

JERZY RZEDZICKI

Studia nad zróżnicowaniem serologicznym szczepów *Mycobacterium avium* występujących w Polsce.

II. Analiza struktury antygenowej *M. avium*

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii AR w Lublinie

Dyrektor: doc. dr S. WOŁOSZYN

Klasyfikacja serologiczna gatunku *M. avium* od dość dawna wzbudzała zainteresowanie wielu badaczy. Zagadnieniem tym w ostatnich latach zajmowali się między innymi Schaefer (20, 22), Saito i Kubica (19), Anz i Meissner (1), Stanford i Muser (23), Marks i Jenkins (11), Zórawski (28). Badania prowadzone najczęściej w oparciu o odczyn aglutynacji, miały na celu ustalenie ilości grup serologicznych w obrębie gatunku *M. avium*, bądź wykazanie różnic w aktywności serologicznej między *M. avium* a prątkami atypowymi, głównie *M. intracellulare*.

Spośród badań dotyczących struktury antygenowej różnych gatunków prątków kwasoodpornych, tylko nieliczne obejmowały *M. avium*. Z badań tych na podkreślenie zasługują prace Jensen i wsp. (5, 6) oraz Kubina i wsp. (7). Jensen i wsp. (5, 6) w oparciu o odczyn Schultza-Dale'a podzielili prątki kwasoodporne na siedem grup serologicznych, stwierdzając przy tym istnienie jednej grupy *M. avium* i jednej grupy „*avium-like*”. Najprawdopodobniej były to prątki *M. avium* i *M. intracellulare*. Kubin i wsp. (7) wykazali w odczynie precipitacji dyfuzyjnej, że ekstrakty komórkowe *M. avium* zawierają w swoim składzie do ośmiu frakcji antygenowych. Jednakże autorzy ci nie zajmowali się dokładniej precipitynogenami tego prątka. Przedmiotem badań tych autorów było wzajemne pokrewieństwo *M. avium* i *M. intracellulare* i dlatego ograniczyli się oni do analizy frakcji antygenowych wspólnych dla obu gatunków prątków.

Obecność od 4 do 8 a nawet 9 precipitynogenów w wyciągach komórek *M. avium* wykazał również Tuboly (25, 26) przy badaniu wzajemnego pokrewieństwa między różnymi gatunkami prątków. Przedmiotem badań były również precipitynogeny filtratów *M. avium* (14). Jednakże wcześniejsze badania Castelnovo i wsp. (2) wykazały małą stabilność struktury antygenowej filtratów *M. avium*, co wskazuje, że badania te nie mogą stanowić wystarczającej podstawy do klasyfikacji tych drobnoustrojów.

Celem podjętych badań własnych było określenie struktury antygenowej *M. avium* w oparciu o szczepy izolowane na terenie Polski oraz szczepy wzorcowe reprezentujące typy serologiczne ustalone przez Schaefera oraz Marksa i Jenkinsa w Wielkiej Brytanii. Poznanie struk-

tury antygenowej szczepów *M. avium* występujących w Polsce winno stworzyć możliwość opracowania skuteczniejszych metod serologicznej diagnostyki gruźlicy, a także ułatwić zróżnicowanie prątków atypowych izolowanych od ludzi i zwierząt, określanych jako atypowe nie-fotochromogeny (grupa III).

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 48 szczepów *M. avium*. Numery szczepów oraz źródła ich pochodzenia podano w tab. 1. Szczepy użyte do ba-

Tab.1. Szczepy *M. avium* użyte do badań

Szczep	Źródło pochodzenia
<i>M. avium</i> 1(15769), 2(15918), 3(15919)	Public Health Laboratory Service - GB
<i>M. avium</i> 7	Instytut Weterynarii - Putawy
<i>M. avium</i> 13 (Kirchberg), 16 (Kr-Pt)	Instytut Gruźlicy - Warszawa
<i>M. avium</i> 8, 17	Katedra Higieny Prod. Zwierz. WSR - Lublin
<i>M. avium</i> 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51.	Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych WSR - Lublin

dań przechowywano na podłożu Loewensteina w chłodni w temp. +4°C. Przed użyciem do badań szczepy laboratoryjne (nr: 1, 2, 3, 7, 13, 16, 8, 17), przepasażowano przez kury, które zakażono dożylnie dawką 5 mg prątków zawieszonych w 0,85% NaCl. Metody namnażania prątków podano w pracy wcześniejszej (18). Masę bakteryjną po 3-krotnym przepłukaniu buforowanym roztworem 0,85% NaCl, w celu dokładnego odwodnienia przemywano pięciokrotnie w odstępach kilkugodzinnych acetonem ochłodzonym do temp. 0°C. Aceton odparowywano w chłodni w temp. +8°C.

Wyciągi antygenowe. Do badań serologicznych użyto ekstraktów komórkowych, przygotowanych z poszczególnych szczepów *M. avium*. Odwodnioną acetonem suchą masę prątków rozcierano w moździerzu i zawieszano w buforowanym roztworze 0,85% NaCl w ilości 30 mg/ml, a następnie poddawano 30-krotnemu kolejnemu zamrażaniu w temp. -20°C i rozmrażaniu w temp. +37°C. Dla dokładniejszej homogenizacji zawieszinę prątków wytrząsano z perełkami szklanymi pięciokrotnie przez 10 minut w temp. +4°C. W przygotowanych zawiesinach oznaczano ilość białka metodą Lowry (10) a następnie drogą odpowiednich rozcieńczeń doprowadzano koncentrację białka we wszystkich antygenach do 10 mg/ml antygenu.

Surowice odpornościowe. W badaniach wstępnych wykazano, że surowice najbardziej aktywne w odczynach precipitacji agarowej i immunoelektroforezy uzyskuje się poprzez hiperimmunizację królików zawieszoną suchą masę prątków w niekompletnym adiuwancie Freundta. Do uodporniania królików wysuszone prątki rozcierano z adiuwantem w stosun-

ku 30 mg suchej masy prątków na 1 ml adiuwantu. Królikom wstrzykiwano zawiesinę antygenu równocześnie domięśniowo i podskórnie w ilości po 0,5 ml, trzykrotnie w odstępach jednego tygodnia. Króliki skrawiano przez punkcję serca. Najwyższe miana w odczynie precypitacji uzyskiwano z surowicami pobranymi po 3 tygodniach od ostatniej iniekcji antygenem. Surowice przechowywano w stanie zliofilizowanym i po rozpuszczeniu *ex tempore* stosowano do badań nie dodając żadnych środków konserwujących. Najbardziej ewidentne reakcje otrzymywano przy użyciu surowic nierozcieńczonych.

Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wykonano wg metody Ouchterlony'ego (15, 16), przy użyciu agaru firmy Difco w stężeniu 1,2%. Grubość warstwy żelu w układach podanych na ryc. 1 wynosiła 4 mm. Optymalne odległości pomiędzy basenikami z antygenem i surowicą wynosiły 7 mm.

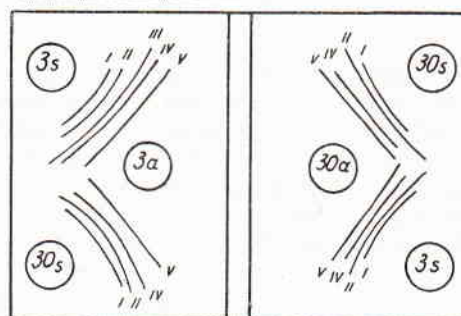
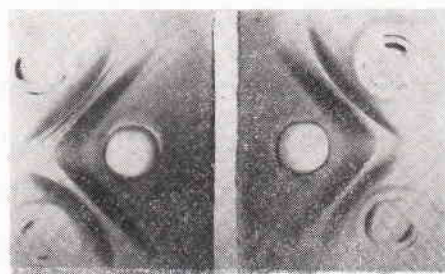
Analizę immunoelektroforetyczną wykonano w żelu agarowym wg metody Grabara i Williamsa (4). W odczynie immunoelektroforezy stosowano agar firmy Difco w stężeniu 2,0%, przygotowany na buforze weonalowym o pH 8,2 i sile jonowej 0,1. Grubość warstwy żelu wynosiła 4 mm a optymalny czas rozdzielu 1 godz. przy gradiencie napięcia 3—3,5 V/cm długości szkiełka.

Przed rozpoczęciem właściwych badań ustalono, że optymalny stosunek ilościowy surowicy do antygenu w odczynie precypitacji wynosił 0,2 do 0,1, natomiast w odczynie immunoelektroforezy 0,45 do 0,1. Wyniki obu odczynów odczytywano w świetle przechodzącym po 18, 24, 36, 72 i 96 godz. od nastawienia próby.

Odczyn absorpcji surowic wg Castellaniego. W odczynie wysycania surowic posługiwano się dokładnie zhomogenizowaną suchą masą bakteryjną. Wysycane surowice po dodaniu antygenu przechowywano przez 24 godz. w temp. +4° wstrząsając kilkakrotnie, a następnie przez 2 godz. w temp. +37°C wstrząsając co 15 minut. Wysycenie surowic sprawdzano wstępnie w odczynie precypitacji pierścieniowej a następnie w odczynie precypitacji w żelu agarowym wobec ekstraktu szczepu użytego do wysycania. Za surowice wysycane uważano te, które w żadnym z odczynów nie wykazywały nawet reakcji śladowych z antygenem użytym do absorpcji. Surowice tak wysycane były stosowane w odczynie immunoelektroforezy.

Wyniki

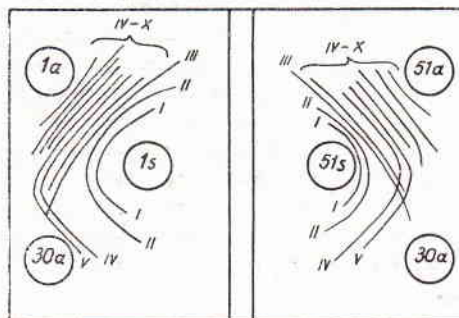
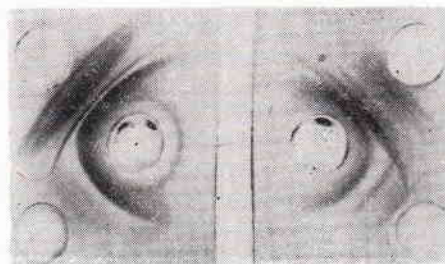
Badania w odczynach precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i immunoelektroforezy przeprowadzono w dwóch etapach. Najpierw wykonano odczyny krzyżowe z 14 szczepami *M. avium* (3 szczepy reprezentowały serotypy *M. avium* I i *M. avium* II Schaefera, oraz *M. avium* III Marksa i Jenkinsa — pozostałe 11 szczepów — 10, 13, 14, 16, 18, 20, 30, 32, 35, 39 i 51 wybrano losowo z ogólnej ich liczby — 45). Wyciągi antygenowe tych szczepów wstępnie przebadano w odczynie precypitacji dyfuzyjnej. W trakcie badań stwierdzono, że wyciągi antygenowe wszystkich szczepów wytwarzają co najmniej 4 linie precypitacyjne (ryc. 1). Wiele z tych szczepów, poza liniami łatwo dającymi się zidentyfikować (linie I, II, III, IV) wytwarzały kompleksy linii (około 3 do 5) pojawiające się w tym samym czasie (36—48 godzin), których nie można było wyraźnie różnicować (ryc. 2). Ze względu na to, że odczyn precypitacji agarowej nie pozwalał na dokładną identyfikację frakcji antygenowych przy szczepach wytwarzających większą liczbę linii pre-



Ryc. 1. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym szczepów *M. avium* 3 i 30 z surowicami homologicznymi i w reakcjach krzyżowych.
3s — surowica dla szczepu nr 3; 30s — surowica dla szczepu nr 30; 3a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 30; 30a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 30.

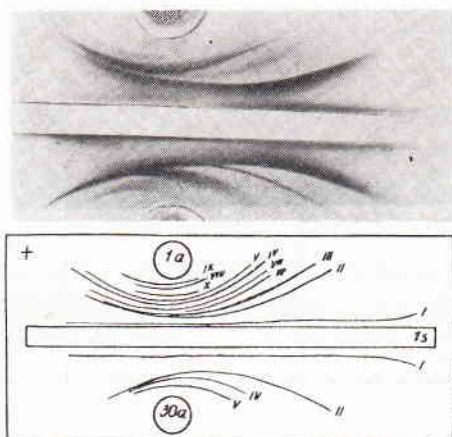
cypitacyjnych, właściwą analizę struktury antygenowej *M. avium* oparto na odczynie immunoelektroforezy. W odczynie tym uprzednie rozdzielanie wyciągów antygenowych w polu elektrycznym wydatnie ułatwiało analizę badanych frakcji antygenowych.

Analiza immunoelektroforetyczna wyciągów antygenowych badanych szczepów wykazała występowanie od 4 do 10 linii precypitacyjnych. Linia pierwsza (oznaczona I) poja-

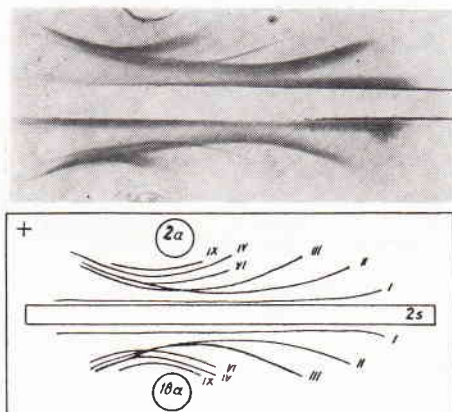


Ryc. 2. Odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym szczepów *M. avium* 1 i 30 z surowicą dla szczepu *M. avium* 1, oraz szczepów *M. avium* 51 i 30 z surowicą dla szczepu *M. avium* 51.
1a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 1; 30a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 30; 1s — surowica dla szczepu nr 1; 51s — surowica dla szczepu nr 51; 51a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 51; 30a — ekstrakt komórkowy szczepu nr 30.

wiała się najszybciej (po upływie 8—12 godzin od nastawienia odczynu) i jej większa część znajdowała się po stronie katody. Cechą charakterystyczną tej linii było umiejscowienie blisko basenika z surowicą nawet przy zwiększaniu odległości między basenami z antygenem i surowicą. Bardzo wyraźnie występowały także linie precypitacyjne II, III i IV (ryc. 3, 4, 5, i 6). Linie II i IV były przesunięte

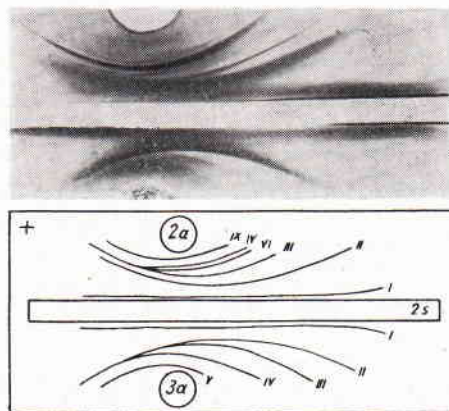


Ryc. 3. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 1 (1a) i 30 (30a) wywołane surowicą dla szczepu 1 (1s)

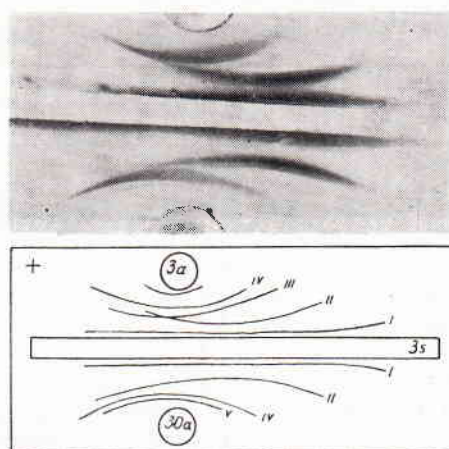


Ryc. 4. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 2 (2a) i 18 (18a) wywołane surowicą dla szczepu 2 (2s).

niemal całkowicie w kierunku katody, natomiast frakcja antygenowa, odpowiedzialna za tworzenie linii III, wykazywała tylko nieznaczoną ruchliwość w polu elektrycznym (linia III była umiejscowiona w zasadzie po obu stronach basenika z antygenem). Linie II, III i IV pojawiały się po upływie 18—36 godzin. Znacznie mniej intensywne linie precypitacyjne wytwarzały frakcje V, VI, VII, VIII, IX i X. Czas pojawiania się tych linii wahał się między 36 a 48 godzin od nastawienia odczynu. Kolejność pojawiania się poszczególnych linii precypitacyjnych została uwzględniona przy ich oznaczeniu cyframi rzymskimi. Dokładne ułożenie



Ryc. 5. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 2 (2a) i 3 (3a) wywołane surowicą dla szczepu 2 (2s)



Ryc. 6. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 3 (3a) i 30 (30a) wywołane surowicą dla szczepu 3 (3s).

wszystkich linii precypitacyjnych przedstawiono na fotografiach immunoelektroforegramów, zaś ich oznakowanie na schematach (ryc. 3—6).

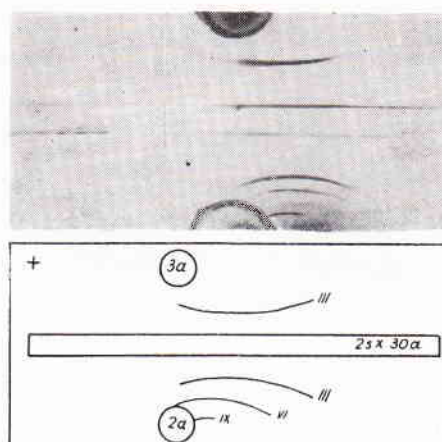
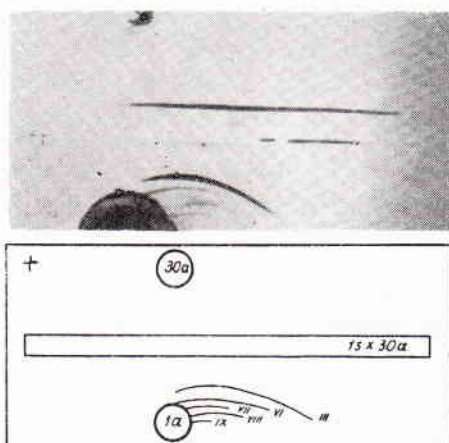
Analiza immunoelektroforetyczna wyciągów antygenowych badanych szczepów wykonana z surowicami homologicznymi oraz w odczynach krzyżowych wykazała zróżnicowanie tych szczepów na cztery grupy serologiczne. Najbogatszy skład antygenowy wykazywały szczepy grupy A, które z surowicami homologicznymi wytwarzały 10 linii (ryc. 3), najuboższe natomiast były szczepy grupy D, które z wszystkimi surowicami wytwarzały jedynie 4 linie (I, II, IV i V — ryc. 6). Pozostałe grupy B i C tworzyły odpowiednio 6 i 5 linii precypitacyjnych (z surowicami homologicznymi). Spośród 14 badanych szczepów do grupy A zaliczono 3 (1, 20, 51); do grupy B — 5 (2, 14, 18, 32, 39); do grupy C — 4 (3, 10, 13, 35) oraz do grupy D — 2 szczepy (30 i 16). Szczegółowe wyniki analizy immunoelektroforetycznej tych szczepów zebrano w tab. 2.

Tab. 2. Rodzaje frakcji antygenowych stwierdzonych w reakcjach krzyżowych w odczynie immunoelektroforezy

Antygeny	S u r o w i c e													
	1	20	51	2	14	18	32	39	3	10	13	35	30	16
1	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V
20	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V
51	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V
2	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
14	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
18	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
32	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
39	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV, V, VI, IX	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
3	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
10	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
13	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
35	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV, V	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, III, IV	I, II, IV	I, II, IV, V
30	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V
16	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V	I, II, IV, V

Najistotniejsze różnice między poszczególnymi grupami polegały na braku określonych linii precipitacyjnych: i tak szczepy grupy B nie wytwarzały, nawet z surowicami homologicznymi, linii V, VII, VIII i X (ryc. 4, 5), w grupie C w porównaniu do grupy A brak było linii od VI do X (ryc. 6) natomiast występowała tutaj linia V której nie stwierdzano w grupie B. Szczepy grupy D różniły się od wszystkich pozostałych brakiem jednej z podstawowych linii a mianowicie linii III, a zawierały jedynie linie I, II, IV, V.

Celem potwierdzenia zaobserwowanych różnic w strukturze antygenowej badanych szczepów, przeprowadzono kontrolne badania z użyciem surowic absorbowanych (ryc. 7—10). Do kompletnego wysycenia surowic antygenami homologicznymi potrzeba było użyć od 50 do 75 mg

Ryc. 8. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 3 (3a) i 2 (2a) wywołane surowicą dla szczepu 2 absorbowaną szczepem 30 (25 x 30α).Ryc. 7. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktu komórkowego szczepu *M. avium* 1 (1a) wywołane surowicą dla szczepu 1 absorbowaną szczepem 30 (15 x 30α).

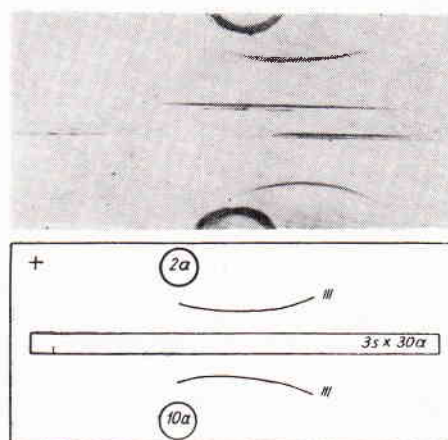
homogenizowanej masy bakteryjnej. Znaczne różnice ilościowe obserwowano przy wysycaniu surowic grupy A antygenami grupy D oraz grupy C (2—3 jednostek absorbacyjnych), nie mniej jednak możliwe było całkowite wysycenie w odniesieniu do antygeny użytego do absorpcji. W obrębie poszczególnych grup wykazanych uprzednio w odczynach z surowicami nieabsorbowanymi stwierdzano całkowite wysycenie surowic, stąd też w tab. 3 podano wyniki odczynu immunoelektroforezy jedynie z surowicami absorbowanymi reprezentującymi poszczególne grupy z uwzględnieniem wyciągów antygenowych wszystkich badanych w tej części pracy szczepów. Jak wynika z tab. 3, odczyn absorpcji w zasadzie potwierdził wykazane uprzednio różnice antygenowe, występujące w obrębie 14

Tab. 3. Wyniki odczynu immunoelektroforezy z surowicami absorbowanymi

Antygeny	Surowica 1				Surowica 2				Surowica 3				Surowica 30			
	szczepki użyte do wysycania															
	1	2	3	30	1	2	3	30	1	2	3	30	1	2	3	30
1	—	V, VII, VIII, IX	VI, VII, VIII, IX	III, VI, VII, VIII, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	V	—	III	—	V	—	—
20	—	V, VII, VIII, IX	VI, VII, VIII, IX	III, VI, VII, VIII, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	V	—	III	—	V	—	—
51	—	V, VII, VIII, IX	VI, VII, VIII, IX	III, VI, VII, VIII, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	V	—	III	—	V	—	—
2	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	—	III	—	—	—	—
14	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	—	III	—	—	—	—
18	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	—	III	—	—	—	—
32	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	—	III	—	—	—	—
39	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	VI, IX	III, VI, IX	—	—	—	III	—	—	—	—
3	—	V	—	III	—	—	—	III	—	V	—	III	—	V	—	—
10	—	V	—	III	—	—	—	III	—	V	—	III	—	V	—	—
13	—	V	—	III	—	—	—	III	—	V	—	III	—	V	—	—
35	—	V	—	III	—	—	—	III	—	V	—	III	—	V	—	—
30	—	V	—	—	—	—	—	—	—	V	—	—	—	V	—	—
16	—	V	—	—	—	—	—	—	—	V	—	—	—	V	—	—

szczepów *M. avium*. Zanotowano jedynie, że linia X występująca w szczepach grupy A zniknęła w czasie absorpcji pomimo, że szczepki używane do wysycania nie wykazały jej obecności.

W drugiej części pracy przebadano dalszych 34 szczepów tego prątki. Badania były prowadzone w odczynie immunoelektroforezy przy użyciu surowic swoistych dla szczepów reprezentujących poszczególne grupy (w odczynach jednostronnych.) W celu łatwiejszej interpretacji uzyskiwanych wyników, prowadzono równolegle badania z surowicami przed i po absorpcji. Łączne wyniki klasyfikacji serologicznej badanych szczepów *M. avium* w oparciu o ich strukturę antygenową ujęto w tab. 4. Na

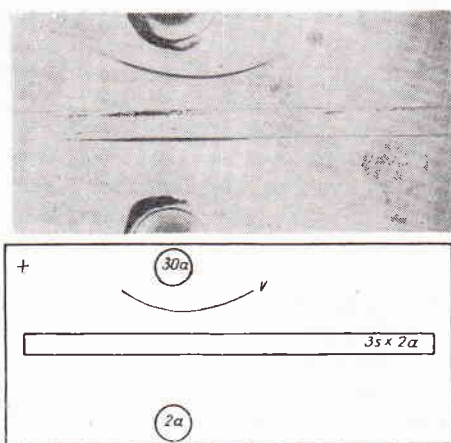


Ryc. 10. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktów komórkowych szczepów *M. avium* 2 (2a) i 10 (10a) wywołane surowicą dla szczepu 3 absorbowaną szczepem 30 (3s x 30a).

ogólną liczbę 48 badanych szczepów, do grupy A zaliczono 7, do grupy B — 21, do grupy C — 15 i do grupy D — 5 szczepów.

Omówienie wyników

W badaniach wcześniejszych nad antygenami prątków kwasoopornych wykorzystywany był odczyn wiązania dopełniacza (13, 17, 24). W czynionych ostatnio próbach klasyfikacji prątków kwasoopornych Marks i Jenkins (11), Matsui i Kawanishi (12), Saito i Kubica (19), Schaefer (20, 21) oraz Żórawski (28) stosowali odczyn aglutynacyjny. Jednakże odczyn ten są bardziej przydatne do określenia stopnia aktywności serologicznej badanych ekstraktów w przypadku odczynu wiązania dopełniacza lub zawiesin antygenowych w przypadku odczynu aglutynacji.



Ryc. 9. Widmo immunoelektroforetyczne ekstraktu komórkowego szczepu *M. avium* 30 (30a) wywołane surowicą dla szczepu 3 absorbowaną szczepem 2 (3s x 2a).

Tab. 4. Frakcje antygenowe szczepów *M. avium* stwierdzone w odczynie immunoelektroforezy

Szczepy	Frakcje antygenowe									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

W badaniach prątków kwasoopornych odczyn aglutynacji nie ma również zastosowania wówczas gdy szczepy bakteryjne nie dają jednolitych zawiesin w roztworach wodnych.

Do badań nad określeniem rodzaju i liczby serologicznie czynnych składników antygenowych, najbardziej przydatne okazały się odczyn precypitacji dyfuzyjnej i immunoelektroforezy. Wysoką przydatność tych odczynów serologicznych do analizy składników antygenowych zawartych w komórce prątków kwasoopornych wykazali Castelnuovo i Morellini (3) oraz Lind (9). W odczynie precypitacji dyfuzyjnej, a szczególnie w odczynie immunoelektroforezy można wykazać najbardziej pełny obraz składu antygenowego, co pozwala na dokładniejsze niż w innych odczynach serologicznych zróżnicowanie badanych ekstraktów komórkowych (7). Stąd też w badaniach własnych, w celu określenia stopnia powinowactwa oraz różnic antygenowych między szczepami *M. avium*, wykorzystano odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i immunoelektroforezy przy użyciu surowic nieabsorbowanych oraz surowic absorbowanych.

Dla uzyskania od królików surowic aktywnych w odczynach precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i w odczynie immunoelektroforezy, wypróbowano różne metody immunizacji. W badaniach wstępnych wykazano, że najbardziej przydatne w tych odczynach są surowice uzyskane drogą równoczesnej immunizacji podskórnej i domięśniowej suchej masy prątków w niekompletnym adjuwancie Freundta. Przy immunizacji dożylniej uzyskiwano natomiast surowice szczególnie aktywne w odczynach hemaglutynacji pośredniej i aglutynacji.

Użycie w badaniach własnych ekstraktu antygenowego, uzyskanego przez rozbicie komórki bakteryjnej drogą kolejnego zamrażania i rozmrażania, winno zapewnić bardziej zbliżony do naturalnego skład antygenowy badanych wyciągów niż przy zastosowaniu metod ekstrakcji chemicznej.

Przyjmując, że każda linia precypitacyjna odpowiada odrębnej frakcji antygenowej, w badaniach własnych stwierdzono, że szczepy *M. avium* zawierają w swoim składzie od 4 do 9 komponent antygenowych. Stwierdzona ilość precypitynogenów jest najbardziej zbliżona z wcześniejszymi spostrzeżeniami Tuboy'ego (26) oraz Kubina i wsp. (7). Stwierdzenie przez Linda (8, 9) siedmiu komponent, a przez Żórawskiego (27) czterech składników antygenowych w układach precypitacyjnych *M. avium* wskazuje, że autorzy ci, najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą liczbę badanych szczepów, nie mieli możliwości poznania pełnego składu antygenowego tego prątka. Przedmiotem ich zainteresowań były badania nad pokrewieństwem antygenowym różnych gatunków prątków, a nie struktura antygenowa *M. avium*.

W badaniach własnych, najbogatszy skład antygenowy reprezentowała grupa A, do której należało 7 szczepów (14, 7%). Grupa ta zawierała wszystkie komponenty antygenowe od I do IX. Szczepy najliczniejszej grupy serologicznej, oznaczonej w tej części badań jako grupa B, zawierały sześć składników antygenowych: I, II, III, IV, VI i IX. W skład tej grupy wchodziło 21 szczepów, co stanowi 43,7%. Nieco uboższy skład antygenowy reprezentowała grupa C. W jej składzie antygenowym wykazano obecność pięciu komponent antygenowych: I, II, III, IV i V. Była to druga pod względem liczebności grupa serologiczna, zaliczono do niej 15 szczepów — 31,2%. Najuboższą strukturę antygenową posiadały szczepy reprezentujące najmniej liczebną grupę D. Ekstrakty komórkowe szczepów tej grupy zawierały w swoim składzie tylko antygeny I, II, IV i V. Do grupy D należało 5 szczepów, co stanowi 10,4% wszystkich szczepów badanych (tab. 4).

Przy określaniu składu antygenowego ekstraktów komórkowych badanych szczepów *M. avium* uwzględniano nie tylko ułożenie linii w odczynie immunoelektroforezy dla posz-

czególnych komponent antygenowych ale głównie wyniki uzyskiwane w odczynie absorpcji surowic (tab. 3, ryc. 7—10). Stąd też frakcji X którą stwierdzono w trzech szczepach grupy A w odczynie immunoelektroforezy z surowicami nieabsorbowanymi nie traktowano jako odrębnej komponenty antygenowej, ponieważ nie można było wykazać jej obecności po wysyceniu surowic (ryc. 7, 8).

Włączenie do badań szczepów reprezentujących serotyp *M. avium* I i *M. avium* II Schaefera oraz serotyp III Marksa i Jenkinsa i zaliczenie tych szczepów do trzech różnych grup serologicznych (A, B i C) stanowi z jednej strony potwierdzenie zróżnicowania antygenowego tego gatunku prątków, z drugiej zaś strony wskazuje na wysoką przydatność zastosowanych metod w klasyfikacji serologicznej szczepów *M. avium*. Użycie odczynu immunoelektroforezy oraz ekstraktów komórkowych, pozwoliło również na wykazanie istnienia czwartej grupy serologicznej. Struktura antygenowa tej grupy szczepów wskazuje wyraźnie, że jest to najprawdopodobniej nowy typ serologiczny, różny od opisanych uprzednio serotypów *M. avium* I, *M. avium* II i *M. avium* III. Szczepy tej grupy nie zawierają w swoim składzie frakcji antygenowej III, która była jedną z podstawowych komponent struktury antygenowej pozostałych grup prątków. Na istnienie tej grupy serologicznej wskazywałyby badania Norlina (14) oraz Kubina i wsp. (7). Autorzy ci wykazali, że precypitynogen e (najprawdopodobniej analogiczny z frakcją III) nie występuje w niektórych szczepach *M. avium*. Jednakże autorzy ci, badając pokrewieństwa międzygatunkowe, nie dokonali bliższej analizy antygenów *M. avium*.

Wnioski

1. W oparciu o metodę immunoelektroforezy wykazano, że ekstrakty komórkowe *M. avium* uzyskane przez kolejne zamrażanie i rozmrażanie zawierają w swoim składzie od 4 do 9 frakcji antygenowych. Na ich odrębność wskazywały również wyniki uzyskane przy użyciu surowic absorbowanych.

2. Analiza struktury antygenowej przeprowadzona przy użyciu odczynu immunoelektroforezy pozwoliła na podział badanych szczepów *M. avium* na cztery grupy serologiczne (A, B, C i D).

3. Szczepy *M. avium* wyizolowane w Polsce zaliczone do grup A, B i C zawierały analogiczne frakcje antygenowe jak szczepy reprezentujące serotypy *M. avium* I i *M. avium* II Schaefera, oraz *M. avium* III Marksa i Jenkinsa.

4. Budowa antygenowa szczepów zaliczonych do grupy D wskazuje, że stanowią one najprawdopodobniej nie wyodrębniany dotychczas typ serologiczny *M. avium*.

Piśmiennictwo

1. Anz W., Meissner G.: Prax. Pneumol. 23, 221, 1970.
2. Castelnuevo G., Duncan M. E., Bellezza G.: Tubercle, Lond. 45, 246, 1964.
3. Castelnuevo G., Morellini M.: Annali. Inst. Forlanini 20, 180, 1960.
4. Grabar P., Williams C. A.: Biochim. biophys. Acta 17, 67, 1955.
5. Jensen K. A., Kler I., Lundberg L.: Acta path. microbiol. scand. 61, 619, 1964.
6. Jensen K. A., Kler I., Lundberg L.: Acta path. microbiol. scand. 66, 79, 1966.
7. Kubin M., Lind A., Matuskova E., Norlin M.: Acta path. microbiol. scand. s. B 79, 850, 1971.
8. Ling A.: Int. Arch. Allergy 14, 264, 1959.
9. Lind A.: Int. Arch. Allergy 17, 300, 1960.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. V.: J. biol. Chem. 193, 265, 1951.
11. Marks J., Jenkins P. A.: Tubercle, Lond. 50, 394, 1969.
12. Matsui K., Kawamishi Y.: Natn. Inst. Anim. Hlth Qt. Tokyo, 11, 53, 1971.
13. Mikulaszek E., Kwapiński J.: Gruźlica 22, 246, 1954.
14. Norlin M.: Bull. Un. Int. Tuberc. 36, 25, 1965.
15. Ouchterlony O.: Acta path. microbiol. scand. 32, 2, 1953.
16. Ouchterlony O.: Prog. Allergy 5, 1, 1958.
17. Rotach F.: Annls. Inst. Pasteur, Paryż, 73, 71, 1947.
18. Rzedzicki J.: Medycyna Wet. 24, 532, 1963.
19. Saito H., Kubica G. P.: Am. Rev. resp. Dis. 98, 47, 1963.
20. Schaefer W. B.: Am. Rev. resp. Dis. 92, 85, 1965.
21. Schaefer W. B.: Am. Rev. resp. Dis. 96, 1165, 1967.
22. Schaefer W. B.: Am. Rev. resp. Dis. 97, 18, 1968.
23. Stanford J. L., Muser R.: Tubercle, Lond. 50, 1969, suppl. 80.
24. Togunova A. I., Karsanova A. V., Stiepanczenko G. I.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 5, 95, 1959.
25. Tuboly S.: Magy. Allatorv. Lap. 20, 49, 1965.
26. Tuboly S.: Magy. Allatorv. Lap. 22, 212, 1967.
27. Zórawski C.: Medycyna Wet. 20, 150, 1966.
28. Zórawski C.: Sympozjum n.t. Atypowych mykobakterii. Wrocław, 52, 1972.

Adres autora: dr Jerzy Rzedzicki, Lublin, Akademicka 12.

Жедзицки Е. — Исследования по серологическим разностям выступающих в Польше штаммов *Mycobacterium avium*. II. Анализ антигенной структуры *M. avium*.

Исследованиям подвергли 45 штаммов выделенных в Польше из случаев туберкулеза органов кур и 3 образцовые штаммы соответствующие серотипам по Schaefer и по Marks и Jenkins. Применяли иммуноэлектрофоретический метод по Grabar и Williams. Экстракты клеток приготавливали при помощи замораживания и отмораживания. Иммунные сыворотки получали от кроликов, которых иммунизировали сухой массой бактерий взвешенной в неполном адьюванте по Freund't'a.

Иммуноэлектрофоретическим анализом антигенных экстрактов исследованных штаммов с гомологическими сыворотками и в перекрестных реакциях установили наличие четырех серологических групп (A, B, C и D). Самую богатую антигенную структуру показали штаммы группы A, которые с гомологическими сыворотками создавали 9 линий; самые бедные — штаммы группы D, образующие только 4 преципитационные линии. Штаммы группы B и C создавали 6 и 5 линий. Полученные результаты были подтверждены методом абсорбции сывороток. Местные штаммы *M. avium* групп A, B и C проявили аналогическую антигенную структуру как образцовые штаммы серологических типов *M. avium* I и *M. avium* II Schaefer и *M. avium* III Marks и Jenkins. Штаммы группы D являются по всей вероятности новым, необособленным до сего времени серотипом.

Из 48 исследованных штаммов автор причисляет: к группе A — 7 штаммов (14,7%), B — 21 штаммов (43,7%), C — 15 штаммов (31,2%) и к группе D — 5 штаммов (10,4%).

Rzedzicki J. — Studies on serological differentiation of *Mycobacterium avium* strains isolated in Poland. II. The analysis of antigenic structure of *Mycobacterium avium*.

The purpose of the work was to determine the antigenic structure of 45 strains of *Mycobacterium avium* isolated in Poland from the cases of organ tuberculosis in hens. In addition there were inclu-

ded three strains of *M. avium* representing three serological types determined by Schaefer and Marks, and Jenkins. The examinations were conducted on the basis of immunoelectrophoresis acc. to Grabar and Williams with the immune sera produced in rabbits and cell extracts derived by successive freezing and thawing. The rabbits were immunized with dried bacterial mass suspended in incomplete Freund's adjuvant. The investigated strains were divided into 4 serological groups (A, B, C and D) on the basis of immunoelectrophoretic analysis of the antigenic extracts and homological and heterological sera. The reachest antigenic composition there revealed the strains of A group, which produced 9 precipitation lines with the homologic sera; the poorest composition

there showed the strains from D group which gave only 4 precipitation arcs; the strains included to the B and C groups produced 6 or 5 precipitation lines. The findings were confirmed by the use of the absorbed specific sera. The strains of *M. avium* isolated in Poland and included to A, B and C groups showed the analogical antigenic structure as the strains of *M. avium* I and *M. avium* II acc. to Schaefer, and *M. avium* III acc. to Marks and Jenkins. The analysis of antigenic structure of the strains included to the group D indicated that the strains belonged probably to a new, serological type. Out of 48 strains examined 7 strains (14.7%) were included to group A, 21 (43.7%) to B group, 15 strains to C group (31.2%) and 5 strains (10.4%) to D group.

WITOLD GOLNIK, HENRYK PANUFNIK

Choroba Mareka u kurcząt typu broiler. Diagnostyka kliniczna i sekcyjna

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii AR w Warszawie

Dyrektor: prof. dr A. STRYSZAK

Choroba Mareka jest schorzeniem wirusowym drobiu występującym najczęściej u kurcząt i kur. Czynniki etiologiczny choroby został wyizolowany i zidentyfikowany w latach 1967 i 1968 (13, 18). Wirus choroby Mareka należy do grupy wirusów *Herpes B* i jeśli jest syntetyzowany w postaci wirionu niekompletnego lub jako genom odznacza się on ścisłym związaniem z komórką gospodarza (9, 12, 13, 18, 27, 34, 35). W zakażonym organizmie ptaka tworzą się również pełne wiriony posiadające osłonkę zewnętrzną, głównym choć nie jedynym miejscem ich syntezy jest nabłonek brodawek piór (8, 10, 20, 30). Stałe przyżyciowe złuszczenie się nabłonka a wraz z nim przechodzenie wirusa do środowiska sprawia, że choroba Mareka rozprzestrzenia się łatwo i szybko. Wirus syntetyzowany w skórze jest odporny na działanie czynników fizyko-chemicznych i może przeżywać w środowisku zewnętrznym przez okres od kilku tygodni do kilku miesięcy (4, 14, 31). Według ostatnich danych doświadczalnych zakażenie wirusem choroby Mareka nie rozprzestrzenia się za pośrednictwem jaj (1, 17, 28, 33). Następuje więc ono po wylęgu, a drogą wnikania wirusa do organizmu jest przede wszystkim układ oddechowy (32). Najbardziej wrażliwe na zakażenie są pisklęta, w miarę wzrostu ptaków ich podatność na infekcję zmniejsza się (2, 6, 24, 25, 33).

Choroba Mareka atakuje najczęściej kurczęta i kury lecz może występować także u innych gatunków ptaków domowych i wolno żyjących (3, 16). Jej przebieg warunkowany jest wieloma czynnikami a za najważniejsze z nich uznaje się obecnie: zjadliwość wirusa, drogę jego wprowadzenia, wiek ptaków w okresie zakażenia, oraz

wrażliwość genetyczną na proces nowotworowy. W zależności od zjadliwości wirusa i częściowo od pozostałych wyżej wymienionych czynników choroba Mareka może przebiegać w formie ostrej lub klasycznej. Ta ostatnia forma choroby znana jest od dawna, została ona opisana po raz pierwszy przez Mareka na Węgrzech w 1907 r. (cyt. za 6). Towarzyszą jej charakterystyczne objawy kliniczne w postaci porażeń kończyn dolnych, skrzydeł i szyi, zmian patologicznych w tęczówce i żrenicy oka oraz objawy ogólne będące wyrazem procesu chorobowego toczącego się w narządach wewnętrznych jamy ciała.

Dużo większe znaczenie w chwili obecnej ma choroba Mareka przebiegająca ostro. Liczne jej przypadki u kurcząt w wieku poniżej 10 tygodni życia obserwowano już w 1949 r. w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (5). Na terenie Wielkiej Brytanii Biggs i wsp. (7), stwierdzili chorobę Mareka u kurcząt w wieku od 6 do 12 tygodni życia, wprowadzając po raz pierwszy podział na formę ostrą i klasyczną choroby. Obecnie chorobę Mareka przebiegającą ostro obserwuje się prawie we wszystkich krajach świata w tym również w Polsce (11, 15). Występuje ona głównie u kurcząt wywołując największe straty gospodarcze w okresie między 10 a 20 tygodniem odchowu.

Celem naszej pracy było prześledzenie przebiegu choroby w ognisku naturalnego zakażenia, zanotowanie obserwowanych objawów klinicznych, zmian sekcyjnych oraz wykazanie strat gospodarczych powodowanych chorobą Mareka.

Obserwacje kliniczne

Obserwacją objęto stado 11240 szt. kurcząt typu broiler (White Rock x Cornish). Ptaki były żywione