

ZDZISŁAW GLIŃSKI

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Streptococcus pluton*. IV. Struktura antygenowa *Str. pluton*

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr S. WOŁOSZYN

Określenie struktury antygenowej wzbogaca w sposób istotny wiedzę o właściwościach drobnoustrojów, stanowi uzupełnienie właściwości morfologicznych i biologicznych. W przypadku paciorkowców znajomość budowy antygenowej umożliwia zaliczenie ich do odpowiedniej grupy i typu serologicznego (22), oraz zróżnicowanie serologiczne w obrębie danego gatunku. Znajomość struktury antygenowej jest również pomocna w ustalaniu związków pomiędzy budową antygenową i działaniem chorobotwórczym, ponieważ szereg antygenów o charakterze enzymów wywiera niewątpliwie wpływ na przebieg zakażeń paciorkowcowych. Ponadto istnieje ścisły związek pomiędzy przynależnością paciorkowców do odpowiedniej grupy i typu serologicznego oraz ich chorobotwórczością dla człowieka i zwierząt (28). Znajomość budowy antygenowej posiada istotne znaczenie szczególnie w przypadku tych gatunków paciorkowców z grupy D, które nie posiadają uważanych dotychczas za typowe wszystkich cech fizjologicznych i biochemicznych (10, 36) na podstawie których można by je zaliczyć do jednego z czterech gatunków wg Deibel (9), lub do jednej z trzech podgrup wg Shattock (37) w modyfikacji Pleceaś (33). Dotyczy to szczególnie szczepów świeżo izolowanych z różnych źródeł o niestabilnych cechach oraz większości paciorkowców izolowanych od owadów (6, 7, 10, 15, 20, 34). W tych przypadkach klasyfikacja serologiczna odgrywa rolę pierwszorzędą, ponieważ struktura antygenowa zmienia się w mniejszym stopniu niż większość cech fizjologicznych (19, 32).

Właściwości seroantygenowe *Str. pluton* badali Gubler (16), Bailey (1, 2) oraz Bailey i Gibbs (3). Gubler (16) nie stwierdzał pokrewieństwa antygenowego pomiędzy *Str. faecalis* i ziarniakami izolowanymi z przewodu pokarmowego czerwiu pszczoły chorego na kiślicę. Uzyskane przez niego wyniki nie przedstawiają jednakże większej wartości, ponieważ w badaniach serologicznych autor ten stosował jedynie zawiesinę drobnoustrojów wypełniających jelito środkowe chorego czerwiu, przy czym nie przeprowadzono dokładnej identyfikacji tych drobnoustrojów.

Badania Bailey'a (1, 2) i Bailey'a i Gibbsa (3) wykazały, że szczepy *Str. pluton* niezależnie od miejsca ich izolacji (Argentyna, USA, Zambia i Wielka Brytania) stanowią pod względem se-

rologicznym jednolitą grupę i nie posiadają wspólnych komponent antygenowych ze szczepami *Str. faecalis* wyosobnionymi z czerwiu chorego na kiślicę. Badania Bailey'a ogłoszone w 1968 r. (2) potwierdziły obecność wspólnych antygenów powierzchniowych w szczepach *Str. pluton* izolowanych z czerwiu w różnych krajach.

W związku z brakiem w dostępnym piśmiennictwie wyczerpujących badań nad strukturą antygenową *Str. pluton*, jego przynależnością do odpowiedniej grupy serologicznej i zróżnicowaniem na typy serologiczne w obrębie gatunku postanowiono:

1. przebadac strukturę antygenową szczepów *Str. pluton* izolowanych na terenie Polski z chorego na kiślicę czerwiu i szczepów wzorcowych przy użyciu określonych serologicznie frakcji antygenowych tego drobnoustroju.

2. oznaczyć przynależność *Str. pluton* do określonej grupy serologicznej i wykazać, które z serologicznie aktywnych frakcji *Str. pluton* występują również w szczepach *Str. faecalis*.

Materiał i metody

Badania zasadnicze wykonano z 4 szczepami *Str. pluton* wyosobnionymi z chorego na kiślicę czerwiu na terenie kraju (szczepy 1, 10, 18 i 22) i 3 szczepami wzorcowymi *Str. pluton* (szczepy M, S, Z). Do badań porównawczych włączono 36 szczepów krajowych *Str. pluton*, 5 szczepów *Str. faecalis* (896, I, M, S, Z), *Str. bovis* 503, *Str. pyogenes* 465 (gr. A), 466 (gr. B), 467 (gr. C), 918 (gr. E), 470 (gr. F), 471 (gr. G), 919 (gr. K), 920 (gr. L), 475 (gr. M) i 477 (gr. O). Szczepy *Str. pluton* i *Str. faecalis* I, M, S, Z pochodziły z chorego na kiślicę czerwiu. Źródło pochodzenia szczepów podano w tab. 1. Drobnoustroje przechowywano w stanie zliofilizowanym. Masę bakteryjną uzyskano przez namnożenie *Str. pluton* na podłożu płynnym A (13) inkubowanym w temp. 35°C w atmosferze 90% wodoru i 10% dwutlenku węgla przez 4 doby. *Str. faecalis*, *Str. bovis* i *Str. pyogenes* namnożono na bulionie Todd-

Tab. 1 Źródło pochodzenia szczepów *Str. pluton*, *Str. faecalis*, *Str. bovis* i *Str. pyogenes*

Szczepy	Źródło pochodzenia
<i>Str. pluton</i>	Instytut Chorób Zakaźnych WSR, Lublin
<i>Str. pluton</i> M, S, Z	Rothamsted Exp. Station - Wielka Brytania
<i>Str. faecalis</i> S, M	" " " " " "
<i>Str. faecalis</i> PCM 896	Centr. Ośr. Kol. Drobnoustrojów PAN Wrocław
<i>Str. faecalis</i> I	Instytut Chorób Zakaźnych WSR, Lublin
<i>Str. bovis</i> 503	Centr. Ośr. Kol. Drobnoustrojów PAN, Wrocław
<i>Str. pyogenes</i> PCM 465,	" " " " " "
PCM 466, PCM 467, PCM	" " " " " "
918, PCM 470, PCM 471,	" " " " " "
PCM 919, PCM 920, PCM	" " " " " "
475, PCM 477	" " " " " "

Hewitta w temp. 37°C przez 18 godz. Do uodporniania królików użyto 7 szczepów *Str. pluton* (1, 10, 18, 22, M, S, Z), 4 szczepy *Str. faecalis* (I, 896, M, S). Króliki uodporniano 96 godz. hodowłą *Str. pluton* i 18 godz. hodowłą *Str. faecalis* poddaną 40-krotnemu zamrażaniu i rozmrażaniu (2×10^9 kom/ml z dodatkiem 0,2% formaliny farmakopealnej). Po 48 godz. inkubacji z formaliną w temp. 37°C i kontroli na jałowość i nieszkodliwość wg ogólnie przyjętych zasad antygeny przechowywano w temp. 4°C.

Antygeny do odczynów serologicznych sporządzono z osadu 96 godz. hodowli *Str. pluton* i 18 godz. hodowli pozostałych drobnoustrojów po sześciokrotnym przemyciu jałowym 0,85% NaCl.

Ekstrakt wielocukrowy L otrzymano wg metody Lancefield (22) z komórek rozbitych perelkami szklanymi i oczyszczono wg Elliott (11) przez wytrącenie alkoholem etylowym i acetonem a następnie wg Michel i wsp. (25) na kolumnie wypełnionej DEAE celulozą. Do elucji stosowano etanol w stężeniach od 90 do 20%. OD poszczególnych frakcji w eluacie określono przy długości fali 490 m μ .

Wyciąg wielocukrowy F sporządzono wg metody formamidowej Fullera (12) w modyfikacji Krause i McCarty (21). Uzyskany ekstrakt oczyszczono wg Homma i Suzuki (18) stosując 50 μ g pepsyny krystalicznej i 50 μ g krystalicznej trypsyny na 1 ml badanej frakcji rozpuszczonej w 0,01 M NaOH. Trawienie enzymami przeprowadzono w temp. 20°C przez 2 godz., przy czym trawienie powtarzano aż do uzyskania ujemnego wyniku reakcji biuretowej.

Antygen pełny H1 sporządzono z komórek zawieszonych w wodzie podwójnie destylowanej, które po 30-krotnym zamrażaniu i rozmrażaniu wirowano przez 30 min. przy 9000 x g. Klarowny supernatant stanowił antygen H1.

Antygen H2 uzyskano z antygeny H1 po 15 min. ogrzewaniu w temp. 121°C i trawieniu trypsyną, pepsyną i rybonukleazą wg Cummins i Harrisa (8).

Antygen grupowo specyficzny D otrzymano wg Pleceaś (33). Antygen do aglutynacji otrzymano wg Bailey'a i Gibbsa (3).

Surowice odpornościowe dla szczepów *Str. pluton* 1, 10, 18, 22, M, S, Z i *Str. faecalis* I, 896 M i S produkowano na królikach w wieku 5—6 mies. wagi 2,5–3,0 kg. Przed przystąpieniem do uodporniania zbzdano ich krew w odczynie aglutynacji i precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym na obecność normalnych przeciwciał w stosunku do *Str. pluton* i *Str. faecalis*. Cykl uodporniania wynosił 5 tyg. i składał się z trzech kolejnych codziennych iniekcji antygeny przedzielnymi 4 dniową przerwą. Jednorazowa dawka antygeny wynosiła w pierwszym tygodniu uodporniania 0,25 ml; w drugim tygodniu 0,5 ml; w trzecim 0,75 ml; w czwartym i piątym 1,0 ml. Surowice pobrano na drodze punkcji mięśnia serca 15 dnia po ostatniej iniekcji antygeny. W odczynach serologicznych stosowano surowicę inaktywowaną (56°C — 30 min.). Ponadto w celu określenia przynależności od grupy serologicznej stosowano surowice grupowo-specyficzne dla grup A—P paciorkowców produkcji Warsz. Wytw. Sur. i Szczep.

Odczyn precypitacji pierścieniowej wykonano wg Lancefield (22). O dodatnim wyniku odczynu świadczyło pojawienie się strątu po 1—2 min. inkubacji w temp. pokojowej.

Odczyn aglutynacji probówkowej wykonano wg Moreira-Jacob (27). Za wynik dodatni odczynu przyjęto wystąpienie aglutynacji po 4 godz. inkubacji w temp. 37°C.

Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wykonano wg Ouchterlony (29—31). W odczynie stosowano surowice odpornościowe rozcieńczone 1:2 w 0,85% NaCl, gdyż przy tym rozcieńczeniu uzyskiwano najwyraźniejsze linie precypitacyjne. Dla kontroli odczynu przeprowadzono badania w układzie: nierozcieńczona lub rozcieńczona surowica względnie antygen oraz 0,85%

NaCl. W przypadku antygenów trypsynowanych w odczynie kontrolnym stosowano bufor Sørensen z trypsyną i węglanem amonu (5). Wyniki odczynu odczytywano w świetle przechodzącym po 24, 48 i 72 godz. od chwili nastawienia próby.

Odczyn immunoelektroforezy wykonano wg Grabara i Williamsa (14). Rozdział elektroforetyczny wykonano przy napięciu 3—3,5 V/cm w buforze weronalowym (pH 8,6) w ciągu 45 min. Wyniki odczytywano po 18, 24, 72 i 96 godz. od chwili nastawienia odczynu.

Absorbowanie surowic odpornościowych — surowice do odczynów precypitacji absorbowano odpowiednimi frakcjami antygenowymi w ilości 250 mg badanej frakcji/ml surowicy. Wysycanie przeprowadzano w temp. 37°C przez 30 min., a następnie w temp. 4°C przez 18 godz. Surowice do aglutynacji absorbowano zawieszoną hodowli w stosunku 1 część osadu na 4 części surowicy i inkubowano jak uprzednio. Wysycanie surowic prowadzono aż do chwili gdy wysycana surowica nie reagowała z antygenem lub homologiczną frakcją antygenową użytą do wysycania. Zawartość białka we frakcji H1 oznaczono wg Lowry (23) stosując jako standard albuminę bydlęcą. Zawartość cukrów redukujących oznaczono wg Mookrasha (26), zaś test z nadjodanem sodu (0,002 M) przeprowadzono wg Elliott (11).

Wyniki

Stosując do uodporniania królików komórki dezintegrowane na drodze zamrażania i rozmrażania otrzymano surowice odpornościowe aktywne w odczynie precypitacji pierścieniowej, aglutynacji, precypitacji dyfuzyjnej w żelu i odczynie immunoelektroforezy. Wydajność poszczególnych frakcji antygenowych oraz zawartość cukrów, a w przypadku frakcji H1 białek podano w tab. 2.

Tab. 2. Wydajność ekstraktów H1, L, F i D oraz zawartość białka i cukrów (% suchej masy) w badanych frakcjach *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. boris* (średnia z 10 oznaczeń)

Drobnoustroj	Wyciąg H1			Wyciąg L		Wyciąg F		Wyciąg D	
	wydajność	białko	cukier	wydajność	cukier	wydajność	cukier	wydajność	cukier
<i>Str. pluton</i>	322	22,3	45,3	122	86,7	3,6	71,6	2,5	49,8
<i>Str. faecalis</i>	416	19,9	61,7	11,3	92,6	2,4	49,7	2,1	52,2
<i>Str. boris</i>	40,2	31,4	21,8	15,3	68,0	1,9	62,2	2,5	43,8

W badaniach stosowano frakcję wyciągu wg Lancefield eluowaną 60% etanolem z kolumny wypełnionej DEAE celulozą. Jedynie ta frakcja oczyszczonego wyciągu była serologicznie aktywna. Wyciągi L, D, F i H2 nie zawierały białka, wykazywały dodatnią reakcję Molischa i nie traciły aktywności pod wpływem pepsyny i trypsyny. Traciły one natomiast aktywność serologiczną pod wpływem nadjodanu sodu.

Właściwości immunogenne frakcji antygenowych.

Właściwości immunogenne frakcji H1, H2, F i L otrzymanych ze szczepów 18 i Z *Str. pluton* oraz szczepu Z *Str. faecalis* sprawdzono na królikach, którym podawano dożylnie w odstępach dwudniowych wzrastające co 0,2 mg dawki badanych frakcji począwszy od stężenia 0,2 mg do 3,0 mg/iniekcja. Tylko w surowicach królików uodpornianych frakcją H1 pojawiły się aglutyniny (średnie miano dla *Str. pluton* 1:256, *Str. faecalis* 1:512) i precypityny (średnie miano 1:512).

Określenie przynależności *Str. pluton* do grupy serologicznej

Przynależność *Str. pluton* do odpowiedniej grupy serologicznej określono w odczynie precypitacji pierścieniowej z wyciągami Lancefield i surowicami grupowo-specyficznymi dla poszczególnych grup paciorkowców i badanych szczepów *Str. faecalis*. Uzyskano dodatnie wyniki w odczynie precypitacji z surowicą grupowo-swoistą dla paciorkowców z grupy D i surowicami dla *Str. faecalis*. Wynik dodatni uzyskano również w tym odczynie z frakcją D *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* i surowicą grupowo-swoistą D. Ekstrakty wg Lancefield ze szczepów *Str. pyogenes*, które należały do innych grup serologicznych, nie reagowały w stosowanych odczynach z surowicą grupową D oraz surowicami anty-*Str. pluton* i anty-*Str. faecalis*.

ca nie przyczyniało się do zwiększenia ilości linii precypitacyjnych i prowadziło do zatarcia ich konturów.

Jak wynika z tab. 3 frakcja H1 *Str. pluton* wykazywała największą aktywność serologiczną i tworzyła od 3—5 linii precypitacyjnych — linie I, II, III, IV i V (ryc. 3, 4, 8). Mniejszą aktywność wykazywała frakcja F—linie I, II i IV (tab. 4, ryc. 3, 9) i frakcje L i D—linie precypitacyjne I i II (ryc. 1—5). Wszystkie badane frakcje rozdzielały się dobrze w polu elektrycznym i w odczynie immunoelektroforezy dawały charakterystyczny układ widm (ryc. 8). Ilość linii precypitacyjnych dla poszczególnych frakcji w tym odczynie była identyczna jak w odczynie precypitacji dyfuzyjnej w żelu. Stwierdzono, że po ogrzewaniu oraz po trawieniu pepsyną i trypsyną z frakcji H1 znikają linie precypitacyjne III i V.

Tab.3. Rodzaje linii precypitacyjnych utworzonych przez antygeny H1 i D szczepów 1,10,18,22,M,S,Z *Str. pluton*, 896,I,M,S,Z *Str. faecalis* i 503 *Str. bovis* z surowicami anty-*Str. pluton*, *Str. faecalis* i surowicą grupowo-specyficzną D w odczynie precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym

Szczep	S u r o w i c e																									
	<i>Str. pluton</i>												<i>Str. faecalis</i>								Grupowo-swoista D					
	f		S		10		Z		18		22		M		896		I		S			M				
	f r a k c j e																									
H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	H1	D	
<i>Str. pluton</i> 1	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
S	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
10	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
Z	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
18	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
22	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
M	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II	I,II,III,IV,V	I,II
<i>Str. faecalis</i> 896	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II
I	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II
S	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II
M	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II
Z	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II
<i>Str. bovis</i> 503	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II

Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i odczyn immunoelektroforezy

Wszystkie frakcje antygenowe badanych szczepów wytwarzały w odczynie precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i w odczynie immunoelektroforezy z surowicami homologicznymi od 1—5 linii precypitacyjnych (tab. 3, 4). Czas pojawiania się linii wykazywał na pewną ich zależność od składu chemicznego badanych frakcji. Linie precypitacyjne frakcji wielocukrowych pojawiały się po 10—12 godz., zaś komponent białkowych zawartych w wyciągach H1 po 48 godz. po nastawieniu odczynu. Przedłużenie czasu dyfuzji względnie dodatkowe wypełnianie baseników antygenem lub surowi-

Serologicznie aktywne frakcje *Str. faecalis* i *Str. bovis* wytwarzały z surowicami homologicznymi 1—4 łuków precypitacyjnych. Najaktywniejsza okazała się frakcja H1 (tab. 3, ryc. 6), która z surowicami homologicznymi tworzyła linie I, II, a, b. Wyjątek stanowiła frakcja H1 szczepu M *Str. faecalis*, która z surowicą homologiczną dawała jedną linię — linię II. Mniejszą ilość linii precypitacyjnych uzyskiwano z frakcją F; od 1—4 linii, zawsze linia II oraz z frakcją L — od 1—2 linii, zawsze linie II i a (ryc. 6). Jedną linię precypitacyjną — linię II, dawały w układach homologicznych wyciągi D *Str. faecalis* i *Str. bovis*.

Badania porównawcze frakcji H1 *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* wykazały, że frakcje te

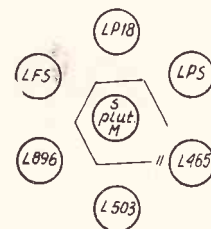
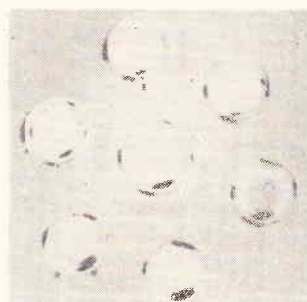
posiadają 1—2 wspólnych linii precypitacyjnych — linie I i II (tab. 3, ryc. 5, 10). Frakcje H1 *Str. pluton* z surowicami dla szczepów 896, I i S *Str. faecalis* tworzyły linie I i II (ryc. 6, 11), zaś z surowicą dla szczepu M *Str. faecalis* i surowicą grupową D linię II. Te wspólne linie

Wyniki odczynu precypitacji dyfuzyjnej frakcji F podano w tab. 4 z której wynika, że frakcja F *Str. pluton* wytwarza z surowicami anty-*Str. pluton* linie precypitacyjne I, II, IV (ryc. 3, 8), względnie II i IV (ryc. 9). Natomiast z surowicami anty-*Str. faecalis* dla szczepów

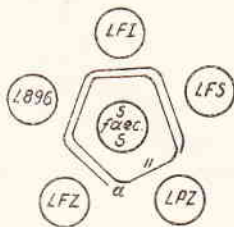
Tab. 4. Rodzaje linii precypitacyjnych wytworzonych przez wyciągi F i L *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* z surowicami anty-*Str. pluton*, *Str. faecalis* i grupowo-swoistą D w odczynie precypitacji w żelu

Szczepy	Surowice																						
	<i>Str. pluton</i>										<i>Str. faecalis</i>										Grupowo-swoista D		
	I		S		10		Z		18		22		M		896		I		S			M	
	F r a k c j e																						
F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F		L	
<i>Str. pluton</i>	1	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	5	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	10	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	Z	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	18	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	22	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
M	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II		
<i>Str. faecalis</i>	896	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	I	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	S	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	M	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
	Z	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	
<i>Str. bovis</i> 503	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	I,II	

znikały z surowicy anty-*Str. pluton* i anty-*Str. faecalis* po wysyceniu wyciągiem H1 *Str. pluton*. Również wyciągi H1 *Str. faecalis* i *Str. bovis* usuwały linie I i II z surowic homologicznych i heterologicznych. Dawka absorpcyjna frakcji H1 *Str. pluton* w przypadku surowicy anty-*Str. faecalis* wynosiła średnio 350 mg/ml pełnej surowicy, zaś dawka absorpcyjna frakcji H1 *Str. faecalis* w przypadku surowicy anty-*Str. pluton* była średnio 2—4 krotnie wyższa.



Ryc. 2. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym haptenów wg Lancefield ze szczepów S i 18 *Str. pluton* (LPS, LP18), 465 *Str. pyogenes* (L465), 503 *Str. bovis* (L503), 896 i S *Str. faecalis* (L896, LFS) z surowicą anty-*Str. pluton* M.



Ryc. 1. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym haptenów wg Lancefield ze szczepu S *Str. pluton* (LPS) i szczepów I, S, Z, 896 *Str. faecalis* (LFI, LFZ, L896) z surowicą anty-*Str. faecalis* S.

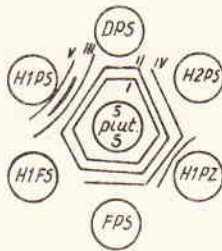
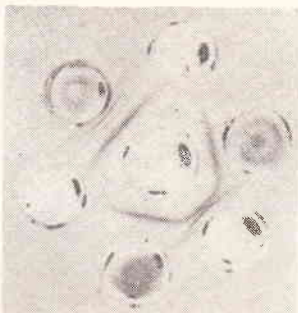
896, I i S frakcja ta dawała linie I i II (ryc. 6), z surowicą dla szczepu M i grupowo-swoistą D linię II. Wyciągi wg Fullera *Str. faecalis* z surowicami homologicznymi tworzyły od 1—4 łuków precypitacyjnych (I, II, a, b), z surowicami anty-*Str. pluton* linie precypitacyjne I i II i z surowicą grupowo-swoistą D linię II.

W związku z faktem, że frakcje H2 i F *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* w badanych odczynach łącznie z odczynem krzyżowej absorpcji przeciwna zachowywały się identycznie (ryc. 3) w dalszych badaniach stosowano jedynie frakcję F.

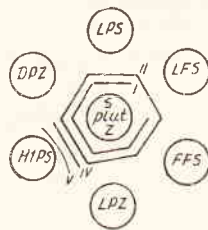
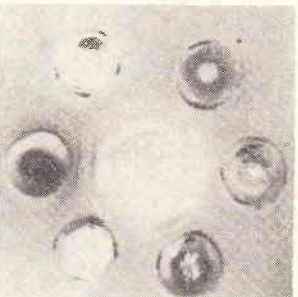
Po wysyceniu surowic anty-*Str. pluton* frakcjami H1 lub F *Str. faecalis* znikały linie I i II w układzie: surowica absorbowana i frakcja F *Str. pluton* lub *Str. faecalis*; oraz linia I w układzie: surowica absorbowana frakcja F *Str. bovis*. Z surowicy anty-*Str. faecalis* i grupowo-swoistej D po wysyceniu frakcją H1 lub F *Str. pluton* znikały linie precypitacyjne I i II w układzie: absorbowane surowice i frakcja F

Str. pluton, *Str. faecalis* i *Str. bovis*. Do krzyżowego wysycania surowic stosowano 2—3 krotnie wyższe dawki wyciągu F *Str. faecalis* niż w przypadku wyciągu F *Str. pluton*.

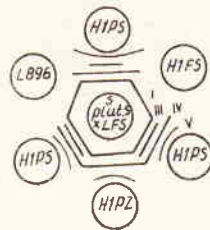
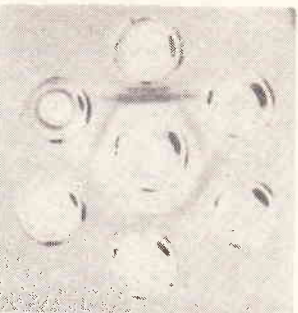
Wyciągi wg Lancefield *Str. pluton* tworzyły z surowicą anty *Str. faecalis* i grupowo-swoistą D linię II (tab. 4, ryc. 1), zaś z surowicami dla szczepów 1, 10, 18, S i Z *Str. pluton* linie I i II. Wyciągi wg Lancefield *Str. faecalis* dawały z surowicami anty-*Str. pluton* linie I i II (szczep 896 *Str. faecalis*) lub linię II, zaś z surowicami dla szczepów homologicznych linię II i a (ryc. 1). Linia II znikła z badanych surowic po wysyceniu każdym z homologicznych lub heterologicznych antygenów (ryc. 5). Z surowicą grupowo-swoistą D wyciągi L *Str. pluton* i *Str. bovis* dawały linię II, która ulegała wysyceniu po absorpcji surowicy wyciągiem Lancefield badanych gatunków paciorkowców.



Ryc. 3. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym ekstraktu D ze szczepu S *Str. pluton* (DPS), ekstraktów H1 ze szczepów S i Z *Str. pluton* (H1PS, H1PZ) i S *Str. faecalis* (H1FS) oraz wyciągu wg Fullera ze szczepu S *Str. pluton* (FPS) z surowicą anty-*Str. pluton* S.

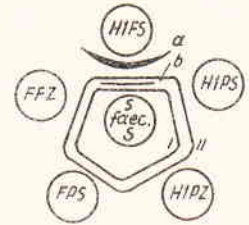


Ryc. 4. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym haptenu wg Lancefield ze szczepów S i Z *Str. pluton* (LPS, LPZ) i S *Str. faecalis* (LFS), wyciągu wg Fullera ze szczepu S *Str. faecalis* (FFS), wyciągu H1 ze szczepu S *Str. pluton* (H1PS) i wyciągu D ze szczepu Z *Str. pluton* (DPZ) z surowicą anty-*Str. pluton* Z.

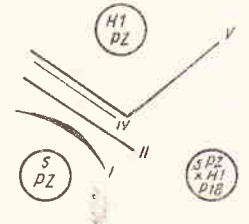
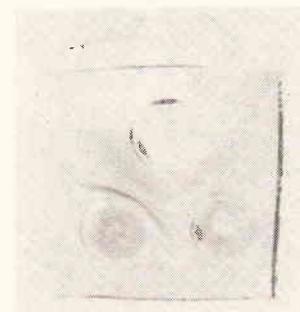


Ryc. 5. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym ekstraktów H1 ze szczepów 1, S, Z *Str. pluton* (H1P1, H1PS, H1PZ) i szczepu S *Str. faecalis* (H1FS) oraz wyciągu wg Lancefield ze szczepu 896 *Str. faecalis* (L896) z surowicą anty-*Str. pluton* absorbowaną wyciągiem wg Lancefield szczepu S *Str. faecalis* (LFS).

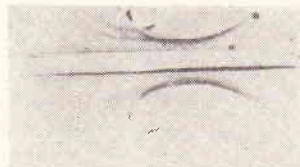
Frakcja D *Str. pluton* z surowicami anty-*Str. pluton* tworzyła linie precypitacyjne I i II (ryc. 3, 4), zaś z surowicami anty-*Str. faecalis* i surowicą grupowo-specyficzną D linię II. Frakcja D *Str. faecalis* z surowicami szczepów homologicznych, surowicą grupowo-specyficzną D i surowicą dla szczepów 18, 22 i M *Str. pluton* tworzyły linię II, zaś z surowicami dla szczepów 1, 10, S i Z *Str. pluton* linie I i II. W następstwie krzyżowego wysycania surowic frakcjami H1, F i D *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* linie te zniknęły.



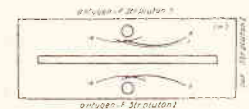
Ryc. 6. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wyciągów H1 ze szczepów S, Z *Str. pluton* (H1PS, H1PZ), szczepu S *Str. faecalis* (H1FS) oraz wyciągów wg Fullera ze szczepu S *Str. pluton* (FPS) i S *Str. faecalis* (FFS) z surowicą anty-*Str. faecalis* S.



Ryc. 7. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wyciągu H1 ze szczepu Z *Str. pluton* (H1PZ) z surowicą anty-*Str. pluton* Z i surowicą anty-*Str. pluton* Z absorbowaną frakcją H1 szczepu 18 *Str. pluton* (H1P18).



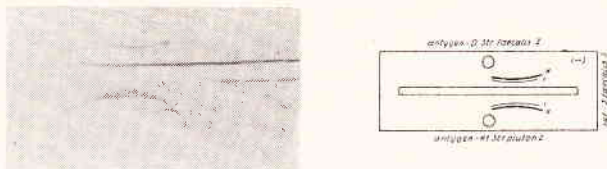
Ryc. 8. Widmo immunoelektroforetyczne wyciągu H1 ze szczepu S *Str. pluton* i wyciągu wg Fullera ze szczepu Z *Str. pluton* wywołane surowicą anty-*Str. pluton* S.



Ryc. 9. Widmo immunoelektroforetyczne wyciągów wg Fullera ze szczepów S i Z *Str. pluton* wywołane surowicą anty-*Str. pluton* Z.

Badania przeprowadzone z surowicami anty-*Str. pluton* absorbowanymi frakcjami H1 szczepów 1 i S *Str. pluton* wykazały, że frakcja H1 tych szczepów wysyciała przeciwciała we wszystkich badanych surowicach (tab. 5). Ta sama frakcja ze szczepów 10 i Z *Str. pluton*

wysycala zupełnie przeciwiacala z surowic dla szczepow 10, 18, M i Z *Str. pluton* i nie wysycala linii III z surowicy dla szczepow 1 i S *Str. pluton*. Frakcja H1 ze szczepow 18, 22 i M *Str. pluton* wysycala precypityny z surowic homologicznych, nie wysycala natomiast linii V z surowicy dla szczepu 10 i Z (ryc. 7), oraz linii III i V z surowicy dla szczepu 1 i S *Str. pluton*. Z surowic dla szczepow 18, 22 i M absorbowanych wyciagami wg Lancefield nie znikal luk precypitacyjny IV, z surowic dla szczepow 10 i Z linie IV i V oraz z surowicy dla szczepow 1 i S linie III, IV i V.



Ryc. 10. Widmo immunoelektroforetyczne wyciagu D ze szczepu Z *Str. faecalis* i wyciagu H1 ze szczepu Z *Str. pluton* wywolane surowicą anty-*Str. faecalis* S.

Na podstawie wystepowania cieplochwiejnych (III i V) i cieplostalej (IV) komponenty antygenowej w badanych szczepach *Str. pluton* mozna je podzielic na trzy typy serologiczne (tab. 5). Do typu 1 mozna zaliczyc szczepy posiadajace komponenty antygenowe III, IV, V, do typu 2 komponenty IV i V i do typu 3 komponente antygenowa IV. Przyjmujac za podstawe klasyfikacji na typy serologiczne jedynie obecnośc antygeny cipełoopornego o naturze polisacharydowej, wszystkie badane szczepy *Str. pluton* niezaleznie od zrodla pochodzenia stanowia jednolity pod wzgledem serologicznym typ, ktorego swoistośc determinuje antygen IV.

Tab 5. Podzial szczepow *S. pluton* na typy serologiczne na podstawie antygenow cieplostalych i cieplochwiejnych

Typ	Antyg. H1	Surowica anty- <i>Str. pluton</i> „S”						Surowica anty- <i>Str. pluton</i> „Z”						Surowica anty- <i>Str. pluton</i> 18						Szczepy terenowe
		frakcje uzycie do wysycenia surowic																		
		LPS	LPZ	LP1B	H1P5	H1PZ	H1P1B	LPS	LPZ	LP1B	H1P5	H1PZ	H1P1B	LPS	LPZ	LP1B	H1P5	H1PZ	H1P1B	
1	S	III, IV, V	III, IV, V	III, IV, V	-	III	III, V	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV	IV	IV	-	-	-	2, 3, 6, 15, 17
	1	III, IV, V	III, IV, V	III, IV, V	-	III	III, V	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV	IV	IV	-	-	-	
2	Z	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV	IV	IV	-	-	-	13, 19, 24, 32
	10	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV, V	IV, V	IV, V	-	-	V	IV	IV	IV	-	-	-	
3	18	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 14, 16, 18, 20, 21, 23, 25-31, 33-40
	M	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	
	22	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	IV	IV	IV	-	-	-	

Obecnośc antygeny IV we wszystkich badanych szczepach *Str. pluton* znajduje potwierdzenie w dodatnich wynikach odczynu precypitacji wyciagow wg Fullera *Str. pluton* z surowicami dla szczepow 18, S i Z absorbowanych wyciagami wg Lancefield szczepow homologicznych i heterologicznych. Absorbowane surowice-typowo specyficzne dla typu IV — nie reagowaly zupełnie z wyciagami F *Str. faecalis* i *Str. bovis*.

Odczyn aglutynacji

Wyniki odczynu aglutynacji podano w tab. 6 z ktorej wynika, ze wszystkie badane szczepy

Str. pluton aglutynowaly w wysokich mianach w surowicach dla szczepow homologicznych (1:256—1:4096) i heterologicznych *Str. pluton* (1:128—1:2048). W surowicach anty-*Str. faecalis*, *Str. pluton* aglutynowal w niskich mianach (1:4—1:32). Miano aglutynacji (średnia modalna) dla szczepow *Str. pluton* uzytych w badaniach porownawczych z surowicami anty-*Str. pluton* wynosilo 1:1024 przy wartosciach krańcowych 1:128 i 1:8192. Szczepy *Str. faecalis* aglutynowaly w surowicach homologicznych w mianach 1:512—1:2048, zaś w surowicach anty-*Str. pluton* w mianach 1:2—1:32. Wyniki odczynu aglutynacji w surowicach absorbowanych ujęto w tab. 7. Jak wynika z tab. 7 surowice anty-*Str. pluton* po absorpcji szczepem homologicznym nie aglutynowaly szczepow heterologicznych. Surowica dla szczepu S *Str. pluton* po absorpcji szczepem 10 lub Z aglutynowala szczep homologiczny w mianie cztero-

Tab 6. Średnie miano surowic dla szczepow *Str. pluton* S, Z, M, 10, 18, 22 i *Str. faecalis* S, Z, M, 896, I w odczynie aglutynacji próbkowej

Antygen	Surowica											
	<i>Str. pluton</i>						<i>Str. faecalis</i>					
	1*	10*	18*	22*	S*	Z*	1*	10*	18*	22*	S*	Z*
<i>Str. pluton</i>	S	2048	1024	256	256	2048	1024	128	4	15	4	-
	Z	1024	1024	256	256	2048	2048	256	15	15	8	-
	M	256	512	512	256	256	256	512	4	8	8	-
	1	2048	2048	128	512	2048	2048	256	8	4	4	4
	10	2048	4096	128	128	2048	1024	128	8	4	15	-
	18	256	128	128	128	128	128	128	-	4	32	-
22	256	128	128	128	256	128	128	4	4	4	-	
<i>Str. faecalis</i>	S	4	8	4	8	8	-	1024	2048	1024	256	256
	Z	8	4	4	4	4	-	256	256	256	256	256
	M	4	4	4	4	8	4	2	2	256	2048	2048
	896	4	-	-	15	16	8	4	4	4	4	4
	I	8	-	-	8	8	-	4	4	4	4	4
	I	8	-	-	8	8	-	4	4	4	4	4

krotnie nizszym, zaś po wysyceniu szczepem 18 i M aglutynowala szczep homologiczny i szczepy 10 i Z *Str. pluton* w mianie nizszym o jedno rozcieńczenie. Szczepy 10, S i Z usuwaly wszystkie aglutyniny z surowicy dla szczepu Z oraz obnizaly miano aglutynacji o polowe w

przypadku szczepow 18 i M *Str. pluton*. Surowice dla szczepow 18 i M tracily zupełnie zdolnośc aglutynowania po absorpcji badanymi szczepami *Str. pluton*. Szczepy S i Z wysycaly wszystkie aglutyniny z surowicy dla szczepu 10, zaś szczepy 18 i M obnizaly znacznie miano aglutynacyjne tej surowicy.

Omówienie wyników

Aktywnośc immunologicznie czynnych wyciagow paciorkowcow zalezy od metod ich ekstrakowania z komorki. Dobor odpowiednich metod ekstrakcji umozliwia z jednej strony

uwolnienie maksymalnych ilości immunologicznie czynnych sympleksów, z drugiej strony zapobiega zmianom ich struktury. W związku z tym do wyjaśnienia struktury antygenowej *Str. pluton* przy uwzględnieniu właściwości *Str. faecalis* i *Str. bovis* oprócz wyciągów wielocukrowych wg Lancefield i Fullera wprowadzono wyciągi wodne komórek dezintegrowanych przez kolejne zamrażanie i rozmrażanie, oraz wyciągi z mechanicznie rozbitych komórek. Wprowadzenie tych metod miało zapobiec ewentualnym stratom wielocukrów oraz

padku wykorzystano obserwacje Elliott (11), Jones i Shattock (20) i Shattock (36), którzy uzyskali wysokowartościowe surowice grupowo-specyficzne dla paciorkowców z grupy D podczas uodporniania królików komórkami rozbitymi mechanicznie. Wprowadzenie jako antygeny do uodporniania zawiesiny dezintegrowanych komórek wiąże się z wewnątrzkomórkową lokalizacją antygeny grupowo-swoistego u paciorkowców z tej grupy serologicznej (41). Wydaje się, że powodem uzyskania wyników negatywnych przez Bailey'a (2) i Bailey'a i Gibbisa (3) podczas prób określenia przynależności grupowej *Str. pluton* był brak odpowiedniej surowicy zawierającej przeciwciała grupowo-swoiste w dostatecznym mianie. Badacze ci stosowali w procesie uodporniania zawiesiny pełnych komórek *Str. pluton*.

W oparciu o metodę precypitacji dyfuzyjnej w żelu i odczyn immunoelektroforezy wykazano w wyciągach z zamrażanych i rozmrażanych komórek wszystkich szczepów *Str. pluton* od 3—5 frakcji antygenowych, którym odpowiadały linie precypitacyjne I, II, III, IV i V (ryc. 3, 4, 8). Analiza porównawcza tych wyciągów *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* oparta o te same metody badań łącznie z metodą krzyżowego wysycania przeciwciał wykazała obecność wspólnych, identycznych, serologicznie homogennych komponent antygenowych I i II (ryc. 1, 6, 10).

Pewne dane odnośnie natury uzyskanych komponent antygenowych dostarczyły badania nad ich wrażliwością na działanie temperatury (121°C przez 15 min.), pepsyny, trypsyny i nadjodanu sodowego. Za naturą węglowodanową tych frakcji przemawia niewrażliwość na ogrzewanie i działanie enzymów proteolitycznych, oraz utrata aktywności serologicznej pod wpływem nadjodanu sodu. Występowanie frakcji I i II w wyciągach L, F i D (ryc. 1, 2) zawierających jedynie węglowodany stanowi dalsze potwierdzenie ich natury wielocukrowej.

Występowanie wspólnych komponent I i II w wyciągach H1, L, F, D *Str. pluton* i *Str. faecalis* i w wyciągu H1 *Str. bovis* oraz komponenty II w wyciągach H2, L, F i D *Str. bovis*, dodatni wynik odczynu precypitacji pierścieniowej tych wyciągów, a szczególnie wyciągów L i F *Str. pluton* i *Str. faecalis* z surowicą grupowo-specyficzną D i ujemne wyniki odczynu precypitacji z surowicami grupowo-specyficznymi dla paciorkowców z innych grup serologicznych (A—P) wskazują, że komponenta II a również i labilna komponenta I determinują swoistość grupową.

Wydaje się, że w wyciągach sporządzonych bez zastosowania metod ekstrakcji chemicznej (H1), wielocukier warunkujący swoistość grupową tworzy sympleksy z białkiem co warunkuje jego aktywność immunogenną. Jedynie bowiem wyciągi H1 pobudzały w organizmie

Tab. 7. Miano aglutynacji surowic adsorbowanych *Str. pluton* S, Z, M, 10 i 18

Surowica	Antygen do adsorcji	Antygen				
		<i>Str. plut.</i> S	<i>Str. plut.</i> Z	<i>Str. plut.</i> M	<i>Str. plut.</i> 10	<i>Str. plut.</i> 18
Anty- <i>Str. pluton</i> S	S	256	-	-	-	-
	Z	-	-	-	-	-
	M	1024	1024	-	1024	-
	10	512	-	8	-	-
	18	1024	1024	-	1024	-
	niedadorsb.	2048	2048	256	2048	128
Anty- <i>Str. pluton</i> Z	S	-	-	-	-	4
	Z	-	-	-	-	-
	M	512	1024	-	-	512
	10	-	-	-	-	-
	18	512	1024	-	-	256
	niedadorsb.	1024	2048	256	1024	128
Anty- <i>Str. pluton</i> M	S	-	-	-	-	-
	Z	4	-	-	-	-
	M	-	-	-	-	-
	10	4	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-
	niedadorsb.	128	256	512	128	128
Anty- <i>Str. pluton</i> 10	S	-	-	-	-	-
	Z	-	-	-	-	-
	M	512	512	-	-	2048
	10	4	-	-	-	-
	18	1024	128	-	-	2048
	niedadorsb.	1024	1024	512	4096	128
Anty- <i>Str. pluton</i> 18	S	-	-	-	-	-
	Z	-	-	-	-	-
	M	-	4	-	-	4
	10	-	-	-	-	-
	18	-	8	-	-	4
	niedadorsb.	256	256	512	128	128

rozpadowi sympleksów wielocukrowo-białkowych w procesach ekstrakcji chemicznej. Zależność pomiędzy metodami ekstrahowania i składem antygenowym frakcji znalazła wyraźne potwierdzenie w wynikach odczynów precypitacji dyfuzyjnej w żelu i immunoelektroforezy. W badaniach własnych stwierdzono bowiem występowanie wyraźnych różnic w ilości serologicznie aktywnych komponent we frakcjach H1, F i L *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* (tab. 3, 4, ryc. 3—5, 8). Zaobserwowane różnice wiązały się najprawdopodobniej z dużą labilnością grup determinujących aktywność serologiczną przynajmniej w części antygenów (40).

Do określenia powinowactwa oraz ewentualnych różnic w budowie antygenowej *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* wykorzystano głównie odczyn precypitacji pierścieniowej, precypitacji dyfuzyjnej w żelu, odczyn immunoelektroforezy i odczyn absorpcji przeciwciał wg Castellaniego. Odczyny te znajdują bowiem powszechne zastosowanie przy określaniu liczby serologicznie aktywnych składników antygenowych wyciągów bakteryjnych.

W celu otrzymania na królikach surowic odpornościowych aktywnych w tych odczynach, w badaniach własnych do uodporniania stosowano zawiesiny komórek dezintegrowanych przez zamrażanie i rozmrażanie. W tym przy-

królików wytwarzanie przeciwciał dla komponent I i II.

Brak reakcji krzyżowych w odczynie aglutynacji pomiędzy *Str. pluton* i *Str. faecalis*, względnie uzyskiwanie bardzo niskich mian w tym odczynie (miano maksymalne 1:32) potwierdza pogląd, że w przypadku *Str. pluton* podobnie jak u innych paciorkowców z grupy D antygen grupowo-specyficzny występuje w głębszych partiach komórki (11, 20). Hijmans (17), Shattock i Smith (38), Wicken i wsp. (41) wykazali, że antygen determinujący przynależność gatunkową paciorkowców z grupy D występuje pomiędzy ścianą komórkową i cytoplazmą.

Badania własne wykazały również, że w komórkach *Str. pluton* występuje ponadto 1—3 frakcji antygenowych, którym odpowiadają linie precypitacyjne III, IV i V. Frakcje te nie występują w komórkach *Str. faecalis* i *Str. bovis* (ryc. 3, 4, 7, 8). Charakterystyczne rozmieszczenie luków precypitacyjnych odpowiadających każdej frakcji w widmie immunoelektroforetycznym i w odczynie precypitacji dyfuzyjnej w żelu wskazuje na ich odmienność.

Wydaje się, że frakcja IV o charakterze węglowodanowym występująca we wszystkich badanych szczepach *Str. pluton* warunkuje swoistość gatunkową i typową tego drobnoustroju. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań Elliott (11), Skadhauge (39) i Bleiweis (4), którzy klasyfikację paciorkowców z grupy D na typy serologiczne oparli na występowaniu termostabilnych (O) frakcji wielocukrowych i termolabilnych (K) frakcji białkowych. Antygen IV wykazuje odrębność gatunkową podobnie jak większość antygenów *Str. faecium* (35), *Str. bovis* (24) i *Str. faecalis* (39). Wydaje się, że ten antygen oraz antygeny białkowe III i V są odpowiedzialne za aglutynację szczepów *Str. pluton*. Występowanie antygeny IV we wszystkich 40 krajowych i 3 wzorcowych szczepach *Str. pluton* przemawia za dużym stopniem pokrewieństwa pomiędzy tymi szczepami.

Komponenty III i V o naturze białkowej występowały jedynie w 7 szczepach, zaś komponenta V w sześciu szczepach *Str. pluton*. Nie stwierdzono ich w pozostałych szczepach *Str. pluton* oraz w szczepach *Str. faecalis* i *Str. bovis*, co przemawia za ich dużą odrębnością w badanej grupie paciorkowców.

W przypadku przyjęcia za podstawę klasyfikacji na typy serologiczne również występowania antygenów termolabilnych (35), antygeny III i V mogą decydować o przynależności typowej w obrębie gatunku *Str. pluton*. Pomocnym w określaniu przynależności typowej jest odczyn aglutynacji i precypitacji dyfuzyjnej w żelu z surowicami absorbowanymi dla szczepów 10, S i Z *Str. pluton* (surowice typowo-specyficzne).

Stwierdzone w badaniach własnych różnice w wysokości mian aglutynacji, szczególnie w przypadku szczepów 18, 22 i M *Str. pluton* wskazują na występowanie różnic jakościowych i ilościowych w serologicznie aktywnych komponentach powierzchni komórki *Str. pluton*. Różnice te mogą się wiązać z brakiem komponent antygenowych III i V w szczepach należących do 3 typu oraz brakiem antygeny III w szczepach zaliczonych do typu 2. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w odczynie aglutynacji z surowicami absorbowanymi szczepami należącymi do jednego z trzech typów. Brak reakcji krzyżowych w odczynie aglutynacji pomiędzy *Str. pluton* i *Str. faecalis*, względnie uzyskiwanie bardzo niskich mian w tym odczynie znajduje potwierdzenie w badaniach Bailey'a (2) i Bailey'a i Gibbsa (3).

Wnioski

1. Zastosowane metody badań pozwalają na wykazanie w obrębie badanych szczepów *Str. pluton* od 3 do 5 serologicznie aktywnych frakcji antygenowych. Frakcje oznaczone I, II i IV posiadały charakter wielocukrów lub kompleksów wielocukrowo-białkowych, frakcje III i V charakter białkowy.

2. Metoda precypitacji dyfuzyjnej w żelu i odczyn immunoelektroforezy z wyciągami wodnymi zamrażanych i odmrażanych komórek i haptenami wg Fullera, a także odczyn aglutynacji próbkowej umożliwiają odróżnienie *Str. pluton* od *Str. faecalis*.

3. Szczepy *Str. pluton*, *Str. faecalis* i *Str. bovis* posiadają dwie wspólne komponenty antygenowe I i II. Obecność tych komponent w szczepach *Str. pluton* warunkuje ich przynależność do grupy serologicznej D wg Lancefield.

4. Badane szczepy *Str. pluton* posiadają w swoim składzie antygenowym również polisacharydową ciepłostalą komponentę (oznaczoną w badaniach własnych jako frakcję IV) warunkującą swoistość gatunkową i typową tego paciorkowca.

5. Występowanie antygenów III, IV i V w badanych szczepach *Str. pluton* pozwala je zaliczyć do jednego z trzech typów serologicznych.

Piśmiennictwo

1. Bailey L.: Bull. Apicole 4, 11, 1961.
2. Bailey L.: Apicult. Res. 7, 103, 1968.
3. Bailey L., Gibbs A. J.: J. gen. Microbiol. 28, 335, 1962.
4. Bleiweis A. S., Krauss R. M.: J. exp. Med. 122, 327, 1965.
5. Bourtin P., Kourilsky R.: Anns. Inst. Pasteur 97, 148, 1959.
6. Bucher G. E., Stephens J. M.: J. Insect. Path. 1, 374, 1959.
7. Cosenza B. J., Lewis F. B.: J. Invertebr. Path. 7, 86, 1965.
8. Cummins C. S., Harris H.: J. gen. Microbiol. 14, 583, 1956.
9. Deibel H.: Bact. Rev. 28, 330, 1964.
10. Doane C. C.: J. Invertebr. Path. 15, 420, 1970.
11. Elliott S. D.: J. exp. Med. 111, 621, 1960.
12. Fuller A. T.: Br. J. exp. Path. 19, 130, 1948.
13. Gliński Z.: Medycyna Wet. 1972 w druku.
14. Grabar F., Williams C. A.: Biochim. biophys. Acta 17, 67, 1955.
15. Grandal H.: Acta. path. microbiol. scand. 31, 46, 1952.
16. Gubler H. U.: Schweiz. Z. all. Path. 17, 507, 1954.
17. Hijmans W.: J. gen. Microbiol. 28, 177, 1962.
18. Homma J. Y., Suzuki N.: J. Bact. 87, 630, 1964.
19. Intern. Bull. Bact. Nomenclature, Sub-committee on the

- taxonomy of the Streptococci and Pneumococci 13, III, 1963.
20. Jones D., Shattock P. M. F.: J. gen. Microbiol. 23, 335, 1960.
 21. Krauss R. M., McCarty M.: J. exp. Med. 114, 127, 1961.
 22. Lancefield R. C.: J. exp. Med. 57, 571, 1933.
 23. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. V.: J. biol. Chem. 193, 265, 1951.
 24. Medrek T. F., Barnes E. M.: J. appl. Bact. 25, 169, 1962.
 25. Michel M. F., Krause R. M.: J. exp. Med. 125, 1075, 1967.
 26. Mookrash L. C.: J. biol. Chem. 208, 55, 1954.
 27. Moreira-Jacob M.: J. gen. Microbiol. 14, 268, 1956.
 28. Nyman O. H.: Acta path. microbiol. scand. suppl. 83, 1, 1949.
 29. Ouchterlony O.: Acta path. microbiol. scand. 32, 2, 1953.
 30. Ouchterlony O.: Progr. Allergy 5, 1, 1958.
 31. Ouchterlony O.: Proc. Symp. Helv. New Brunsvik 1960.
 32. Pakula R.: Paciorkowce PZWL, Warszawa 1958.
 33. Pleceas P.: Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. 214, 130, 1970.
 34. Post F. J., Foster F. J.: J. Invertebr. Path. 7, 22, 1965.
 35. Sharpe M. E., Fewins B. G.: J. gen. Microbiol. 23, 621, 1960.
 36. Shattock P. M. F.: J. gen. Microbiol. 3, 80, 1949.
 37. Shattock P. M. F.: Chemical and biological hazards in foods. Iowa State Univ. 303, 1962.
 38. Shattock P. M. F., Smith D. C.: J. gen. Microbiol. 31, 4, 1963.
 39. Skadhauge K.: Studies on enterococci with special reference to the serological properties. E. Munksgaards F. Copenhagen 1950.
 40. Wicken A. J., Baddiley J.: Biochem. J. 87, 54, 1963.
 41. Wicken A. J., Elliott S. D., Baddiley J.: J. gen. Microbiol. 31, 231, 1963.

Adres autora: dr Zdzisław Gliński, Lublin, ul. Akademicka 12.

Глиньски З. — Исследования свойств и антигенной структуры *Streptococcus pluton*. IV. Антигенная структура *Streptococcus pluton*.

Исследованиями подвергли 40 местных и 3 стандартных (M, S, Z) штаммов *Str. pluton*, 5 штаммов *Str. faecalis*, 1 штамм *Str. bovis* и по 1 штамму стрептококков из серологических групп А—О. Гипериммунные сыворотки для штаммов *Str. pluton* и *Str. faecalis* приготовили на кроликах впрыскивая им сороккратно замораживаемую и отмораживаемую суспензию бактерий. Применяли: реакцию диффузионной преципитации в агаре, иммуоэлектрофорез, реакции агглютинации, реакцию пробирочной преципитации и реакцию перекрестной адсорбции антител по Кастеллани. Серологически активные экстракты приготавливали по методу Lancefield, Fuller и Pleceas, а также путем замораживания и последующего отмораживания бактерий в воде. Для определения характера отдельных фракций подвергали их действию температуры (121° — 15 мин.) пещина и нагрив-периодата.

Установили, что в бактериях исследованных штаммов *Str. pluton* выступают 3—5 серологически активных антигенных фракций. Фракции I, II и IV имеют характер полисахаридов или полисахаридобелковых комплексов, а фракции III и V — белков. Штаммы *Str. pluton*, *Str. faecalis* и *Str. bovis* имеют общие антигенные фракции, I и II. Присутствие этих компонентов во всех штаммах *Str. pluton* обуславливает их принадлежность к серологической группе D (по Lancefield). Исследованные штаммы *Str. pluton* содержали также термостабильный полусахаридный компонент (компонент IV), который определяет видовую и типовую специфичность этой бактерий. На основании термостабильных антигенов III и V и термостабильную IV исследованные штаммы *Str. pluton* можно разделить на три серологические типы.

Gliński Z. — Investigations on the properties and antigenic structure of *Streptococcus pluton*. IV. Antigenic structure of *Str. pluton*.

The investigations on the antigenic structure of *Str. pluton* were carried out on forty native and three standard (M, S, Z) strains. For comparison there were also included five strains of *Str. faecalis*, one strain of *Str. bovis*, and one strain from each serological group of streptococci beginning from A up to O. Hyperimmunized sera against *Str. pluton* and *Str. faecalis* were produced on rabbits by immunization with the suspension of bacteria after 40 times freezing and thawing.

The investigations were done by means of double agar diffusion test and immunoelectrophoresis, agglutination test, tube precipitation test, and cross absorption test acc. to Castellani. There were used serologically active extracts acc. to Lancefield, Fuller, Pleceas, and water extracts of bacteria after prior freezing and thawing. In order to determine the characteristics of individual fractions they were heated (121°C — 15 min.), subjected to the action of pepsin, trypsin and NaJO₄. It was found that *Str. pluton* consisted of 3—5 serologically active fractions. The fractions I, II and IV possessed the properties of polysaccharides or complexes of polysaccharoproteins, and the fractions III and V — the character of protein. The strains of *Str. pluton*, *Str. faecalis* and *Str. bovis* had two common antigenic fractions, i. e. I and II. The presence of these components in all the strains of *Str. pluton* allowed to include them to group D according to Lancefield. The examined strains of *Str. pluton* possessed also a thermostable polysaccharide component IV which confer species and type specificity. On the strength of the presence of the thermostable antigens III and V, and thermostable IV in the strains under study, they can be included to one out of three serological types.

FLATLANDSMO K.: Wolny glicerol w plazmie krów. (Free glycerol in the plasma of cows). Acta. vet. Scand., 12, 489—495, 1971 (4).

Oznaczono poziom wolnego glicerolu w 173 próbkach plazmy pobranych od 21 krów z dwóch różnych farm. Poziom glicerolu oznaczono enzymatycznie wg zmodyfikowanej metody Eggstein i Kreutz określając ilość NAD spektrofotometrycznie przy długości fali 334 nm. Poziom wolnego glicerolu w plazmie osiągał najwyższe stężenia wynoszące 110 ± 42 μmola/l w okresie pierwszych dwóch dni po porodzie. W okresie 3—45 dni po porodzie stężenie wolnego glicerolu w plazmie krów z jednej farmy wynosiło 51 ± 19 μmola/l, z drugiej farmy 82 ± 21 μmola/l. Ponieważ na obu farmach krowy znajdowały się w identycznych warunkach środowiskowych i były żywione identycznie, zaobserwowane różnice w stężeniu wolnego glicerolu, statystycznie znaczne mogły wiązać się jedynie z wydajnością mleka. Krowy u których poziom glicerolu w plazmie był wysoki produkowały większe ilości mleka (29,4 kg, 4,0% tłuszczu), z farmy drugiej dawały 21,1 kg mleka przy procencie tłuszczu 4,0.

AULIE A., ASTRUP H. P., NEDKVINTE J. J., VELLE W.: Niezestryfikowane kwasy tłuszczowe surowicy i glicerol plazmy jako wskaźniki uruchomienia tłuszczu u ciężarnych owiec poddanych stressowi zimna. (Serum non-esterified fatty acids and plasma glycerol as indicators of fat mobilization in pregnant sheep subjected to cold stress). Acta. vet. Scand., 12, 496—503, 1971 (4).

15 ciężarnych owiec przebywało w otwartej szopie przez cały okres ciąży. Przez cały czas owce były karmione sianem i były strzyżone na wiosnę w jesieni. Badania wykazały, że w pierwszych dwóch miesiącach ciąży waga ciała, poziom niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych w surowicy (NEFA) oraz poziom glicerolu w plazmie (PG) nie ulegały znaczącym zmianom. Poziom NEFA wahał się w granicach 430 ± 175 milirówn/l surowicy, PG 39 ± 19 milirówn/l plazmy. Zaraz po strzyżeniu, która zbiega się ze spadkiem temperatury otoczenia stężenie NEFA zwiększyło się o 450%, PG o 340%. W stosunku do wartości wyjściowych. Ten wzrost przemawiał za silnym uczynnieniem tłuszczów w organizmie pod działaniem stressowym zimna. Zwiększenie metabolizmu nie odbywało się bowiem kosztem zwiększenia podaży paszy.