

PRZYDATNOŚĆ IMMUNOPRECYPITACJI I IMMUNOELEKTROFOREZY W RÓŻNICOWANIU TYPÓW *VIBRIO*

Alicja Wilkosz

Instytut Chorób Niezakaźnych — Wydział Weterynarii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego — Akademia Rolnicza w Warszawie

Dotychczasowe różnicowanie typów *Vibrio* oparte było głównie na różnicy we właściwościach biochemicznych jak i serologicznych (wiązanie dopełniacza, czy powszechnie stosowanej aglutynacji probówkowej i hemaglutynacji), która różnicuje szczepy na główne typy *Vibrio* chorobotwórczego czy niechorobotwórczego. Jednak z badań Söderlinda [9] wynika, że typy ustalone za pomocą wiązania dopełniacza nie odpowiadają w zupełności typom ustalonym za pomocą odczynu aglutynacji.

Duże trudności sprawiają szczepy nowo powstałe, a raczej dysocjacja szczepów (np. *Vibrio* typ III), szczepy przechodzące z owiec na bydło itd. Najlepsza z dotychczasowych prób — próba biologiczna wg Adlera [1], nic nie straciła ze swojej aktualności, ale jest próbą zbyt kosztowną do stosowania w diagnostyce.

Stosowanie metody precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wg Oudina [6] lub Ouchterlonego [7], a jeszcze bardziej immunoelektroforezy wg Grabara [4] lub Scheideggera [8] umożliwiło określenie stopnia pokrewieństwa między serotypami bakterii na podstawie różnic w zawartości antygenów.

Winter [10], stosując wyciągi z *Vibrio fetus* w teście precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym wykazał, że istnieje pokrewieństwo antygenowe między szczepami *Vibrio fetus* — wytwarzającymi katalazę, a niektórymi szczepami katalazo-ujemnymi.

Chaumet i Ahmed [2], różnicując szczepy *Vibrio fetus* precypitacją dyfuzyjną w żelu agarowym, używali antygenów sporządzonych metodą zamrażania i odmrażania oraz antysurowic, uzyskiwanych na królikach metodą Mitscherlicha i Liessa [5]. Autorzy otrzymywali pojedyncze linie

precypitacyjne, wyraźniejsze przy stosowaniu surowic nierozcieńczonych. Linie precypitacyjne często były wyraźniejsze przy stosowaniu surowic heterologicznych tzn. pochodzących od innych szczepów tego samego typu.

W związku z powyższym starano się przystosować metodę dyfuzji w żelu agarowym i immunoelektroforezy do diagnostyki nad rozpoznawaniem szczepów *Vibrio*, izolowanych z układu rozrodczego i poronionych płodów bydła.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczepy: *Vibrio fetus venerealis*, *Vibrio fetus intertinalis*, *Vibrio* typ III, *Vibrio bubulus*.

ANTYGENY DO PRECYPITACJI W ŻELU AGAROWYM I ELEKTROFOREZY

Antygeny do precypitacji wykonano z przedstawicieli odpowiednich typów (oznaczonych na podstawie badań biochemicznych i aglutynacji), ze szczepów najbardziej charakterystycznych dla danego typu, oddzielnie z każdego szczepu.

Antygeny ze szczepów wykonano dwiema metodami. W pierwszej metodzie, spluczynę hodowli (formy gładkie) z płytek Petriego trzykrotnie przemytej 0,85-procentowym roztworem NaCl, po odwirowaniu przy 3500 obr/min przez 30 min, poddawano działaniu wody podwójnie destylowanej w stosunku: 100 mg masy bakteryjnej na 1 ml wody, w temp. +4°C przez 48 godzin, często wstrząsając, następnie wirowano przy 16 000 obr/min przez 20 minut. Klarowny płyn nad osadu stanowił precypitynogen.

W drugiej metodzie wstępne postępowanie jak wyżej, a następnie do 100 mg masy bakteryjnej dodawano 1 ml wody podwójnie destylowanej i 30 razy zamrażano w suchym lodzie i odmrażano w łaźni wodnej w temp. 37°C. Materiał zamrażano na 12 godz nocnych, w ciągu dnia 6-krotnie odmrażano i zamrażano. Wirowano przy 16 000 obr/min przez 20 minut. Klarowny płyn nad osadu stanowił precypitynogen. Oba antygeny przetrzymywano w temp. -20°C.

SUROWICE DIAGNOSTYCZNE

Szczepiono dożylnie króliki spluczyną hodowli *Vibrio* w 0,85-procentowym roztworze NaCl o gęstości 2 wg skali McFarlanda, wzrastającymi dawkami od 0,2 do 2,0 ml w odstępach 4-dniowych.

Przy szczepieniu domięśniowym wyciągów z *Vibrio* w ilości od 0,1 do 0,3 (trzykrotnie) używano adiuwanta Freund'a.

Surowice otrzymywano: 1) zaszczepiając króliki żywą hodowlą kilku szczepów danego typu, 2) hodowlą kilku szczepów danego typu i doszczepiając wyciągami uzyskanymi metodą pierwszą i drugą. Okres uodparniania wynosił 6-8 tygodni. Króliki skrwawiano po 10-12 dniach od ostatniej iniekcji i przy wysokości miana aglutynacyjnego od 5120 do 10 240. Wszystkie surowice konserwowano przez dodanie metriolatu.

Precypitację w żelu agarowym wykonano metodą Ouchterlony, używając 1,5-procentowego roztworu Difco-Noble. Agar rozlewano na szkiełka podstawowe o wymiarach $7,5 \times 2,5$ cm w ilości 6 ml agaru oraz na szkiełka większe o wymiarach $10,5 \times 4,5$ cm w ilości 15 ml agaru.

Baseniki wycinano sztancą o średnicy 0,5 i 0,8 mm na odpowiednim szablonie.

Surowicę rozlewano w ilości po 0,1 ml do mniejszych baseników i 0,2 ml do większych, antygen odpowiednio po 0,01 i 0,02 ml. Po zastygnięciu agaru, dna otworów w celu uniknięcia podsiąkania antygenów pokrywano cienką warstwą rozpuszczonego 1,5-procentowego agaru. Po nastawieniu odczynu płytki umieszczano w komorach wilgotnych w temp. $+25^{\circ}\text{C}$, co zapobiegało wysychaniu zarówno podłoża jak i płynów reagujących. Obserwacje prowadzono przez okres 7 dni, kontrolując wyniki 2 razy dziennie.

Do odczynu precypitacji stosowano surowice nierozcieńczone jako dające najwyraźniejsze prążki precypitacyjne.

W celu sprawdzenia swoistości odczynu stosowano precypitację przy użyciu surowic diagnostycznych i spłuczynę 0,85-procentowego NaCl z płytek Petriego, bez wzrostu *Vibrio*.

Immuno-elektroforezę w żelu agarowym wykonano używając mikro-metody wg Scheideggera [8]. Stosowano 5-procentowy roztwór agaru Difco-Noble w buforze weronalowym o składzie:

- | | | |
|---------------------|---|------------|
| 1) 5,5 veronal sodu | — | 10,305 g, |
| woda redestylowana | — | 1000,0 ml; |
| 2) 5,5 veronal | — | 5,183 g, |
| woda redestylowana | — | 1000,0 ml. |

Bufor konserwowany był metriolatem w stężeniu 1 : 10 000. Agar rozlewano na szkiełka podstawowe w ilości 6,0 ml, po zastygnięciu agaru wycinano sztancą 1 lub 2 baseniki o średnicy 0,5 cm. Odległość między dwoma basenikami wynosiła 0,8 cm. Na końcu szkiełka z agarem (ok. 0,5 cm) nakładano paski bibuły Wattman 3 i zanurzano końce w buforze o tym samym składzie. Po nalaniu do baseników antygenów w ilości 0,02 ml dodawano po 1 kropli agaru na powierzchnię antygenu w celu całkowitego wypełnienia basenika i jego przykrycia. Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny: 4,5 godz przy napięciu 220 Volt i spadku napię-

cia 4-5 V/cm. Elektroforezę przeprowadzono na aparacie do immunoelektroforezy produkcji PPF Wrocław typ EF1. Komorę aparatu przerebiono przez zastosowanie elektrod platynowych. Po rozdiale elektroforetycznym wycinano podłużne baseniki na surowicę o wymiarach 6×3 cm.

Szkiełka z agarem przetrzymywano w komorze wilgotnej (temp. 18°C). Linie precypitacyjne obserwowano przez 4 doby 2 razy dziennie. Po rozwinięciu się łuków precypitacyjnych szkiełka z agarem moczo 3-4 dni w płynie fizjologicznym, zmienianym dwa razy dziennie aż do całkowitego wypłukania w nim nadmiaru nie związanej surowicy lub antygeny. Suszono w temperaturze pokojowej (pod bibułą) i barwiono azokarminem wg Uriela [4]. Podobnie postępowano przy szkiełkach z agarem (precypitacja i elektroforeza) z tym, że te preparaty były uprzednio utrwalone w 2-procentowym roztworze kwasu octowego.

Ze względu na różny poziom przeciwciał, występujący w surowicach użytych do doświadczenia, porównywano jedynie wyniki uzyskane z tą samą surowicą i różnymi wyciągami antygenowymi.

Precypitynogeny uzyskane metodą pierwszą i drugą ze szczepów z antysurowicami, zarówno pełnymi przeciw żywej komórce bakteryjnej jak i doszczepianymi wyciągami uzyskanymi obu metodami, reagowały w teście precypitacji różną ilością linii precypitacyjnych.

W immunodyfuzji w żelu agarowym prążki układały się w charakterystyczny sposób: po 18 godz pojawiał się z reguły prążek pierwszy — wyraźny, leżący mniej więcej w połowie drogi między basenikami z surowicą i antygenem, najczęściej trochę bliżej basenika z surowicą. Również po 18 godz tworzył się prążek drugi, wyraźny, leżący w połowie drogi między basenikami, znajdował się on zawsze między prążkiem pierwszym a basenikiem z antygenem. Oba prążki intensywnie wybarwiała się azokarminem. Prążki następne występowały między 2 a 4 dniem. Prążek trzeci słabiej wyrażony leżał między prążkiem drugim a basenikiem z antygenem. Prążki czwarty, piąty i szósty występowały między 2 a 4 dniem i zmienna liczba prążków precypitacyjnych obejmowała przede wszystkim te właśnie prążki; odnosiło się to szczególnie do precypitacji z surowicami uzyskiwanymi po doszczepieniu.

Charakterystyczny prążek występował również w obecności surowic pełnych bez doszczepienia z homologicznym antygenem, ale uzyskanym metodą drugą; był to prążek gruby, półksiężycowaty, leżący tuż przy baseniku z surowicą.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki precypitacji w żelu agarowym wyciągów uzyskanych ze szczepów metodą pierwszą i drugą z surowicami pełnymi, przeciw całej komórce bakteryjnej.

Szczepy patogenne *V. fetus vernealis* reagują 2 prążkami precypita-

Tabela 1

Odczyn precypitacji w żelu agarowym metodą Ouchterlony z surowicami [7]

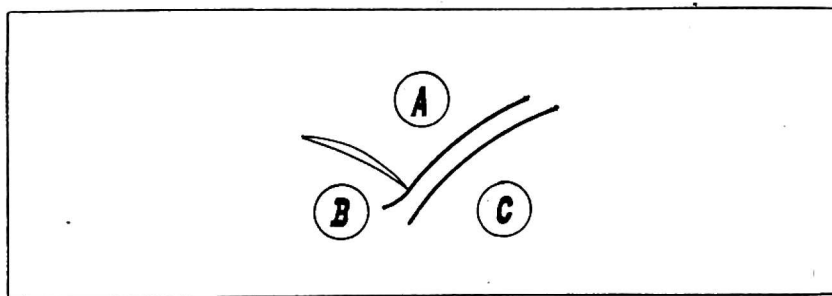
Wyciąg antygenowy	Metoda	Surowice*			
		<i>Vibrio fetus venerealis</i>	<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	<i>Vibrio</i> typ III	<i>Vibrio bubulus</i>
<i>Vibrio fetus venerealis</i>	I	2**	1	(1)	—
	II	2	1	(1)	(1)
<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	I	(1)	1-2	1	(1)
	II	1	1-2	1-2	(1)
<i>Vibrio</i> typ III	I	1	1	1-2	(1)
	II	1	1	2	(1)
<i>Vibrio bubulus</i>	I	—	(1)	(1)	1
	II	—	(1)	(1)	1-2

(1) — ślad prążka precypitacyjnego.

* Surowice przeciw całej komórce bakteryjnej (bez doszczepiania wyciągami).

** Wyniki dodatniej precypitacji wyrażono liczbą lini precypitacyjnych.

cyjnymi, natomiast wyciągi z tych szczepów uzyskane metodą drugą z surowicami homologicznymi, jak i w krzyżowej precypitacji między nimi dają po trzy prążki (rys. 1).



Rys. 1. Precypitacja w żelu agarowym; A — antygen *Vibrio fetus venerealis*, B — surowica anty-*Vibrio bubulus*, C — surowica anty-*Vibrio fetus venerealis*

Vibrio fetus intestinalis z surowicą homologiczną daje 1-2 prążki precypitacyjne; identycznie zachowuje się z surowicą anty *Vibrio* typ III.

Vibrio typ III, słabszy w odczynie precypitacji, z reguły daje po jednym, czasami po dwa prążki z surowicami przeciw szczepom patogennym bydłęcym, jak również z surowicą homologiczną w metodzie pierwszej. Najlepiej reaguje z homologiczną surowicą i wyciągami uzyskanymi metodą drugą, dając stałą liczbę 2 prążków.

Wyciągi z *Vibrio bubulus* bydłeciego dają z surowicami homologicznymi 1-2 prążki, z pozostałymi surowicami heterologicznymi wykazują ślady pierwszego prążka precypitacyjnego.

W odczynie precypitacji w żelu agarowym przy użyciu wyciągów uzyskanych metodą pierwszą i drugą oraz surowic po doszczepieniu wyciągami uzyskanymi metodą pierwszą i drugą występuje zwiększenie liczby prążków precypitacyjnych, szczególnie wśród szczepów patogennych.

Jak wykazuje tabela 2, wyciągi z *V. fetus verenealis* z antysurowicami przy metodzie pierwszej dają 4 prążki, przy metodzie drugiej stała liczbę 5 prążków.

Tabela 2

Odczyn immunoprecypitacji w żelu agarowym metodą Ouchterlony [7]

Wyciągi antygenowe	Metoda	Surowice*							
		<i>Vibrio fetus venerealis</i>		<i>Vibrio fetus intestinalis</i>		<i>Vibrio</i> typ III		<i>Vibrio bubulus</i>	
		I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Vibrio fetus venerealis</i>	I	4**	4	(1)	(1)	—	—	—	—
	II	4-5	5	(1)	1	1	1-2	—	(1)
<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	I	(1)	(1)	2	2	1-2	1-2	—	(1)
	II	1-2	1-2	2	3	2	2	(1)	(1)
<i>Vibrio</i> typ III	I	1	1	1	1-2	2	2	(1)	(1)
	II	1-2	1-2	1-2	2	2-3	2-3	(1)	(1)
<i>Vibrio bubulus</i>	I	—	—	—	(1)	—	(1)	1-2	2
	II	—	(1)	—	—	1	1	1-2	2

(1) — ślad linii precypitacyjnych.

* Surowice uzyskane na królikach drogą uodporniania całymi komórkami oraz wyciągami uzyskanymi z *Vibrio* metodą I i II.

** Wyniki precypitacji dodatniej wyrażono liczbą łuków precypitacyjnych.

BADANIA PRZY POMOCY IMMUNOELEKTROFOREZY

Łuki precypitacyjne, tak jak i w immunodyfuzji, układały się w dość charakterystyczny sposób: łuk pierwszy pojawił się po 18-20 godz w wyciągach ze wszystkich szczepów (w obu metodach) z surowicami swoistymi i heterologicznymi oraz we wszystkich krzyżowych precypitacjach z surowicami heterologicznymi, przy czym jego intensywność (w barwieniu azokarminem), długość i grubość zmieniała się. Leżał on w połowie między basenikiem z antygenem i surowicą, lekko przesunięty w stronę elektrody dodatniej; był to najdłuższy z uzyskanych łuków. Przed upływem 24 godz pojawiał się z reguły łuk drugi, leżący po stronie anody, zawsze ponad łukiem pierwszym i o połowę od niego krótszy.

Jak wynika z tabeli 3 i 4, w odczynie immunoelektroforezy przy użyciu wyciągów uzyskanych metodą pierwszą i drugą, i surowic pełnych bez doszczepiania jak i doszczepianych wyciągami uzyskanymi metodami

Tabela 3

Liczba łuków precypitacyjnych w odczynie immunoelektroforezy wg Scheideggera [8]

Wyciągi antygenowe	Metoda	Surowice*			
		<i>Vibrio fetus venerealis</i>	<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	<i>Vibrio</i> typ III	<i>Vibrio bubulus</i>
<i>Vibrio fetus venerealis</i>	I	2**	2	1	—
	II	2-4	3	1-2	(1)
<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	I	2	3	1-2	(1)
	II	2	3-4	2	(1)
<i>Vibrio</i> typ III	I	1	1	2	(1)
	II	1-2	2	2	1
<i>Vibrio bubulus</i>	I	(1)	(1)	(1)	1
	II	(1)	(1)	1	1-2

(1) — ślad prążka precypitacyjnego.

* Surowice przeciw całej komórce bakteryjnej (bez doszczepiania).

** Wyniki dodatniej precypitacji wyrażono liczbą łuków precypitacyjnych.

Tabela 4

Odczyn immunoelektroforezy wg Scheideggera [8]

Wyciągi antygenowe	Metoda	Surowice*							
		<i>Vibrio fetus venerealis</i>		<i>Vibrio fetus intestinalis</i>		<i>Vibrio</i> typ III		<i>Vibrio bubulus</i>	
		I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Vibrio fetus venerealis</i>	I	5**	5	3	3	2-3	2-3	—	—
	II	5-6	7-8	3	3	3	3	—	(1)
<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	I	3-4	3-4	3	4	3	3	—	(1)
	II	4	4	4	4	3-4	3-4	—	(1)
<i>Vibrio</i> typ III	I	2	2	3	3	3	3-4	(1)	(1)
	II	2	3	3	3	3-4	4	(1)	(1)
<i>Vibrio bubulus</i>	I	—	—	—	—	(1)	(1)	1-2	1-2
	II	—	(1)	—	(1)	(1)	(1)	1-2	2-3

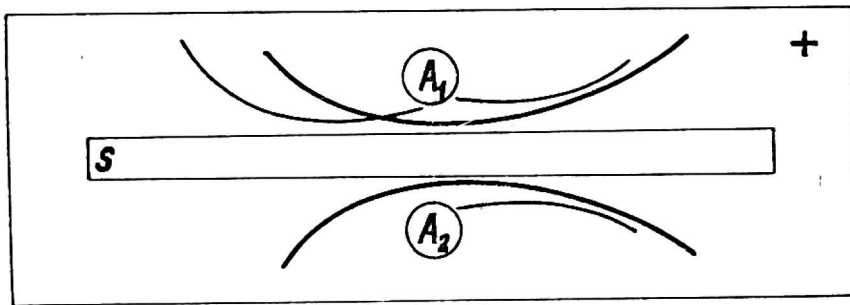
(1) — ślad linii precypitacyjnej.

* Surowice uzyskane na królikach drogą uodparniania całymi komórkami oraz wyciągami uzyskanymi metodą I i II.

** Wyniki dodatniej immunoelektroforezy wyrażono liczbą łuków precypitacyjnych.

pierwszą i drugą, w stosunku do odczynu precypitacji w żelu agarowym przy tym samym składzie (reagentów) występuje zwiększenie ilości prążków, zwanych łukami precypitacyjnymi, od 1 do 2.

Podobnie jak w immundyfuzji żelowej, występuje i w tej metodzie różnica w ilości łuków precypitacyjnych między szczepami patogennymi i niepatogennymi. Wyciągi ze szczepów *Vibrio fetus venerealis* z surowicami homologicznymi wytwarzają 2-4 łuków precypitacyjnych, natomiast wyciągi te z surowicami przeciw szczepom niepatogennym *Vibrio bubulus* nie wykazują żadnych łuków lub śladów pierwszego (rys. 2).



Rys. 2. Immunoelktroforeza w żelu agarowym; S — surowica anti-*Vibrio fetus venerealis*, A_1 — antygen z *Vibrio fetus venerealis*, A_2 — antygen z *Vibrio fetus intestinalis*

Jak z powyższych danych wynika, różnicowanie szczepów *Vibrio fetus venerealis* od *Vibrio bubulus* nie napotyka na duże trudności, gorzej przedstawia się różnicowanie szczepów pośrednich jak *Vibrio fetus intestinalis* lub *Vibrio* typ III. Wyniki te zgodne są z uzyskanymi przez Chaumeta i Ahmeda [2]. Za swoistością odczynów uzyskanych w obu metodach może świadczyć pokrywanie się wyników uzyskanych w samej precypitacji żelowej, jak i immunoelktroforezie. Wyniki te zgodne są z pracami Wintera [10], który uzyskiwał wyciągi ultradźwiękowe oraz zamrażane, formujące w precypitacji żelowej 3 grupy linii precypitacyjnych.

Reasumując, wydaje się, że do diagnostyki bardziej przydatną może się stać metoda precypitacji żelowej, jako prostsza niż immunoelktroforeza.

Sam odczyn precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym daje większe możliwości analityczne niż precypitacja próbówkowa w środowisku płynnym. Można bowiem za jego pomocą badać równocześnie szereg systemów antygen—przeciwciało, w przeciwieństwie do odczynu precypitacji próbówkowej, który uwidacznia tylko system cechujący się największą aktywnością.

PISMIENNICTWO

1. Adler H. C.: III Intern. Congress and Animal. Reproduction, II, 4, 1956.
2. Chaumet I., und Ahmed A.: Zeutlb für Vet. met. B. VIII, 1961, 1060-1094.
3. Crowle A.: Immunodyfusion. 1963.
4. Grabar P., Burtin.: Immunoelktrophotic Analysis. 1964.
5. Mitscherliche E. und Liess B.: D.T.W. 65, 2n, 36, 1958.
6. Oudin I.: Method in Medical Research. 5, 1952, 335.
7. Ouchterlony O.: Dela Pathol Mierob. Scand, 25, 1949, 507.
8. Scheidegger J. J.: Int Arch.: Allergy, 7, 1955, 103.
9. Soderlind O.: Monatschr, Tierhell, 13, 1961, 42.
10. Winter D. Dunne.: Am. J. vet. Res. 1962, 150-164.

A. Вилькош

ПРИГОДНОСТЬ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ И ИММУНОЭЛЕКТРОФЕРЕЗА
В ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИИ ТИПОВ VIBRIO

Резюме

В соответствующих исследованиях использовывали активные вытяжки, полученные по методы водной экстракции и замораживания. Эти вытяжки были представительными для патогенных штаммов *Vibrio fetus* и непатогенных штаммов *Vibrio bubulus*, появляющихся в половой системе крупного рогатого скота в Польше. В исследованиях применяли метод преципитации в желе составленном по Ухтерлони и иммуноэлектрофореза по Шейдеггеру.

Диагностические сыворотки против антигенных вытяжек были получены на кроликах. Диффузионная преципитация и иммуноэлектрофорез показали серологическое родство между патогенными штаммами *Vibrio fetus*. Установлены значительные различия в количестве преципитационных полос между штаммами *Vibrio fetus* и *Vibrio bubulus*.

Установлено, что железая преципитация как более простая может оказатья пригодным методом в дифференцировании штаммов *Vibrio*, особенно патогенных. Замораживаемые вытяжки оказались более пригодными для преципитации, чем вытяжки полученные по методу водной экстракции.

A. Wilkosz

USEFULNESS OF IMMUNOPRECIPITATION AND IMMUNOELECTROPHORESIS
FOR DIFFERENTIATION OF THE VIBRIO TYPES

Summary

For the present antigenic extracts obtained by water extraction and freezing were used. These extracts represented pathogenic strains of *Vibrio fetus* and non-pathogenic ones *Vibrio bubulus*, isolated from bovine genitals in Poland. The

methods of Ouchterloy (precipitation in gel) and Scheideggers (immunoelectrophoresis) were used.

Diagnostic sera against antigenic extracts were obtained on rabbits. Both methods showed a serological relationship between the pathogenic strains. Significant differences have been found between strains of *V. fetus* and *V. bubulus* in the number of precipitation lines. The gel precipitation, as a simpler method might be used for differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains. Frozen extracts proved to be more suitable for precipitation than liquid extracts.