

Piśmiennictwo

1. Bartha A.: Magy. Allatorv. Lap. 16, 42, 1961.
2. Bodon L., Mészáros i wsp.: Acta Vet. Acad. Sci. Hun. 18, 107, 1968.
3. Bran L., Suhaci I., Ursache R.: Luc. Inst. de Cert. Vet. Pasteur, 4, 3, 1965.
4. Janowski H., Janowska I., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 21, 158, 1965.
5. Janowski H., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 23, 721, 1967.
6. Skoda R. i wsp.: Acta virol. 8, 1, 1964.
7. Skoda R. i wsp.: Acta virol. 8, 123, 1964.
8. Skulmowska-Kryszkowska D., Janowska I., Wijaszka T.: Bull. Inst. Wet. Puławy 12, 45, 1968.
9. Toneva V.: Vet. Med. Nauki, Sofia, 1, 35, 1964.
10. Wijaszka T.: Biul. IV Zjazdu PTNW, Warszawa, 1970.
11. Zuffa A.: Mh. Vet. Med. 19, 801, 1964.
12. Zuffa A., Gricelova K.: Arch. exp. Vet. Med. 20, 127, 1966.

Obecny adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Olsztyn—Kortowo, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych.

ZYGMUNT CYGAN

Zagadnienie antygenów „nierozpuszczalnych” w identyfikacji *Cl. botulinum*

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR
w Lublinie
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie
Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Diagnostyka laseczek *Cl. botulinum* jest zagadnieniem trudnym, złożonym i definitywnie jeszcze nie rozwiązany. Podstawowa metoda identyfikacyjna polega na analizie tzw. „antygenów rozpuszczalnych”, tj. toksyn, przy pomocy seroneutralizacji. Ma ona kolosalne znaczenie praktyczne, niemniej jednak z naukowego punktu widzenia, musi budzić pewne zastrzeżenie, gdyż nie może być użyta w stosunku do wszystkich szczepów, które nie produkują lub zatraciły zdolność wytwarzania toksyny. Toksynogenność szczepów jest procesem dynamicznie zmiennym, często całkowicie zanikającym i dlatego nie nadaje się w pełni, jako podstawa szeroko pomyślanej identyfikacji laseczek *Cl. botulinum*, zwłaszcza typu C, u którego zanik toksynotwórczości występuje szczególnie często. Wykorzystanie właściwości morfologicznych, hodowlanych i biochemicznych, aczkolwiek pomocne, jednak nie daje również dostatecznie pewnych podstaw diagnostycznych ze względu na niestałość powyższych cech. Jednym z głównych testów biochemicznego różnicowania nietoksynotwórczych szczepów *Cl. botulinum*, od podobnych do nich szczepów *Cl. sporogenes*, ma być odczyn na skatol. Jednak jak to wynika z własnych obserwacji, metoda ta zawodzi nawet w tym wąskim zakresie, gdyż wypada ujemnie z wieloma szczepami uznanymi za *Cl. sporogenes*. W związku z powyższym należy sądzić, że przebadanie antygenów „nierozpuszczalnych” — komórkowych jest jak najbardziej aktualne, gdyż stwarza nowe możliwości, dotychczas niewykorzystane.

Dotychczasowe badania nad antygenami komórkowymi laseczek *Clostridium* doprowadziły do ustalenia ich pewnej praktycznej przydatności dla różnicowania nietoksynotwórczych szczepów *Cl. botulinum* od *Cl. sporogenes* (49, 53), *Cl. sordelli* od *Cl. bifementans* (32, 33, 34), *Cl. feseri* od *Cl. septicum* (1, 45), jak również przy identyfikacji szczepów *Cl. oedematiens* (2), typów *Cl. tetani* (23, 25) i szczepów zatruc pokarmowych *Cl. perfringens* A (11).

Prace nad serologicznym usystematyzowaniem ziarniaków rodzaju *Streptococcus* (18), oraz pałeczek *Salmonella* (16) i *Escherichia* (15) wywarły wyraźny wpływ na tok badań nad antygenami komórkowymi laseczek beztlenowych. Badania takie podjęli w latach 1951—1955 Mandia i Bruner (20) oraz Mandia (21, 22, 23, 24), a następnie Moussa (45). Osiągnięte wyniki umożliwiły ułożenie schematu antygenów laseczek *Clostridium* analogicznego w swych głównych założeniach do schematu dla pałeczek *Salmonella*. U proteolitycznych beztlenowców *Clostridium* sp. wyróżniono antygeny somatyczne ciepłostale „O” i ciepłochwienne „L” stanowiące podstawę zaliczenia szczepu do gatunku oraz antygeny rzęskowe „H” określające typy aglutynacyjne. Zaproponowany schemat objął między innymi również proteolityczne szczepy *Cl. botulinum* A i B. Szczepy te wykazywały pokrewieństwa antygenowe ze szczepami *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum* i *Cl. tetani* (23). Zastosowane w następnych latach w naszym laboratorium odczyny Ouchterlony’ego (4) i immunofluorescencji (13) częściowo potwierdziły obecność tych międzygatunkowych powiązań. Pokrewieństwa antygenowe zaobserwowano pomiędzy *Cl. botulinum* C i D, a *Cl. oedematiens* A, B i D oraz pomiędzy *Cl. botulinum* A i B, a *Cl. sporogenes*. Niewykazanie reakcji międzygatunkowej *Cl. botulinum* z laseczkami innych proteolitycznych gatunków *Clostridium*, mogło wynikać z użycia przez autorów surowic pko antygenom ogrzewanym, u których ograniczenie ilości antygenów podejrzewali Walker i Batty (59). Badania Walkera i Batty (59), Cygana i Jastrzębskiego (4) oraz Jastrzębskiego i Cygana (13) pozwoliły na serologiczny podział szczepów *Cl. botulinum* na 3 serotypy: 1) obejmujący proteolityczne szczepy typów toksycznych A, B i F; 2) sacharolityczne typy C i D; 3) sacharolityczny typ E. Jednocześnie stwierdzono dość znaczne zróżnicowanie szczepów w obrębie poszczególnych serotypów wskazujące na obecność ras serologicznych. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze wyniki

innych autorów (8, 9, 49). Niejednolita defektywność antygenowa szczepów w obrębie poszczególnych serotypów ogranicza praktyczną użyteczność metod serologicznych, gdyż nie pozwala na użycie tylko jednej monotypowej surowicy dla uchwycenia wszystkich szczepów danego serotypu. W związku z tym przy produkcji surowic do serotypizacji zachodzi konieczność doboru szczepów o jak najbogatszej strukturze antygenowej.

Nowe możliwości dla prac taksonomiczno-identyfikacyjnych wyłoniły się z chwilą objęcia badaniami antygenów zarodnikowych (27, 28, 29, 51). Pierwsza praca nad właściwościami serologicznymi zarodników bakterii tlenowych pojawiła się już prawie 70 lat temu (5). Jednak musiało minąć ok. 40 lat zanim zajęto się zarodnikami beztlenowców (12). Już pierwsze prace ustaliły, że zarodniki rodziny *Bacillaceae* posiadają właściwości antygenowe i że antygeny zarodników są odmiennie od antygenów komórek, w których powstały. Późniejsze badania potwierdziły powyższe spostrzeżenia wykazując jednocześnie w zarodnikach również antygeny wegetatywne „O” i „H” (28, 29, 31).

W badaniu zarodników beztlenowców szczególnie duże zasługi mają badacze polscy związani ze szkołą Meisla. Meisel i wsp. (27) opracowali własną, oryginalną metodę enzymatycznej preparatyki zarodników, którą z kolei zastosowali w badaniu szczepów różnych patogennych gatunków *Clostridium*. Wg referatów Meisla (30, 33) wygłoszonych na sympozjach międzynarodowych, można, biorąc za podstawę antygeny zarodnikowe, stwierdzić u *Cl. botulinum* 6 różnych serotypów, odpowiadających analogicznym typom toksycznym. Jednak, jak wynika z referatów, badania te były wykonane jedynie w oparciu o odczyn aglutynacyjny i obejmowały niewielką ilość szczepów poszczególnych typów. Wiąże się to oczywiście z trudnościami technicznymi preparatyki zarodników i jak się wydaje ze znalezieniem szczepów obficie zarodnikujących. Na uwagę zasługuje wykazanie pokrewieństwa pomiędzy zarodnikami szczepów *Cl. botulinum* B i F oraz C i D. Powyższe pokrewieństwa były jednak niewielkie, co umożliwiło zróżnicowanie badanych szczepów za pomocą surowic adsorbowanych. Analogiczne powiązania wykazali Cygan i Jastrzębski (4) badając antygeny komórkowe, jednak reakcje międzytypowe były w tym przypadku tak silne, że uniemożliwiały odróżnienie poszczególnych typów toksycznych. Odmienny wynik osiągnięty przez tych autorów może wiązać się z mniejszą swoistością antygenów komórkowych od zarodnikowych, lub z zastosowaniem odmiennych techniki badania oraz z użyciem innych szczepów.

Reasumując, należy stwierdzić, że badanie antygenów „nierozpuszczalnych” laseczek *Cl. botulinum* może w niektórych przypadkach mieć istotne, a nawet decydujące znaczenie dla

ich identyfikacji gatunkowej, a nawet typowej. Zagadnienie to jest dotychczas poznane niedostatecznie, często fragmentarycznie i to jedynie od strony immunologicznej. Natomiast struktura chemiczna antygenów „nierozpuszczalnych” *Cl. botulinum* jest prawie zupełnie nierozpracowana. Jedyne dotychczas dwie prace na ten temat, dotyczą struktury wyłącznie ściany komórkowej i to tylko u typów A i D *Cl. botulinum* (55, 57). Komórka bakteryjna zawiera szereg antygenów mających pod względem chemicznym charakter białek, wielocukrów i lipidów.

Ogólnie przyjmuje się, że swoistość antygenową zarazków określają przede wszystkim komponenty wielocukrowe. Istnieją pewne obserwacje wskazujące, że i u *Cl. botulinum* wielocukry mogą być głównymi nośnikami swoistości immunologicznej. Za możliwością taką przemawiałyby wyniki badań własnych prowadzonych z użyciem surowic pko antygenom ogrzewanym (4, 13). Na znaczenie wielocukrów u różnych gatunków *Clostridium* zwracają uwagę m. in. Sordelli (52), Jimenez (14), Meisel (26), Svec i McCoy (54), Tardieux i Nisman (56), Meisel — Mikołajczyk (35—43), a ostatnio i Novotny (46). Novotny wykazał np. różnice w składzie jakościowym cukrów ściany komórkowej *Cl. bifementans* i *Cl. sordelli*, uzyskując w ten sposób dodatkowy dowód przemawiający za tezą o odrębności gatunkowej tych drobnoustrojów.

Na podkreślenie zasługuje, że często wielocukrowce o identycznym składzie jakościowym, a nawet ilościowym mogą mieć zupełnie odmienną swoistość. W dalszych więc badaniach zaczęto uwzględniać sekwencję prostych składników, typy wiązań, izomerię oraz obecność dodatkowych grup chemicznych. Wykazano, że swoistość antygenów wielocukrowych wiąże się z określonymi fragmentami cząsteczki wielocukrowca — z chemicznymi determinantami swoistości, wśród których zasadniczą rolę odgrywają cukry immunodominujące (19). Mogą być one wykrywane metodami swoistej inhibicji odczynów serologicznych w opracowaniu ilościowym, w układach homologicznych i heterologicznych (10, 44, 58). Badań takich w odniesieniu do *Cl. botulinum* dotychczas nie przeprowadzono.

Składniki białkowe bakterii w przeciwieństwie do wielocukrów, mają być nośnikami swoistości serologicznej o wiele rzadziej (61). Ich swoistość biologiczną determinuje sekwencja aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Jednak dane o właściwościach białek bakteryjnych w stanie niezmiennym są bardzo skąpe. Białka wyodrębnione z komórek bakterii są już sztucznym produktem. Postęp w tej dziedzinie uzależniony jest od opracowania nowych metod izolacji białek w stanie niezmiennym.

W ostatnim dziesięcioleciu wyłoniła się możliwość wykorzystania w taksonomii bakterii budowy DNA. Wydaje się jednak, że przydatność takich badań należy wiązać przede wszystkim z określeniem stopnia mikrohomologii molekularnej kwasów nukleinowych tj. podobieństwa sekwencji zasad w łańcuchu DNA, co można zbadać metodą hybrydyzacji (3, 6, 7, 50). Metoda ta dotychczas była stosowana jedynie w badaniu tlenowców np. *Pasteurella* (48), *Mycoplasma* (47), *Neisseria* (17) i *Streptococcus* (60) z bardzo obiecującymi wynikami. Niestety przeprowadzenie takich badań w warunkach krajowych jest na razie niemożliwe z uwagi na trudności aparaturowe. Natomiast technicznie wykonalne w naszych warunkach określanie procentowe zasad w DNA, posiada ograniczone znaczenie, gdyż wartości stosunku A+T/G+C wahają się w zbyt wąskich granicach i dlatego w wielu przypadkach wypadają jednakowo u zupełnie odrębnych gatunków bakteryjnych. Wykorzystanie procesów konjugacji, transformacji i trans-

dukcji do badania stopnia homologii kwasów nukleinowych bakterii ograniczone jest, co do zasięgu, do nielicznych tylko grup drobnoustrojów, u których zjawiska stwierdzono.

Użyteczność bakteriofagów dla identyfikacji i taksonomii laseczek *Cl. botulinum* rokuje duże możliwości. Jednak zagadnienie to jest bardzo mało zbadane.

Należy mieć nadzieję, że dalszy postęp w zakresie badań kwasów nukleinowych i badań cytochemicznych pozwoli na usystematyzowanie drobnoustrojów na naturalnych podstawach genetycznych pokrewieństw, co do niedawna wydawało się zupełnie niemożliwe.

Prace własne mające na celu immunochemiczne przebadanie zagadnienia antygenów „nierozpuszczalnych” laseczek *Cl. botulinum* ze specjalnym uwzględnieniem wielocukrów zostaną przedstawione w następujących publikacjach.

Piśmiennictwo, obejmujące 61 pozycji, u autora.

Adres autora: dr Zygmunt Cygan, Lublin, ul. Słowicza 8 m. 7.

KAZIMIERZ ŁOSIECZKA

Wartość diagnostyczna dożylniej tuberkulinizacji u bydła

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynarii WSR we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr T. SOBIECH

Już z badań Kocha znane są pirogenne własności tuberkuliny. Po podaniu tuberkuliny w organizmie uczulonym powstają pirogeny, wywołujące odczyn termiczny. Zwyżka temperatury nie pojawia się u odczulonych zwierząt. Pirogenne własności tuberkuliny były wykorzystane w diagnostyce gruźlicy bydła w próbie podskórnej. Metoda ta z uwagi na konieczność częstego powtarzania pomiarów ciepłoty ciała została zaniechana w praktyce. Ogólny odczyn u zakażonego gruźlicą bydła można również wywołać przez dożylnie podanie tuberkuliny. Zwyżka temperatury w tym przypadku występuje wcześniej, już po 3—4 godzinach od iniekcji. W jakim stopniu produkowana u nas tuberkulina może być przydatna w próbie dożylniej starano się wyjaśnić w toku następujących doświadczeń.

Badania wykonano za pomocą tuberkuliny PPD ssaków seria 61159 Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego na 23 krowach z dwu izolatorów gruźliczych, rasy ncb, w wieku 3—10 lat, dobrej kondycji.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzono w izolatorze Z; w dwa miesiące po ostatniej śródskórnej tuberkulinizacji 12 dodatnim reagentom podano dożylnie po 1 ml tuberkuliny (50 000 j.t.). Przed iniekcją zwierzęta zbadano klinicznie, odnotowując tętno, oddech i ciepłotę wewnętrzną ciała. Termometry przed użyciem sprawdzono przez zanurzenie w podgrzanej wodzie i te, które wykazywały odchylenia powyżej $\pm 0,1^\circ$ odrzucono. Ciepłota wewnętrzną ciała zwierząt wahała się w granicach $38,2$ — $38,8^\circ$. Tuberkulinę wstrzyknięto około godziny 8, a kontrolne badania kliniczne

z termometrowaniem dokonano w godzinach 10, 12, 14 i 16. W czasie 6—8 godzin od iniekcji tuberkuliny u 3 zwierząt ciepłota wewnętrzna ciała podniosła się powyżej 40° ($40,3$; $40,9$ i $40,5^\circ$). Przyrost temperatury wynosił u tych zwierząt 2 — $2,4^\circ$ i utrzymywał się przez 2 godziny, u reszty zwierząt zwyżki temperatury nie przekraczały 1°C . Innych odchyłań od normy nie zauważono. Przyjęta w doświadczeniu dawka 1 ml tuberkuliny okazała się niewystarczająca i wywołała odczyn termiczny zaledwie u 25% zwierząt uznanych za zakażone gruźlicą.

Dalsze badania przeprowadzono na 11 dodatknych reagentach w izolatorze M, zwiększając dawkę tuberkuliny do 2,5 ml (125 000 j.t.). Metodyka badań podobna jak w doświadczeniu pierwszym. Temperatura ciała przed iniekcją mieściła się w przedziale $38,2$ — $39,5^\circ\text{C}$. Od godziny 8 do 18 zwierzęta pozostawały pod stałą kontrolą lekarską. Grupę kontrolną stanowiły 4 krowy.

Wyniki zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki dożylniej tuberkulinizacji w dawkach 2,5 ml tuberkuliny

Lp	Godziny - ciepł. wewn. ciała w $^\circ\text{C}$						Maks. przyrost temperatury		odcz. organ.
	8	10	12	14	16	18	$^\circ\text{C}$	godz. po iniekcji	
1	38,3	38,5	38,9	38,2	38,0	38,8	0,6	4	+
2	38,5	39,0	38,9	38,4	38,6	38,2	0,4	4	-
3	38,9	39,1	39,0	38,2	38,3	39,3	0,4	10	-
4	38,5	39,0	39,1	38,7	38,9	40,2	1,7	10	-
5	38,2	39,0	38,5	38,0	38,0	37,5	0,8	2	-
6	39,5	40,3	41,4	41,0	40,5	40,5	1,9	4	+
7	38,4	38,8	38,9	38,4	39,0	39,4	1,0	10	+
8	38,7	39,1	38,0	38,0	39,1	38,9	0,4	2	+
9	38,7	38,7	38,7	38,0	38,0	38,2	-	0	-
10	38,3	38,0	38,9	39,0	38,8	39,8	1,5	10	-
11	39,0	38,5	39,2	39,8	40,5	39,7	1,5	8	-
12	38,9	38,5	38,9	38,2	38,8	39,5	0,6		
13	38,5	38,6	38,5	38,9	38,5	38,3	0,4		
14	38,7	38,5	38,9	38,9	38,0	37,8	0,2		
15	39,2	39,1	39,5	39,4	39,2	38,4	0,3		