

Kierownik: prof. dr Józef Parnas

Zjawisko współaglutynacji między pałeczkami bruceli i tularemii, pod wpływem surowic pochodzących od ludzi i zwierząt zakażonych bądź to brucelozą, bądź też tularemią, nie należą więc do rzadkości. Sprawa ta ma znaczenie teoretyczne (budowa antygenowa obu pałeczek) i praktyczne (diagnostyka tularemii i brucelozy). Należało zatem, wykonać szereg prób zlepných z surowicami anty-brucela i anty-tularemia, a także szereg współodczynów wiązania dopełniacza z antygenem brucelozowym i tularemijnym. Są to jedne z pierwszych prób wykorzystania odczynu

Tabela 1

Chory	Czas jaki upłynął od zachorowania na tularamię	<i>P. tularensis</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. melitensis</i>
B. T. S.	8 dni	20	640	1280
D. Z.	30 „	80	2560	—
W. 180	30 „	160	1280	2560
L. W.	—	160	2560	2560

wiązania dopełniacza do tego celu. Przeprowadziliśmy również próby z odczynem opsono-fagocytarnym oraz z odczynem brucelinowym i tularynowym.

MATERIAŁ BADAWCZY

Do analizy serologicznej użyte były następujące surowice: a) 18 surowic pochodzących od królików zakażonych brucelozą, b) 12 surowic pochodzących od ludzi chorych na brucelozę, c) 24 surowic pochodzących od bydła rogatego, zakażonego brucelozą, d) 5 surowic pochodzących od królików zakażonych pałeczkami bruceli i 5 surowic pochodzących od królików zakażonych pałeczkami tularemii.

Ze wszystkimi surowicami wykonano, poza odczynem zlepnym, odczyn wiązania dopełniacza; odczyn alergiczno-skórny z bruceliną PD i tularyną U wykonano na 10 królikach oraz na 60 ludziach. Odczyn opsono-fagocytarny wykonano u 18 królików.

METODYKA PRACY

Do odczynu zlepnego używano zawiesiny pałeczek bruceli w stanie zabitym o gęstości 10 mldr/ml.

W skład antygeny wchodziły szczepy pałeczek bruceli charakteryzujące się dużą zlepliwością.

Do aglutynacji w kierunku tularemii używano niejadliwego szczepu radzieckiego pałeczek tularemii, wyosobnionego ze szczepionki przeciw tularemii. Aglutynogen tularemijny jest żywy i posiada gęstość 8 mldr pałeczek w 1 ml.

Do odczynu wiązania dopełniacza w kierunku brucelozy używany był antygen uzyskany następującą metodą: Wybrane i sprawdzone szczepy bruceli posiewane są we flaszkach Roux, a jako pożywki używa się agaru kartoflanego o składzie: na 1000 ml wyciągu 1% peptonu, 0,5% soli kuchennej (NaCl), 0,5% ekstraktu Liebiga, 3% agaru, 2% glicerolu. pH pożywki 7,2, wyjaławia się ją w autoklawie przy 4 atm. przez 0,5 godziny.

Czas hodowli wynosi 3—4 dni w temperaturze 37°C.

Po wyjęciu z ciepłarki każdą flaszkę Roux zalewa się ilością 20 ml jałowego płynu fizjologicznego z dodatkiem 0,5 fenolu chemicznie czystego. Flaszkami porusza się, pochylając je lekko celem dokładniejszego splukania hodowli z powierzchni

agaru. Z każdej hodowli sporządza się preparaty mikroskopowe, barwione metodą Grama celem sprawdzenia ich czystości. Po sprawdzeniu hodowli na czystość przesącza się ją do jałowej kolby przez jałowy sączonek z gazy złożonej czterokrotnie. Zawiesinę, z której sporządza się wyciąg antygenowy poddaje się zabiciu w autoklawie przez 1 godz. przy ciśnieniu 1 atm.

Celem uzyskania wyciągu bakteryjnego: a) zawiesinę pozostawia się w chłodni na przeciąg 1/2—1 roku, b) poddaje się ją kolejnemu (najmniej 30-krotnemu) zamrażaniu i odtajaniu. Przejrzysty wyciąg uzyskuje się przez dokładne wirowanie (ok. 1 godz. przy 3000 obrotów na 1 godz.).

Do odczynu wiązania dopełniacza w kierunku tularemii był używany antygen otrzymany wg następującej metody:

Należycie skontrolowany szczep standardowy wysiewano na pożywkę McCoya ściętą skośnie w dużych próbkach. Po 3—5 dniach wzrostu w cieplarni w temp. 37°C następuje splukanie zawiesiny jałowym płynem odżywczym; tak namnożoną zawiesinę tularemii przenosi się do flaszek Roux (przetrzymanywane są uprzednio przez 24 godz. w cieplarni w celu kontroli jałowości podłoża). Po wysianiu materiału do flaszek Roux, przetrzymywano je w cieplarni w ciągu 3—5 dni, a następnie po skontrolovaniu czystości hodowli, splukano ją roztworem fizjologicznym soli. Tak uzyskaną zawiesinę pałeczek tularemii o gęstości około 10 miliardów w 1 ml poddaje się działaniu ultradźwięków o sile około 2800 kc/sek. w temp. nie przekraczającej 37°C, w ciągu 90 minut.

Działanie ultradźwięków kontroluje się mikroskopem elektronowym. Rozbitą masę bakteryjną ogrzewa się następnie do temp. 60°C w ciągu 30—40 minut, po czym rozcieńcza się ją do gęstości 100 milionów ciał bakteryjnych na 1 ml w skali Browna i dodaje się 0,5% fenolu.

Odczyn wiązania dopełniacza w kierunku brucelozы wykonywano metodą Zakładu Rozpoznawczego PIW (E. Grycz). Odczyn wiązania dopełniacza w kierunku tularemii wykonano metodą własną wg techniki następującej:

Czynności przygotowawcze:

- 1) Inaktywowanie surowicy dodatniej i ujemnej w temp. 56°C przez 30 min.,
- 2) miareczkowanie własnego antygenу (tularyny U),
- 3) miareczkowanie dopełniacza.

ad 2. Miareczkowanie antygenу własnego wykonano wg schematu:

Surowica + —	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Roztwór fizj.	08	07	06	05	04	03	02	01	—	08	07	06	05	04	03	02	01	
Dopełniacz	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05
Rozc. antygenу	1 : 200										1 : 20							
Dawka	01	02	03	04	05	06	07	08	09	01	02	03	04	05	06	07	08	
% antygenу	01	02	03	04	05	06	07	08	09	1	2	3	4	5	6	7	8	

Do każdego z rozcieńczeń dodaje się po 1 ml uczulonych 4% krwinek barana, wstrząsa się i następnie całość umieszcza się w łaźni wodnej o temp. 37°C na 15 minut.

Miareczkowany antygen własny wskazuje aktywność w granicy najbliższej 6%. Właściwości hamujące antygenу są bardzo małe, własności hemolizujących nie spostrzeżono.

ad 3. Miareczkowanie dopełniacza:

Surowice + —	01	01	01	01	01	01	01
Roztwór fizjol.	085	08	075	07	065	06	055
Dopełniacz 1/10	005	01	015	02	025	03	035
Antygen własny	05	05	05	05	05	05	05

Całość zestawu ogrzewa się przez 22 minuty w łaźni wodnej w temp. 37°C. Następnie do każdej próbówki dodaje się po 1 ml uczulonych 4% krwinek barana, wstrząsa się i umieszcza na 15 minut w łaźni wodnej w temp. 37°C.

Właściwy odczyn wiązania dopełniacza wykonano wg schematu:

surowica dodatnia		kontrola surowic	
surowica	0,05	0,5	0,5
roztw. fizj.	0,2	0,45	0,2
dopełniacz	0,25	0,25	0,25
antygen własny	0,25	0,00	0,25

Łaźnia wodna 37° — 20 min.

Krwinki 4% + amboceptor wg miana

0,5	0,5	0,5
-----	-----	-----

Łaźnia wodna 37° — 15 min.

Kontrola antygenu własnego

	1	2	3
Surowica	—	—	—
Roztw. fizj.	0,25	—	0,25
Dopełniacz	0,25	0,25	—
Antygen własny	0,25	0,5	0,5

Łaźnia wodna 37° — 20 min.

Krwinki 4% + amboceptor wg miana

0,5	0,5	0,5
-----	-----	-----

Łaźnia wodna 37° — 15 min.

Rozcieńczenie surowicy dodatniej i ujemnej w OWD

Surowica	+		—			
Dawka	0,5	0,25	0,15	0,05	0,05	0,25
Roztwór fizj.	0,2	—	0,1	0,2	0,2	—
Dopełniacz	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Antygen własny	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5

Łaźnia wodna 37° — 20 min.

Krwinki 4% + amboceptor wg miana:

0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Łaźnia wodna 37° — 15 min.

W ten sposób wykonany odczyn z surowicą dodatnią wypada dodatnio w dawce surowicy 0,005.

Odczyn opsono-fagocytny z pałeczkami bruceli i tularemii wykonano w następujący sposób: Do próbówki zawierającej 0,08 ml roztworu cytrynianu sodu pobiera się jałowo 1 ml krwi badanego i wstrząsa lekko, aby krew nie skrzepła. Do próbówki dodaje się 1 ml zawiesiny antygenu i lekko wstrząsa, stawia się ją do łaźni wodnej o temp. 37°C na 35 minut i wstrząsa lekko co 3—4 min. Po wyjęciu z łaźni próbówkę wstrząsa się lekko jeszcze raz, miesza pipetką i bierze kroplę na szkiełko przedmiotowe, a oszlifowaną krawędzią drugiego wykonuje się rozsmaz. Z jednej próbki krwi wykonuje się kilka cieńszych i kilka nieco grubszych rozsmazów. Preparaty suszy się szybko i utrwala alkoholem metylowym 96% w ciągu 5 minut, barwi się przez 20 minut poprzez bibułę, aby uniknąć strąków barwnika. Następnie liczy się liczbę pałeczek tularemii w 25 krwinkach białych.

Barwniki: błękit toluidyny lub barwnik wg Giemsy.

Błękit toluidyny przygotowuje się następująco:

0,5 g błękitu toluidyny
10,0 mg alkoholu etylowego
3,0 g fenolu
100 ml wody destylowanej

Ocena odczynu.

Wyniki oceniamy następująco:

Srednia liczba pałeczek sfagocytowanych w 25 białych krwinkach:

0—5 = (—)
5—10 = ($\pm$)
10—20 = (+)
20—40 = (++)
40—60 = (+++)
60—80—100 = (++++)

Odczyn alergiczno-skrórny wykonywano przy pomocy bruceliny PD oraz tularyny U. Są to własne alergeny, których opis znajduje się w monografii J. Parnasa i A. Tuszkiewicza pt. „Bruceloza” (1956) i w monografii J. Parnasa, T. Rozowskiego i F. Wysockiej pt. „Tularemia” (1957).

WYNIKI BADAŃ

1. Badania serologiczne, wykonane u ludzi chorych na brucelozę, dotyczą 12 osób. W każdym przypadku wykonano z surowicą krwi odczyn zlepnny i wiązania dopełniacza, w kierunku brucelozy i tularemii. Jak widać na tab. 2 zjawisko współaglutynacji zaznacza się wyraźnie. Natomiast odczyn wiązania dopełniacza, dodatni z antygenem bruceli, wypadł z antygenem tularemii zawsze ujemnie. U 60 ludzi wolnych od brucelozy i tularemii wykonano badanie alergiczne i zastosowano alergeny: brucelinę PD i tularynę U. Wynik był ujemny. U ludzi chorych na brucelozę, reagujących dodatnio na brucelinę PD, odczyn tularynowy wypadł ujemnie. To samo stwierdzono u królików.

2. Badania wykonane na królikach objęły 18 zwierząt. Zwierzęta zakażone brucelozą, reagowały na antygen bruceli dodatnio, zarówno w odczynie zlepnym jak i wiązania dopełniacza (tab. 3). U tych samych królików wykonano odczyn opsono-fagocytny z obu antygenami. Wyniki doświadczenia widać na tab. 4. Zapewne w związku z pokrewieństwem antygenowym (antygen powierzchniowy — odczyn zlepnny) pozostaje to, że odczyn opsono-fagocytny dodatni u królików z pałeczkami bruceli wypada słabo dodatnio lub wątpliwie z pałeczkami tularemii.

Wykonano również u królików odczyn alergiczno-skrórny, wyniki tego doświadczenia są przedstawione na tab. 5. Nie zauważono tu zbieżności między obu odczynami.

Dodatkowo wykonano badania na 10 królikach, z których 5 szczepiono brucelą a 5 pozostałych szczepiono pał. tularemii. U królików wykonano

Tab. 2. Badania porównawcze nad współodczynami serologicznymi u ludzi chorych na brucelozę.

Nr badania surowic ludzi	Odczyn zlepný z pałeczkami		Odczyn wiązania dopełniacza z antygenami	
	bruceli	tularemii	bruceli	p. tularemii
2531/57	1/100 ++	1/100 +	dodatni	ujemny
2533/57	1/200 ++	1/200 +	dodatni	ujemny
2539/57	1/50 ++	ujemny	dodatni	ujemny
2551/57	1/200 ++	1/200 +	dodatni	ujemny
2554/57	1/100 ++	1/50 +++	dodatni	ujemny
2563/57	1/800 ++	1/400 +++	dodatni	ujemny
2565/57	1/200 +++	1/200 +	dodatni	ujemny
2642/52	1/200 ++	1/200 +	dodatni	ujemny
2935/57	1/100 +	ujemny	dodatni	ujemny
2969/57	ujemny	ujemny	dodatni	ujemny
2970/57	ujemny	ujemny	dodatni	ujemny
2971/57	1/100 +	1/50 +	dodatni	ujemny

odczyn zlepný i wiązania dopełniacza z antygenami bruceli i pał. tularemii. Wyniki przedstawione są na tab. 6. Widzimy, że odczyn zlepný wypada dodatnio w obu grupach królików, niezależnie od tego czy zastosowano antygen bruceli, czy też pał. tularemii.

Podobnie odczyn wiązania dopełniacza wypadł w obu grupach dodatnio. Odczyn ten wykonywano najpierw z surowicą nie rozcieńczoną. Gdy zastosowano rozcieńczenia surowic, zauważono, że w grupie królików szczepionych brucelą, odczyn wiązania dopełniacza był dodatni z antygenem bruceli w rozcieńczeniach surowicy 1/5—1/10, czego nie stwierdzono z antygenem pał. tularemii. Odwrotnie, w grupie królików szczepionych pał. tularemii, odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio z antygenem homologicznym w rozcieńczeniu 1/5—1/10, natomiast z antygenem bruceli wypadł dodatnio tylko z surowicą rozcieńczoną. Ta metoda rzuca pewne światło na swoistość odczynu wiązania dopełniacza przy brucelozie i tularemii.

c) Przebadano 24 surowic bydła rogatego, zakażonego brucelozą. Zastosowano antygeny bruceli i tularemii w odczynie zlepnym i wiązania dopełniacza. Surowice były rozcieńczone i nierozcieńczone. Dodatni odczyn zlepný z antygenem pał. tularemii towarzyszy tu często agluty-

Tab. 3. Badania porównawcze nad współodczynami serologicznymi z pałeczkami tularemii i bruceli u królików.

Nr królika zakażonego brucelozą	Odczyn zlepný		Odczyn wiązania dopełniacza	
	z brucelą	z p. tularemii	z brucelą	z p. tularemii
1	1/1600	ujemny	++++	ujemny
2	1/400	„	++++	„
3	1/400	„	++++	„
4	1/800	„	++++	„
5	1/1600	„	++++	„
6	1 400	„	++++	„
7	1/400	„	++++	„
8	1/1600	„	++++	„
9	1/1600	„	++++	„
10	1/800	„	++++	„
11	1/1600	„	++++	„
12	1/400	„	++++	„
13	1/400	„	++++	„
14	1/400	„	++++	„
15	1/400	„	++++	„
16	1/1600	„	++++	„
17	1/1600	„	++++	„
18	1/800	„	++++	„

Tab. 4. Badania porównawcze nad współodczynami odpornościowymi z pałeczkami tularemii i bruceli u królików.

Nr królika zakażonego brucelozą	Wskaźnik opsono-fagocytny		Nr królika zakażonego brucelozą	Wskaźnik opsono-fagocytny	
	z brucelą	z pałeczkami tularemii		z brucelą	z pałeczkami tularemii
1	41,60 (++)	12,34 (+)	10	22,12 (++)	12,1 (+)
2	18,40 (+)	8,75 (±)	11	31,20 (++)	7,9 (±)
3	20,60 (++)	9,84 (±)	12	25,48 (++)	12,1 (+)
4	23,70 (++)	12,23 (+)	13	20,44 (++)	10,73 (+)
5	34,50 (++)	12,36 (+)	14	20,12 (++)	11,56 (+)
6	20,65 (++)	11,64 (+)	15	29,60 (++)	16,6 (+)
7	19,84 (+)	7,84 (±)	16	23,00 (++)	12,8 (+)
8	37,62 (++)	13,72 (+)	17	27,12 (++)	10,2 (+)
9	33,60 (++)	11,32 (+)	18	23,64 (++)	9,04 (±)

Tab. 5. Badania porównawcze nad współodczynami odpornościowymi z pałeczkami tularemii i bruceli u królików.

Nr królika zakażonego brucelozą	Odczyn alergiczno-skrórný		Nr królika zakażonego brucelozą	Odczyn alergiczno-skrórný	
	z bruceliną PD	z tularyną U		z bruceliną PD	z tularyną U
1	++	ujemny	10	++	ujemny
2	+	ujemny	11	+++	ujemny
3	++	ujemny	12	++	ujemny
4	—	ujemny	13	+	ujemny
5	+	ujemny	14	+	ujemny
6	+++	ujemny	15	+	ujemny
7	++	ujemny	16	—	ujemny
8	++	ujemny	17	+++	ujemny
9	+	ujemny	18	+++	ujemny

Tab. 6. Badania współodczynów serologicznych u królików zakażonych brucelozą i tularemią. Surowice badane odczynem wiązania dopełniacza były rozcieńczone i nierozcieńczone.

Nr królika		antygen bruceli		antygen tularemii	
		odczyn zlepny	OWD	odczyn zlepny	OWD
I	króliki szczepione brucelą	1/800 ++	1/10 ++	1/400 +++	+++
II		1/1600 +++	1/10 +++	1/800 +++	+++
III		1/1600 +++	1/10 +++	1/800 ++	+++
IV		1/400 ++	1/5 +++	1/400 +	+++
V		1/100 +++	1/5 +++	1/100	+++
VI	króliki szczepione pał. tularemii	1/200 ++	+++	1/200 +++	1/10 +++
VII		1/100 +++	+++	1/100 ++	1/2 +++
VIII		1/200 +	+++	1/200 +++	1/10 +++
IX		1/100 +++	+++	1/100 +++	1/5 +++
X		1/400 +++	+++	1/400 +++	1/10 +++

nacji z brucelą. Tylko 8 surowic nie wykazało dodatniego odczynu zlepnego z pałeczkami tularemii. Miana odczynu zlepnego były zazwyczaj identyczne. Natomiast większe różnice zauważono w zakresie odczy-

nu wiązania dopełniacza (tab. 7). Na 24 badanych surowic reagujących z antygenem bruceli dodatnio, w mianie 1/1 do 1/10, 20 surowic reago-
wało ujemnie z antygenem pał. tularemii.

Tab. 7. Badania porównawcze nad współodczynami serologicznymi z antygenem bruceli i tularemii u bydła. Surowice były badane odczynem wiązania dopełniacza w stanie rozcieńczonym i nierozcieńczonym.

L. p.	Surowice bydłęce	antygen bruceli		antygen pał. tularemii	
		odczyn zlepny	OWD	odczyn zlepny	OWD
1	947/14	1/400 +++	+++	ujemny	ujemny
2	947/16	1/100 +++	++	ujemny	ujemny
3	947/33	1/50 +++	++	ujemny	ujemny
4	947/34	1/50 +++	+	1/50 +	ujemny
5	947/40	1/100 +++	+++	1/100 +	ujemny
6	947/80	1/100 +++	+++	1/50 +++	ujemny
7	947/81	1/200 +++	+++	ujemny	ujemny
8	947/85	1/200 +++	+++	1/100 +	ujemny
9	Nr 1	1/400 +++	1/10 +++	1/400 +++	++
10	Nr 2	1/400 +++	1/5 +++	1/200 +++	ujemny
11	Nr 4	1/400 +++	+++	1/200 +++	ujemny
12	Nr 3	1/400 +++	1/5 +	1/100 ++	ujemny
13	a	1/100 +++	ujemny	1/100 +++	ujemny
14	b	1/400 +++	1/10 +++	1/400 +++	ujemny
15	c	1/100 +++	1/10 ++	1/100 +++	ujemny
16	d	1/100 +++	1/10 +++	1/100 +++	ujemny
17	e	1/100 +++	1/10 +++	1/100 +++	ujemny
18	f	1/100 +++	+++	ujemny	ujemny
19	k	1/50 +++	1/10 +++	ujemny	ujemny
20	l	1/50 +++	1/10 +++	1/50 ++	1/5 +++
21	13	1/50 +++	+++	ujemny	ujemny
22	14	1/50 +++	+++	ujemny	ujemny
23	15	1/800 +++	+++	1/400 ++	++
24	16	1/400 +++	+++	1/400 +++	++

PIŚMIENNICTWO

1. Francis E.: Publ. Health Rep. 1937, 103, 2. Francis E.: J.A.M.A. 1925, 84, 3. J. Parnas, T. Rozowski, F. Wysocka: Tularemia — monografia, 1957, PZWL, Warszawa, 4. J. Parnas, A. Tuszkiewicz: Bruceloza — monografia. PZWL, Warszawa 1956.

РЕЗЮМЕ

На основании собственных иммунологических исследований авторы предполагают, что:

1. Реакция агглютинации обнаруживает часто явление агглютинации между палочками бруцеллеза и туляремии.

2. Реакция связывания комплемента является более специфической. Однако и её нельзя считать вполне достоверной, так как и здесь выступают время от времени явления сореакций с антигенами бруцелл и палочками туляремии. Разведение исследуемых сывороток 1/5 - 1/10 нередко выясняет (но отнюдь не всегда) вопрос специфичности в пользу гомологического штамма.

3. Опсоно-фагоцитарные реакции с палочками бруцеллеза и туляремии тоже проявляют тенденцию к совместному выступанию, причем однако, следует отметить что гомологический антиген знаменуется значительно высшим уровнем опсоно-фагоцитарного индекса.

4. Кожно-аллергическая реакция с бруцеллином „PD“ и тулярином „U“ кажется быть, по своей сореакции, наиболее специфической.

SUMMARY

On the strength of their immunological investigations the authors conclude that:

1. The agglutination reaction often shows the phenomenon of co-agglutination between the brucella and tularemia bacilli.

2. The complement fixation reaction is more specific, but equally cannot be regarded as fully reliable because from time to time there also occur phenomena of co-reaction with antigens of brucella and tularemia bacilli. Dilution of the examined sera 1/5 to 1/10 often (but not always) explains the question of specificity in a way which is favourable to the homologous strain.

3. Opsono-phagocytic reactions with the brucella and tularemia bacilli also present some convergence, but the homologous antigen shows a much higher level of the opsono-phagocytic index.

4. The allergic skin reaction with brucellin PD and tularin U seems to be the most specific with regard to the co-reactivity.