosną (30). Nasze badania nad przebiegiem reakcji serologicznych w oborze zakażonej brucelozą (cytowane w poz. 52) wskazywały, że na ogół u tych samych krów obserwowanych serologicznie w ciągu kilku lat uzyskuje się zwykle niższe miana w jesieni. Istnieją ponadto zdania, że na pojawienie się niskich lecz fałszywych mian może mieć wpływ zmiana okresu pogody (44), różne czynniki stressowe (23), a przede wszystkim zmiany w żywieniu (23,34).

Istotnym przyczynkiem do diagnostyki brucelozy są uwagi *Schimmela* i *Kötschego* (39) na temat niebezpiecznego lekceważenia niskich mian w agl. 37°, nawet leżących poniżej wartości mian diagnostycznie istotnych. Z badań tych autorów wynika, że niskie miana mogą być spowodowane zmniejszoną aktywnością tworzenia przeciwciał, o której wnioskowali z wyraźnie obniżonej zawartości białka całkowitego w surowicy krwi.

Hill (24) przekonał się eksperymentalnie, że agl. 56° wykazuje wyższe miano w stosunku do agl. 37° u sztuk zakażonych. U sztuk szczepionych jest natomiast odwrotnie. Podobne obserwacje poczynił też *Morse* i współpr. (33), dochodząc do przekonania, że w agl. 56° miano obniża się w stos. do agl. 37° u sztuk szczepionych w 76% przypadków. Badania zwierząt zakażonych wykazywały podwyższenie miana w równie wysokim odsetku.

Ten przegląd piśmiennictwa wskazuje, że istnieje jednolitość poglądów na temat potrzeby stosowania w serodiagnostyce brucelozy zespołu odczynów. Do nich zaliczyć można powolną próbówkową aglutynację normalną (w t. 37°), aglutynację gorącą (w t. 56°) i odczyn antyglobulinowy jako próby służące do wykazania aglutynin, oraz odczyn wiązania dopełniacza.

W oparciu o literaturę, w której i polskie prace zostały uwzględnione — *Hill* (24) opra-

cował komentarz interpretacyjny badania surowicy krów (1963). W Polsce komentarz ten nie jest w pełni przydatny, nie stosuje się bowiem u nas szybkiej aglutynacji płytowej, chociaż ją w swoim czasie zalecano (51). Za granicą stosuje się, i tak też *Hill* rozpoczyna swój schemat — przed aglutynacją próbówkową szybką, aglutynację na płycie. Jest to wstępne rozpoznanie orientacyjne, w którym odrzuca się wszystkie próby ujemne badając dalej tylko surowice reagujące pozytywnie. Ze schematu *Hilla* wynika, że w dalszym toku badania stosuje się agl. 37°, agl. 56°, OAG i OWD. Wyniki dodatnie w OAG i OWD niezależnie od wyniku agl. 37° przyjmuje się za przemawiające za zakażeniem lub reakcją po przebytych niedawno szczepieniu (przy znanej anamnezie). Miano agl. 37° podwyższone w agl. 56°, lub nie zmienione świadczy o zakażeniu, natomiast gdy jest niższe, przemawia za mianem fałszywie dodatnim lub reakcją poszczepienną.

Komentarz *Hilla* podano tu w formie jedynie orientacyjnej na dowód, jak zasadniczo wpływa na ocenę wyniku agl. 37°, odczyn antyglobulinowy i aglutynacja gorąca oraz odczyn wiązania dopełniacza. Pełnego schematu *Hilla* nie zamieszczono, gdyż pod względem technicznym nie jest on zgodny z dotychczas obowiązującymi w Polsce wytycznymi i posługiwanie się nim mogłoby osłabić jednolitość postępowania diagnostycznego, do którego dąży się u nas w kraju.

Zanim dane zaczerpnięte z literatury co do wartości aglutynacji gorącej posłużą w Polsce do oceny rutynowej wyników, należałoby doświadczalnie sprawdzić przydatność diagnostyczną tego odczynu w naszych warunkach krajowych, podobnie jak to już uczyniono poprzednio dla odczynu antyglobulinowego (53).

Na podstawie omówionych danych mogłaby nasunąć się wątpliwość, czy wobec zawodności agl. 37° i niestosowania dotychczas w diagnostyce rutynowej ani agl. 56°, ani OAG, rozpoznanie brucelozy w Polsce było właściwe. Odpowiedzieć na to można, opierając się na obowiązujących u nas przepisach i urzędowych wytycznych, że dotychczasowe postępowanie serodiagnostyczne było nie tylko właściwe, ale ponadto na podkreślenie zasługuje fakt, że właśnie w Polsce, jako jednym z pierwszych krajów w świecie, wprowadzono — i to od lat — jako obowiązujący odczyn wiązania dopełniacza, który jak wiadomo jest skutecznym uzupełnieniem aglutynacji. Do pionierskich inicjatyw zaliczyć można ponadto wprowadzenie w Polsce oryginalnego urzędowego komentarza do wyników serologicznych uzyskanych w aglutynacji i odczynie wiązania dopełniacza, co pozwoliło na rozróżnienie reakcji poszczepiennych od zakażenia.

Potrzeba zwiększenia ilości odczynów rozpoznawczych przez włączenie agl. 56° i OAG

będzie dalszym przejawem unowocześnienia metod diagnostycznych i zwiększeniem możliwości poznawczych, a jest podyktowana dopiero obecnie aktualizującą się w Polsce sy-

tuacją na odcinku walki z brucelozą, tj. bliską perspektywą likwidacji tej choroby.

Piśmiennictwo, obejmujące 59 pozycji u autora.

Adres autora: doc. dr Jerzy Wiśniowski, Bydgoszcz.

ANTONI TEKLIŃSKI

Wpływ liofilizacji na wartość antygenową szczepionki S-19

Zakład Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych Instytutu Weterynarii w Warszawie
Kierownik: dr A. TEKLIŃSKI

Ponad 20 lat stosowana jest przemysłowo metoda liofilizacji szczepionek bakteryjnych bądź wirusowych. W ten też sposób przygotowana jest żywa szczepionka przeciw brucelozie krów S-19.

Warunkiem skuteczności tej szczepionki jest odpowiednia koncentracja żywych i antygenowo pełnowartościowych drobnoustrojów. Jak wiadomo, nie zawsze żywotność drobnoustroju świadczy o jego niezmienionej budowie, a tu również o jego wartości antygenowej. Zamrażanie, które jest procesem wstępnym liofilizacji powoduje gwałtowną zmianę struktury fizycznej drobnoustroju. Zależnie od szybkości i temperatury zamrożenia następuje drobno, bądź grubo-kryształkowa krystalizacja wody wchodzącej w skład komórki bakteryjnej. Jest to jednym z powodów mechanicznych uszkodzeń bakterii, często zaś nawet ich śmierci.

Proces odwrotny, wprowadzenia wody do wysuszonego ciała bakteryjnego, jest również niebezpiecznym momentem mającym wpływ na żywotność i właściwości drobnoustroju.

Własności antygenowe komórki bakteryjnej są determinowane przez elementy proteinowe, lipidowe, nukleoproteiny i wielocukry. W procesie liofilizacji, drogą sublimacji, z zamrożonej substancji zostaje odebrana woda. Tym samym następuje gwałtowna zmiana koncentracji soli mineralnych i substancji organicznych składowych ciała bakteryjnego. Zachodzące w tym układzie zmiany fizyko-chemiczne mogą powodować odchylenie we własnościach antygenowych liofilizowanego drobnoustroju.

W pracach dotyczących wpływu niskich temperatur, bądź też liofilizacji na drobnoustroje, zajmowano się głównie ich przeżywalnością, a więc zmianami ilościowymi, a nie jakościowymi.

Nie były dotychczas publikowane prace nad genetyczną opornością bakterii na działanie zamrażania i odtajania, uwzględniające np. zmiany zachodzące w RNA i DNA.

Próby otrzymania trwałych mutantów *Pasteurella multocida* o zmniejszonej, bądź nawet zniesionej zjadliwości, drogą powtarzanych zamrażeń do temp. — 192°, prowadzili bezskutecznie *Andrzejewski* i *Tekliński* (2).

Sprawą niewrażliwości *Escherichia coli* i *Pseudomonas* na działanie zamrażania w temp.

— 196° zajął się *Ashwood-Smith* (3) wykazując, że przeżywalność tych drobnoustrojów, jak również ich wrażliwość na antybiotyki i sulfonamidy pozostała bez zmian w ciągu 18 pasażi.

Znane są prace oceniające wartość immunologiczną liofilizowanej szczepionki S-19, jednak nie jest mi znana praca, której celem byłaby porównawcza ocena wartości antygenowej szczepionki liofilizacyjnej w stosunku do bezkonfliktowo przygotowanej szczepionki płynnej.

Zadaniem niniejszej pracy było wykazanie przy pomocy serologicznych odczynów: zlepnego (aglutynacji) i litycznego (wiązania dopełniacza) ewentualnych różnic między wartościami antygenowymi płynnych i liofilizowanych szczepionek S-19.

Różnice te próbowano stwierdzić na podstawie określenia poziomu wytworzonych przeciwciał swoistych u bydła poddanego działaniu tych bodźców.

Podstawę do oceny stanowiła przeprowadzona porównawczo analiza statystyczna.

Van der Schaaf i *Jaartsveld* (17) przy ocenie porównawczej wartości uodparniającej szczepionki S-19 i L posłużyli się także interpretacją odczynów aglutynacji i wiązania dopełniacza u zwierząt szczepionych. *Seelemann* zaś i *Börger* (20) porównali w tenże sposób szczepionkę adsorbowaną zabita i żywą S-19 wykazując przewagę tej ostatniej.

Wyniki pracy mogą posłużyć do ew. wyjaśnienia niektórych poglądów związanych z brucelozą oraz mogą mieć znaczenie dla ew. skontrolowania stosowanych metod kompleksowego zwalczania brucelozy i ustosunkowania się do otrzymywanych po szczepieniu reakcji serologicznych.

Materiały i metody

Dla doświadczalnych szczepień S-19 wytypowano 24 obory Państwowych Gospodarstw Rolnych na terenie 3 województw: olsztyńskiego, warszawskiego i wrocławskiego. Badania serologiczne były wykonywane w odpowiednich terenowo Wojewódzkich Zakładach Higieny Weterynaryjnej. We wszystkich oborach znajdowało się bydło nizinne czarno-białe, w kondycji hodowlanej naogół dobrej. Stan zdrowotny bydła był rozmaity: w niektórych gospodarstwach występowały ronioenia na tle brucelozy, w kilku znajdowały się krowy gruźlicze, a inne były wręcz izolatorami gruź-