Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 353 - 370

J. Parnas i *T. Mierzejewski*

BADANIA BIOCHEMICZNE I IMMUNOCHEMICZNE NAD PAŁECZKAMI *BRUCELLA*

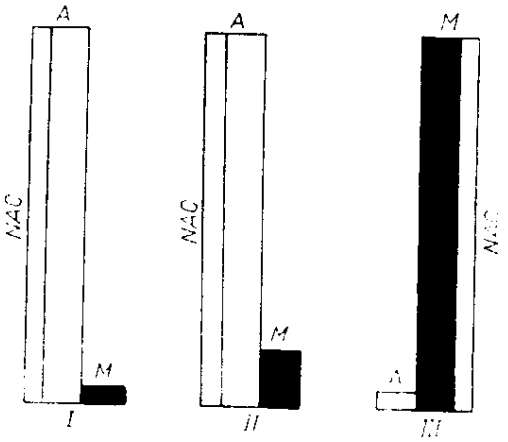
Z Zakładu Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie

Wpłynęło 5 maja 1956 r.

Duże znaczenie w swoistości cech immunologicznych komórki bakteryjnej przypisuje się antygenom somatycznym. Strukturę ich poznano dotychczas u niewielu bakterii.

Własności pełnych antygenów otrzymywanych przy pomocy różnych metod z komórek *Brucella* opisywało wielu autorów: Słabospicki (1941), Wiersziłowa (1941, cytat Dubrowskiej 1950), Huston, Huddleson, Hershey (1943), Miles, Pirie (1939), Lisbonne, Monniér (1936), Dambovicean-u, Barber, Pop, Marinov (1938), Paterson, Pirie, Stableforth (1947), Dubrowska (1950, 1951, 1954), Parnas, Mierzejewski, Feltynowski, Łazuga (1955), Pannell (1950).

W badaniach serologicznych stwierdzono, że *Brucella* zawiera dwa podstawowe antygeny: *A* i *M* (Wilson i Miles, 1932, według Dubrowskiej 1950).



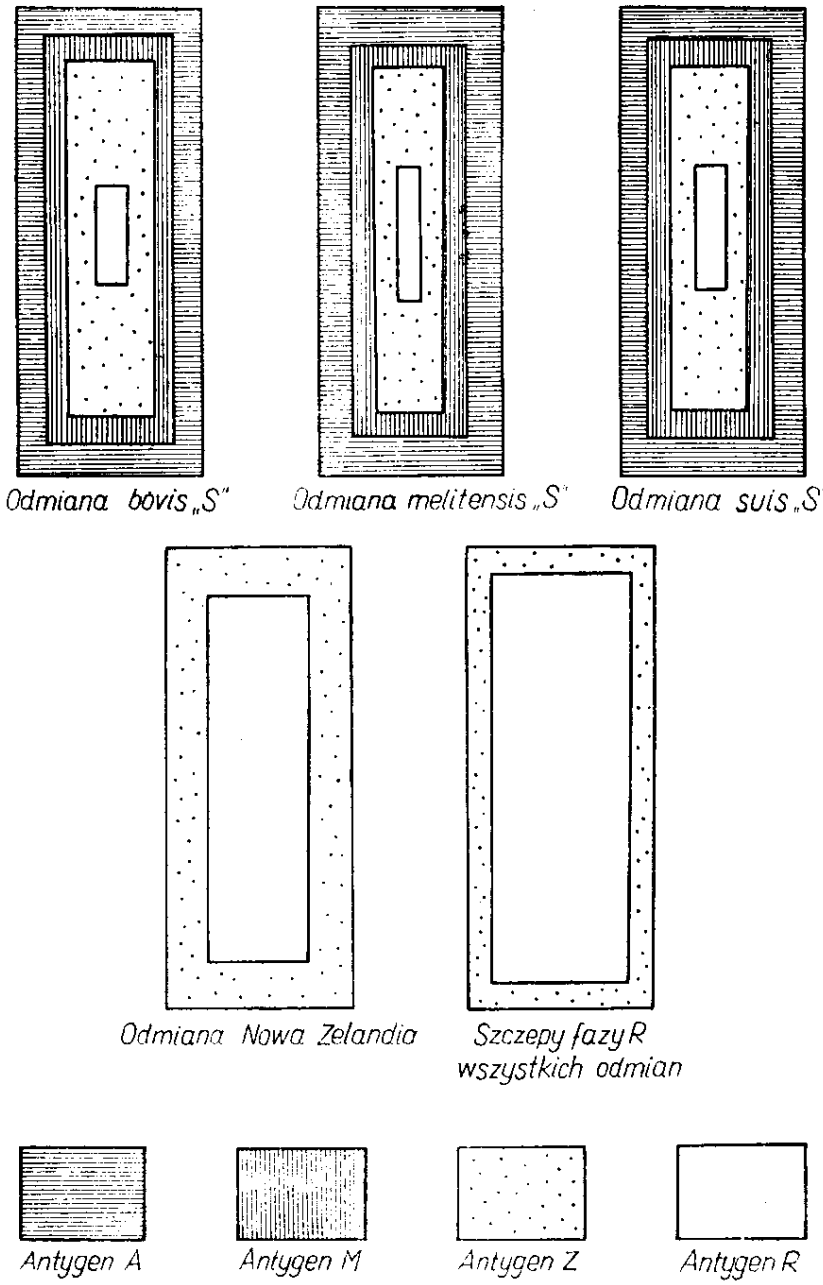
Rys. 1. Schemat budowy antygenowej pałeczek *Brucella* (według Wilsona i Milesa). *I* — odmiana *bovis*, *II* — odmiana *suis*, *III* — odmiana *melitensis*, *NAC* = nieswoisty antygen cząstkowy (współaglutynacja z pałeczki tularemii, duru brzusznego), *A* = antygen *bovis*, *M* = antygen *melitensis*

Fig 1. Antigenic structure of *Brucella* — schematically (according to Wilson and Miles)

Przy pomocy metody wysycania aglutynin udało się wykazać, że poszczególne odmiany *Brucella* różnią się zawartościami antygenów *A* i *M*. Przedstawiony na rysunku 1 schemat Wilsona i Milesa nie znajduje dziś w dociekaniach serologicznych pełnego poparcia faktycznego (Chodkowski i Parnas, 1956). Ostatnio Renoux i Machaffey (1955)

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8



Rys. 2. Schemat budowy antygenowej *Brucella* (według Renoux-Machaffey)
Fig. 2. Antigenic structure of *Brucella* — schematically (according to Renoux — Machaffey)

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

zaproponowali inny schemat struktury antygenowej odmian *Brucella*. Według tych autorów komórki fazy *R* wszystkich odmian zawierają prawie wyłącznie antygen *R*, wspólny dla wszystkich szczepów. Komórki fazy *S* odmiany *melitensis* zawierają antygen *R* i antygen *Z* (właściwy dla nowoopisanej odmiany nowozelandzkiej), antygen *M* i *A*. Komórki fazy *S* odmian *bovis* i *suis* zawierają te same substancje antygenowe, lecz w innych proporcjach (rysunek 2).

Damboviceanu, Barber, Pop i Marinov (1939, według Mikulaszka 1951) otrzymali z wszystkich odmian *Brucella* przy pomocy metody Boivina substancje antygenowe złożone z wielocukrów, kwasów tłuszczowych oraz substancji nierozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych i zasadach, a odczepiających po hydrolizie kwaśnej aminokwasy.

Dubrowska (1950, 1951, 1954), stosując metodę Boivina, ekstrahowała z *Brucella* złożony kompleks, w skład którego wchodzą dwa antygeny różniące się składem chemicznym: antygen lipo-wielocukrowo-białkowy oraz antygen zawierający obok swoistego wielocukrowca i białka kwas dezoksyrybonukleinowy. Swoiste wielocukrowce tych antygenów różnią się składem chemicznym; jeden z nich zbudowany jest z glikozy, kwasów heksuronowych i glikozaminy, drugi zaś zawiera ponadto galaktozę. Antygenowe kompleksy różnych odmian *Brucella* odznaczają się różnym stosunkiem poszczególnych substancji. W antygenowych kompleksach *B. suis* i *melitensis* przeważa antygen zawierający kwas dezoksyrybonukleinowy, u *B. bovis* antygen ten stanowi niewielką tylko część kompleksu. Silverman i Elberg (1950, cytowane według Dubrowskiej 1954) przy badaniu w ultrafiolecie substancji antygenowych otrzymanych drogą utrafiltracji i ultrawirowania ekstraktów fenolowych *Brucella* stwierdzili występowanie w nich pirydynowych i purynowych związków. Badania te zgodne są więc w zasadzie z badaniami Dubrowskiej.

BADANIA WŁASNE

CEL, METODYKA I MATERIAŁ UŻYTY DO BADAŃ WŁASNYCH

Celem niniejszej pracy było:

1. Poznanie składu chemicznego kompleksów białkowo-cukrowych, wydzielonych z *Brucella*.
2. Wykrycie ewentualnych różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami i odmianami *Brucella* w zdolności do tworzenia katalazy i ureazy.
3. Wyodrębnienie z *Brucella* sympleksów czynnych pod względem antygenowym oraz ich analiza.

Do oznaczania cukrów i aminokwasów w hydrolizatach sympleksów użyto metody chromatografii bibułowej. Katalazę oznaczano zmodyfikowaną metodą Huddlesona.

Materiał badawczy stanowiły krajowe szczepy *Brucella* kolekcji własnej (w tym 136 szczepów *B. bovis*, 14 *B. suis* i 5 *B. melitensis*) oraz wzorcowe szczepy odmiany *bovis*, *suis* i *melitensis*, otrzymane od prof. Stablefortha z Weybridge. Dla porównania zbadano również szczepy *Pasteurella multocida*, *P. tularense* i *P. rodentium*, zbliżone pod niektórymi względami do *Brucella*.

Chromatografię bibułową wykonano z antygenami otrzymanymi z wzorcowych szczepów odmian *bovis*, *suis* i *melitensis*, ze szczepu niezjadliwego *S. 19*, ze szczepu własnej kolekcji *PD* oraz z *P. multocida*, *P. rodentium* i *P. tularense*.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Próby na katalazę i ureazę wykonano ze szczepami *Brucella* kolekcji własnej. U wszystkich szczepów sprawdzono czystość fazy *S* metodą Henryego w modyfikacji własnej i metodą Brauna. Ilość pałeczek w 1 ml oznaczano według skali Brauna.

I. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

Hodowle agarowe *Brucella* przemyte płynem fizjologicznym zadawano dwukrotnie 5-procentowym roztworem kwasu trójchlorooctowego; otrzymane wyciągi sączono przez sączek 388 oraz wirowano, a następnie dializowano i zagęszczano pod próżnią do objętości 10 ml (ze 150 ml płynu wyjściowego). Zagęszczony dializat zadawano 8-krotną objętością bezwodnego acetonu. Osad wytrącany po 24 godzinach oddzielano od płynu przez wirowanie, przemywano acetonem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano proszek koloru kremowego, trudno rozpuszczalny w zimnej wodzie.

W próbach orientacyjnych roztwór osadu reagował ujemnie w odczynie Fehlinga, bardzo słabo dodatnio lub wątpliwie w ninhydrynowym i biuretowym, pozytywnie zaś w reakcji Molischa i Hellera. Przypuszczamy, że otrzymany osad jest sympleksem, w skład którego wchodzą węglowodany i białka. Rozbicia otrzymanego sympleksu dokonano na drodze łagodnej hydrolizy kwaśnej. W tym celu osad zadano 0,1 N kwasem octowym w stosunku 1 : 100, hydrolizując go na wrzącej łaźni wodnej przez 4 godziny. Otrzymano osad białka (dodatnie reakcje: biuretowa, ninhydrynowa), cieniutką warstewkę tłuszczową na powierzchni i płyn, w którym rozpuszczone były węglowodany (pozytywna reakcja Molischa). Osad usunięto przez wirowanie, przemyto 0,1 N kwasem octowym, acetonem i wysuszono w próżni. Suchy osad białka hydrolizowano w 20-procentowym HCl przez 21 godzin pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia. Hydrolizat, po usunięciu kwasu solnego, użyto do analizy chromatograficznej na aminokwasy.

Węglowodany wytrącano 10-krotną objętością bezwodnego acetonu, przemywano acetonem i eterem, i po wysuszeniu hydrolizowano 6-procentowym kwasem solnym przez 6 godzin w 98 - 100° pod chłodnicą zwrotną. Hydrolizaty zobojętniano wodorotlenkiem sodu, odparowywano do sucha w próżni i odsalano na drodze ekstrakcji pirydynowej. Ekstrakt pirydynowy służył jako materiał wyjściowy do analizy chromatograficznej cukrów redukujących we frakcji węglowodanowej sympleksu.

Analizę chromatograficzną przeprowadzano według ogólnie stosowanej metody. Aminokwasy rozdzielano na bibule Whatman Nr 1 i 3 w układzie fenol — woda w stosunku objętościowym 7 : 3, propanol — woda (7 : 3), butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 5), butanol — metanol — woda (4 : 5 : 1) w chromatografii dwukierunkowej i jednokierunkowej oraz krążkowej. Jako wywoływaczy użyto 0,1-procentowego roztworu acetonowego ninhydryny i 0,2-procentowego roztworu izatyny.

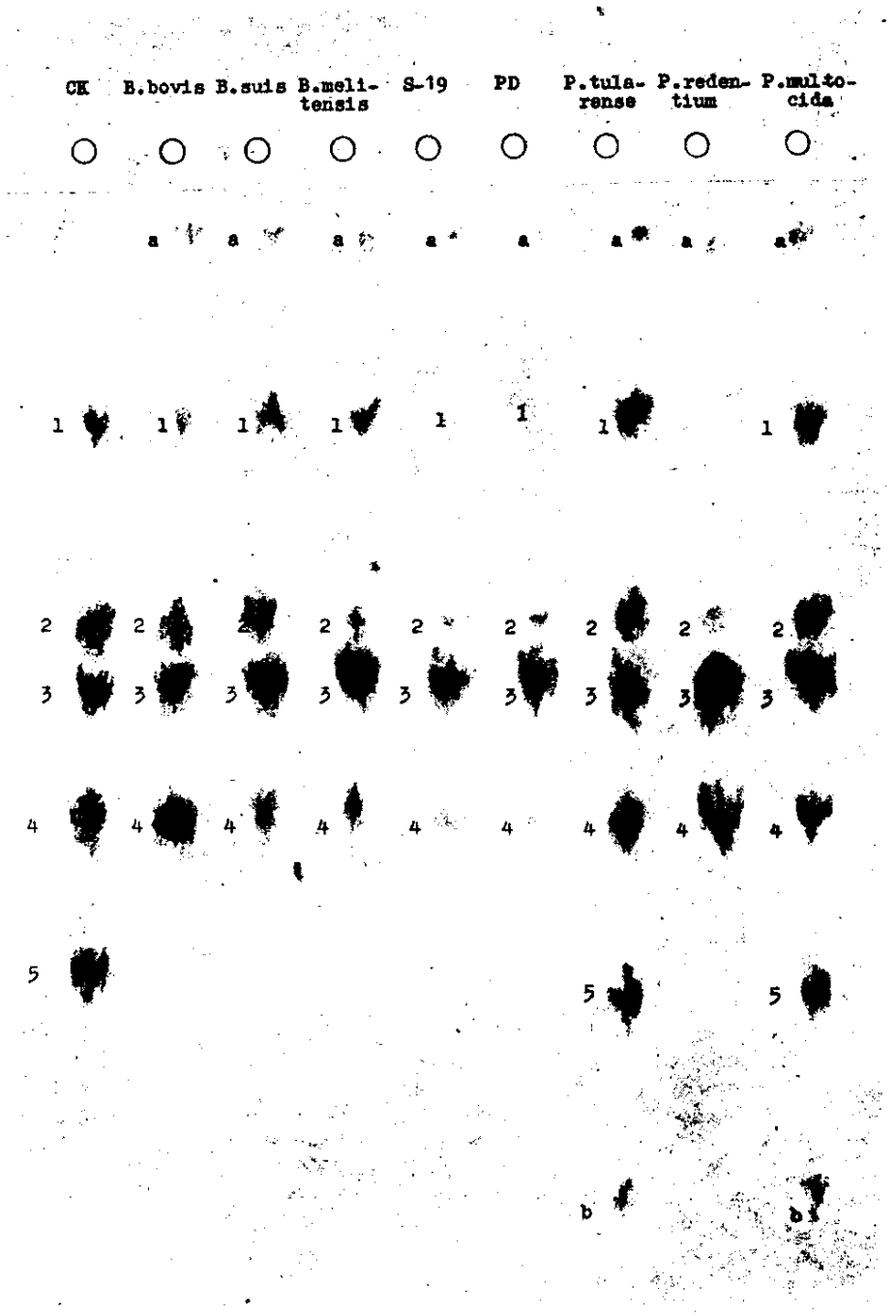
Cukry rozdzielano na jednokierunkowym chromatogramie w układzie pirydyna—butanol—woda w stosunku objętościowym 25 : 45 : 40, który to układ umożliwia rozdzielenie cukrów prostych o zbliżonych współczynnikach rozdziału na bibule Whatman Nr 1 (Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska, 1950).

Chromatogramy cukrowe hydrolizatów sympleksów *Brucella* i *Pasteurella* przedstawiono w tabeli I. W tabeli II podano skład aminokwasowy hydrolizatów przy różnych stężeniach substratu na chromatogramie.

Chromatogramy hydrolizatu frakcji białkowej odmian *bovis*, *suis*, *melitensis*, *S-19* i *PD* nie wykazują różnic w składzie jakościowym (rysunek 4 i 5). Stale otrzymywano 15 - 17 plam, które umiejscowieniem i zabarwieniem w reakcji z ninhydryną i izatyną odpowiadają aminokwasom kontrolnym; 1. leucyna lub izoleucyna, fenyloalanina; 2. walina lub metionina; 3. prolina; 4. tryptofan; 5. tyrozyna; 6. alanina; 7. treonina; 8. lizyna; 9. glikokol; 10. seryna; 11. ?; 12. kwas glutaminowy; 13. kwas asparaginowy: 14. ?; 15. ? (cystyna?); 16. arginina; 17. histydyna. Niektóre z tych plam występują dopiero po naniesieniu na chromatogram większych ilości hydrolizatu; dotyczy to szczególnie aminokwasów ulegających zmianom podczas hydrolizy kwaśnej, a mianowicie; histydyny, argininy, tryptofanu i cystyny.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8



Rys. 3. Chromatogramy frakcji wielocukrowej *Brucella* i *Pasteurella*
CK — cukry kontrolne, 1 — glikozamina, 2 — galaktoza, 3 — glikoza, 4 — mannoza, arabinoza, fruktoza, 5 — ksyloza, a— ?, b — prawdopodobnie ryboza

Fig. 3. Chromatograms of hydrolysates of polysaccharide fraction of *Brucella* and *Pasteurella*

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

TABELA I

Hydrolizat frakcji wielocukrowej sympleksów białkowo-cukrowych
Analyses of the hydrolysate of polysaccharide fraction of glicoproteide-symplexes

Węglowodany Carbohydrates	*Brucella brucei*					*Pasteurella*		
	bovis	*suis*	*melitensis*	*S-19*	*PD*	*tularense*	*rodentium*	*multocida*
Kwasy heksurowe Uronic acids	+	+	+	±	±	+	+	+
Glikoza Glucose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Galaktoza Galactose	+++	+++	+	+	+	+++	±	+++
Glikozamina Glucosamine	+	+++	+	+	+	+++	-	+++
Mannoza Mannose	++	++	+		+	++	++	++
Ksyloza Xylose	-					++	-	-
Ryboza Ribose	-		-	-	-	-	-	±

- iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy – 1,5 - 2,5 cm² azotan srebra, anilina } silny odczyn

+ iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy – 1,0 - 1,5 cm² azotan srebra, anilina } średni odczyn

± iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy do 1,0 cm²; z azotanem srebra – odczyn dodatni, z anilina – słaby

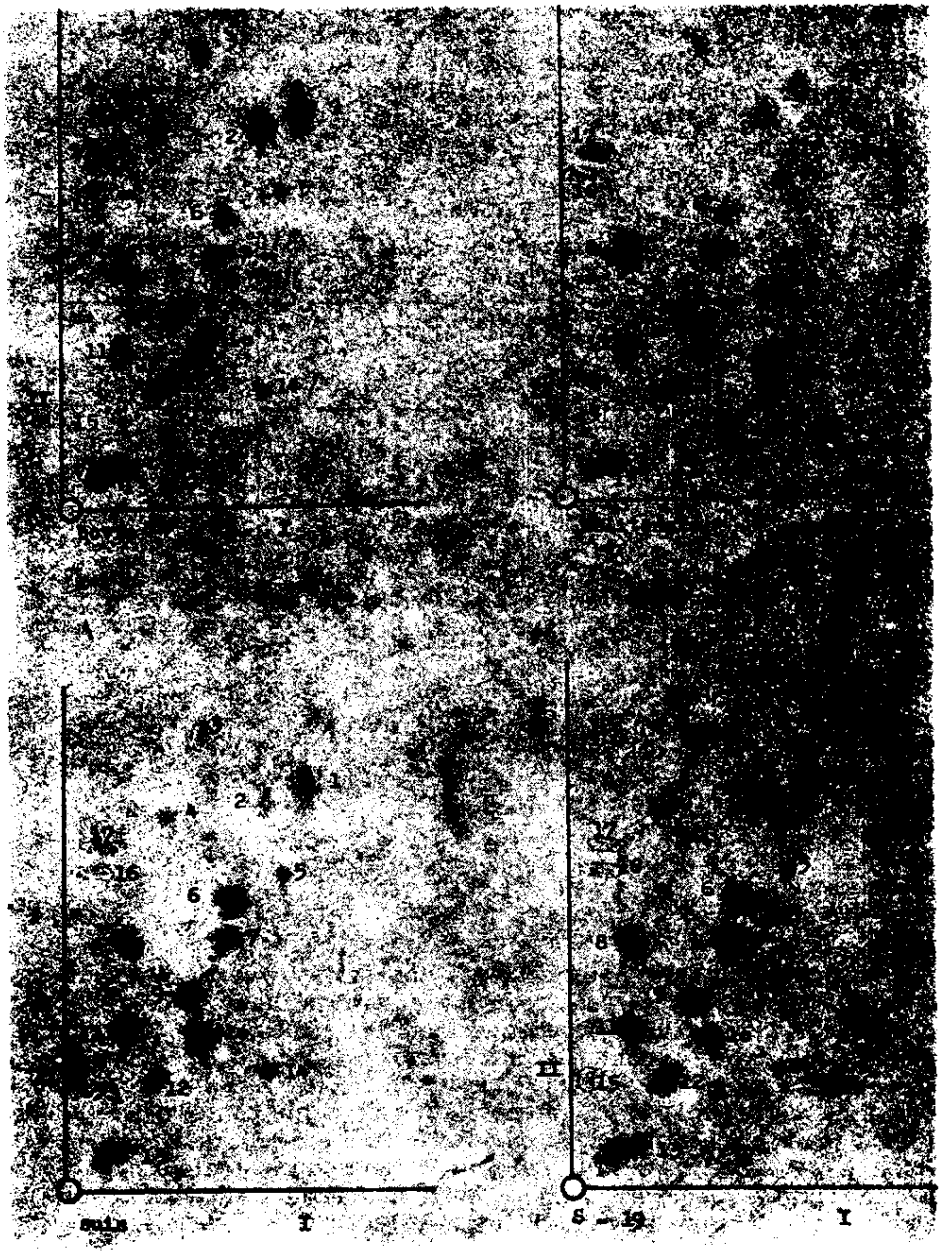
:: iloczyn poprzecznej i podłużnej osi plamy – 1,0 cm²; azotan srebra – odczyn dodatni, anilina – wątpliwy

Skład aminokwasowy hydrolizatów frakcji białkowej *P. multocida*, *P. rodentium* i *P. tularense* jest podobny do składu hydrolizatów *Brucella*. Jedynie tylko wielkość plam poszczególnych aminokwasów jest różna, zwłaszcza argininy, histydyny, tryptofanu, cystyny i tyrozyny, które pojawiają się wyraźnie dopiero po naniesieniu na chromatogram trzykrotnie większych ilości substratu niż u *Brucella*. Widzimy zatem, że skład jakościowy aminokwasów *Brucella* i *Pasteurella* jest podobny; na podstawie wielkości plam można jedynie przypuszczać, że różnice (jeśli występują), dotyczą raczej składu ilościowego. Należy więc przyjąć, że frakcje białkowe badanych drobnoustrojów są podobne; o zasadniczych różnicach bez przeprowadzenia oznaczeń ilościowych badanych frakcji mówić nie można.

Jak widać z tabeli I i z rysunku 3 — hydrolizaty frakcji wielocukrowej sympleksów białkowo-cukrowych *Brucella* oraz *P. tularense*, *P. rodentium* i *P. multocida* — wykazują szereg plam redukujących acetonowy roztwór azotanu srebra i barwiących się na brunatno i różowo po zastosowa-

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8



Rys. 4. Chromatogramy hydrolizatów frakcji białkowej *Brucella*

Fig. 4. Chromatograms of hydrolysate of proteide fraction of *Brucella*

1 — izoleucyna, leucyna, fenyloalanina, 2 — metionina, walina, 3 — prolina, 4 — tryptofan, 5 — tyrozyna, 6 — alanina, 7 — treonina, 8 — lizyna, 9 — glikokol, 10 — seryna, 11 — ?, 12 — kwas glutaminowy, 13 — kwas asparaginowy, 14 — ?, 15 — cystyna, 16 — arginina, 17 — histydyna.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

niu butanolowego roztworu aniliny. Plamy na chromatogramie odpowiadają umiejscowieniem i zabarwieniem cukrom kontrolnym: glikozie, galaktozie, glikozaminie, mannozie (lub fruktozie i arabinozie), ksylozie i 2 nieokreślonym substancjom, z których jedna umiejscowiona jest blisko linii startowej chromatogramu (plama a) a druga poniżej spływu ksylozy (plama b).

TABELA II

Hydrolizat frakcji białkowej sympleksów białkowo-cukrowych
Analyses of the hydrolysate of protein fraction of glicoproteide-symplexes

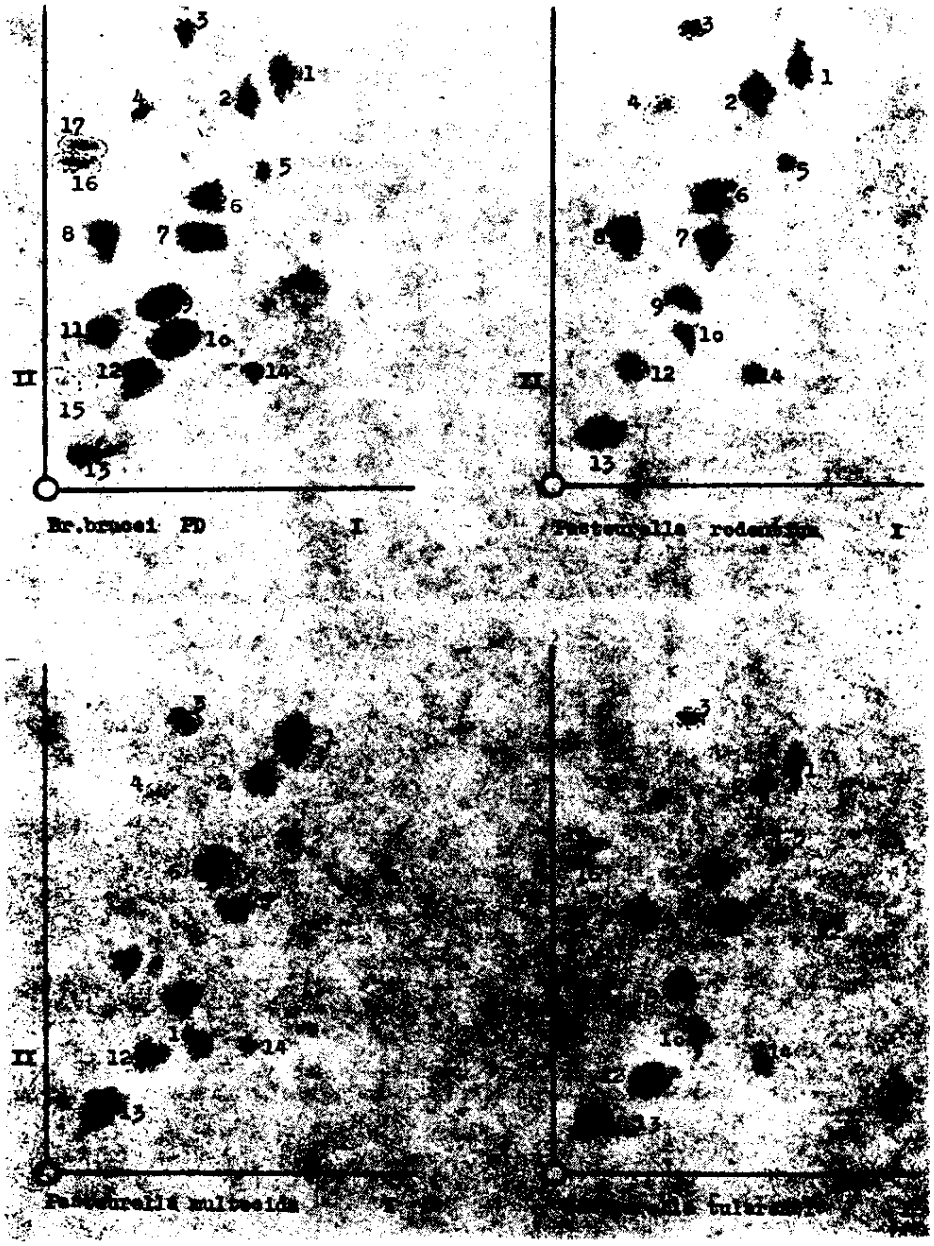
Aminokwasy Aminoacids	*Brucella brucei*					*Pasteurella*		
	bovis	*suis*	*melitensis*	*S - 19*	*PD*	*tularense*	*rodentium*	*multocida*
Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	±	±	±	±	±	±	±
Cystyna	–	–	–	–	–	–		–
Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikokol	+	+	+	+	+	+	+	+
Histydyna	±	+	±	±	±	±	±	±
Lizyna	+	+	+	+	+	+	±	+
Leucyna, izoleucyna, fenyloalanina	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrozyna	–	+	+	+	+	+	+	+
Tryptofan	–			+	+	+	–	
Walina, metionina	+	+	+	+	+	+	+	+
Seryna	+		+	+	+	+	+	+
Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+
Nieoznaczone Not determined			+		+	+	–	+

Na chromatogramie hydrolizatów sympleksów *Brucella* wyraźnie występuje 5 plam redukujących acetonowy roztwór azotanu srebra, z których cztery odpowiadają umiejscowieniem cukrom kontrolnym, glikozaminie, galaktozie, glikozie i mannozie (lub fruktozie i arabinozie). Plama umiejscowiona na wysokości spływu mannozy, w reakcji z aniliną zabarwia się brunatno, co przemawia za obecnością heksoz a nie pentoz w tej plamie. Plama piąta, oznaczona na chromatogramie literą „a", nie została określona z powodu braku czystych związków redukujących o tak niskim współczynniku R_F i bardzo małej ilości materiału badanego, co nie pozwoliło na przeprowadzenie badań własności fizyko-chemicznych tego związku po eluowaniu z chromatogramu. Biorąc pod uwagę dane z piśmiennictwa dotyczące chromatografii związków redukujących można by przypuszczać, że plama ta odpowiada umiejscowieniem jakiemuś z kwasów heksuronowych.

Różnice wielkości i intensywności zabarwienia plam związków redukujących w grupie *Brucella* pozwalają przypuszczać, że w składzie ilościo-

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8



Rys. 5. Chromatogramy hydrolizatów frakcji białkowej *Brucella* i *Pasteurella*.
Fig 5. Chromatograms of hydrolysates of proteide fraction of *Brucella* and *Pasteurella*
Objaśnienia jak do rys. 4

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

wym, we wzajemnych stosunkach ilościowych poszczególnych cukrów tworzących wielocukrowiec, a może w ich położeniu przestrzennym, a więc w strukturze samego wielocukrowca (a nie w składzie jakościowym), tkwić może między innymi istota odrębności poszczególnych odmian: *bovis, melitensis, S-19* i *PD* pałeczek *Brucella brucei*.

Wielkość i intensywność zabarwienia plam na chromatogramach trzech związków redukujących, umiejscowionych na miejscu spływu glikozaminy, galaktozy i mannozy jest różna (tabela I).

Obrazy chromatograficzne frakcji cukrowej *P. tularense* i *P. multocida* wykazują duże podobieństwo. Pałeczki te zawierają więcej związków redukujących aniżeli *Brucella*. Chromatogramy hydrolizatu frakcji cukrowej tych pałeczek wykazują obecność dwu związków nie występujących u *Brucella*, które umiejscowieniem odpowiadają ksylozie oraz związkowi nieoznaczonemu o większym niż ksyloza współczynniku rozdziału (ryboza?).

Chromatogram hydrolizatu frakcji cukrowej *P. rodentium* wykazuje obecność tylko trzech wyraźnych plam, odpowiadających plamom „a". 3 i 4 hydrolizatów frakcji wielocukrowej *Brucella, P. tularense* i *P. multocida*, oraz nieznaczne zaciemnienie na wysokości spływu galaktozy (tabela I, rysunek 1).

2. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KATALIZY I UREAZY*

Huddleson (1942) stwierdził, że zjadliwość *Brucella* jest w pewnym stopniu skorelowana z aktywnością katalazy. Według niego *B. suis* zawiera największą ilość katalazy, *B. bovis* najmniej, zaś *B. melitensis* zajmuje miejsce pośrednie.

Brucella (faza *S*) hodowano na agarze wątrobowym skośnym przez 48 godzin w 37°. Bakterie zawieszano w 0,05-procentowym roztworze tryptozopeptonu w 0,5-procentowym NaCl uprzednio autoklawowanym i przesączonym na krótko przed użyciem (*pH* 6,9 - 7,00). Gęstość zawiesiny oznaczano według skali Browna, dobierając ją tak, aby ilość bakterii w 1 ml wahała się od $6{,}9 \cdot 10^8$ do $7{,}7 \cdot 10^8$. 5 ml zawiesiny przenoszono do kolby Erlenmayera, dodawano 15 ml 1/15 N H_2O_2. Kolbkę z zawiesiną przenoszono do trzęsawki i poddawano drganiom 120 na minutę przez 20 minut w 20 - 25°. Z wytrząsanej probówki pobierano 5 ml płynu, dodawano 3 ml H_2SO_4 rozcieńczonego wodą w stosunku objętościowym 4 ml stężonego H_2SO_4 na 1 ml H_2O, a następnie miareczkowano pozostałą ilość H_2O_2 0,1 N nadmanganianem potasu.

Aktywność katalazy przeliczano w stosunku do 100 ml 0,1 N $KMnO_4$. Wyniki podawano jako średnią trzech oznaczeń: w każdej serii oznaczeń robiono 6 prób kontrolnych.

Ureazę oznaczano przy pomocy próby z czerwienią fenolową (Chodkowski i Parnas, 1956). Skład podłoża: 4% mocznika, 4,8% $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$, 1,8% KH_2PO_4, 0,02% wyciągu drożdżowego, 0,002% czerwieni fenolowej, *pH* 6,8. Pożywkę sączono przez filtr Berkefelda. Do probówki aglutynacyjnej wlewano 1 ml zawiesiny *Brucella* (hodowla świeża o gęstości około 10^9 w 1 ml), a następnie wprowadzano 1 ml pożywki, wstawiano do łaźni wodnej o ciepłocie 37°. Następnie notowano czas po jakim wystąpiło różowe zabarwienie podłoża. *B. melitensis* i *B. bovis* wywołują zabarwienie różowe po 55 minutach, natomiast *B. suis* zmienia barwę podłoża już po kilku minutach.

Aktywność katalazy i ureazy badanych szczepów podaje sumarycznie tabela III.

* W badaniach nad ureazą udział brał mgr H. Hryniewicz.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

TABELA III

Aktywność katalazy i ureazy badanych szczepów
Catalase and urease activity of examined strains

Odmiana Varietas	Aktywność katalazy* Catalase activity			Aktywność ureazy (w minutach) Urease activity (minutes)		
	Średnia average	od from	do to	Średnia average	od from	do to
B. bovis	57,8	14,3	77,0	53	2	150
B. bovis atypowa	69,1	64,5	74,0	78	2	150
B. suis	78,5	70,0	84,0	2	2	3
B. suis atypowa	69,7	57,2	78,7	3	2	4
B. melitensis	60,4	56,9	79,1	47	3	85

Szczepy o znanej dużej wirulencji dały następujące wyniki:

	Katalaza	Ureaza
Odmiana *bovis Nr 24*	65,9	32
odmiana *bovis Nr 554*	63,4	30
odmiana *suis Nr 1330*	84,0	3
odmiana *melitensis Nr 16*	79,1	85

Aktywność katalazy i ureazy szczepów niezjadliwych odmiany *bovis* wygląda następująco:

	Katalaza	Ureaza
S-19 122 R	14,3	·
S-19 122 S	21,5	2
BA	54,7	·
BA S	71,4	·
PD	42,7	110

Wbrew zapatrywaniom Huddlesona nie stwierdziliśmy zależności pomiędzy aktywnością katalazy a przynależnością odmianową lub zjadliwością badanych szczepów. Wykazują to wyraźnie dane zestawienia. Zależność taką spostrzegamy natomiast odnośnie aktywności ureazy, co zgodne jest z danymi innych autorów. Istotnie szczepy *B. suis* odznaczają się niską aktywnością ureazy. Szczepy *B. bovis* i *B. melitensis* natomiast wykazują dużą aktywność ureazy.

3. WŁASNOŚCI SEROLOGICZNE I ALERGICZNE SYMPLEKSÓW UZYSKANYCH Z *BRUCELLA*

A. W trakcie poszukiwania najbardziej aktywnego antygenu do odczynu wiązania dopełniacza, cechującego się dużą swoistością, uzyskano frakcję białkowo-wielocukrową (Parnas i Stępkowski, 1949). Tabela IV przedstawia wyniki badań porównawczych, nad siłą antygenową różnych preparatów.

Z tabeli wynika, że frakcje wielocukrowe są najlepszymi antygenami do odczynu wiązania dopełniacza.

* W przeliczeniu na 100 ml 0,1 N $MKnO_4$.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Staraliśmy się (wspólnie z Łazugą) wprowadzić odczyn hemaglutynacji do diagnostyki brucelozy ludzi i zwierząt. Metodykę badań opracowano na podstawie metody Dubosa-Middlebrooka. Do opłaszczania krwinek użyto 4 antygenów otrzymanych z *Brucella* odmiany *bovis*: I. frakcję białkowo-cukrową, II. frakcję białkową, III. frakcję cukrową, IV. antygen *B. bovis* stosowany przy odczynie wiązania dopełniacza (wyciąg wodny).

Pierwsze trzy frakcje otrzymane zostały z hodowli *Brucella bovis*. Materiałem wyjściowym był acetonowy dezintegrat, z którego frakcję I (białkowo-cukrową) otrzymano drogą hydrolizy kwaśnej. Dezintegrat zadano 5-procentowym kwasem trójchlorooctowym i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godzin. Następnie roztwór odwirowano, osad odrzucono, płyn poddano 36-godzinnej dializie w obecności toluolu. Po dializie płyn zagęszczono w 40° pod zmniejszonym ciśnieniem (20 do 40 mm Hg) do 1/3 objętości początkowej. Zagęszczony płyn zadano 5-krotną objętością 98-procentowego etanolu. Po 24 godzinach oddzielono strącony osad od płynu przez wirowanie. Osad przemyto alkoholem, acetonem i eterem oraz wysuszono w eksykatorze próżniowym w 20°. Otrzymany biały proszek w wodnych roztworach daje dodatnie reakcje ogólne na białko i cukry (Piotrowski, Heller, Molisch). Proszek ten nazwano frakcją I białkowo-cukrową.

Frakcję II i III otrzymano z rozbicia frakcji białkowo-cukrowej, stosując łagodną kwaśną hydrolizę. Frakcję I zadano N/10 kwasem octowym w stosunku 1 : 100 i podgrzewano przez 4 godziny na wrzącej łaźni wodnej, po czym odwirowano. Osad przemyto wodą, alkoholem, acetonem i eterem, a następnie wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymany biały proszek po rozpuszczeniu daje silne reakcje na białko (biuretowa Piotrowskiego, Hellera, sulfosalicylowa) oraz słabą reakcję na węglowodany (Molischa). Osad ten nazwano frakcją II białkową.

Płyn zadano bezwodnym acetonem w stosunku 1 : 5 i po 24 godzinach odwirowano. Osad po przemyciu alkoholem, acetonem i eterem wysuszono w temperaturze 20° w eksykatorze próżniowym. Suchy proszek koloru kremowego rozpuszczony w wodzie daje silny odczyn Molischa na węglowodany i słaby na białka Piotrowskiego. Osad ten jest frakcją III, nazwaną cukrową.

Antygen stosowany do odczynu wiązania dopełniacza otrzymano w następujący sposób: 3 - 4-dniową hodowlę *Brucella* spłukano 10 ml 0,85-procentowego roztworu soli kuchennej; zawiesinę wstrząsano przez 24 godziny z perełkami szklanymi, po czym gotowano przez 20 minut na łaźni wodnej. Po ostudzeniu zawiesinę sączono przez azbest; płyn o bursztynowym zabarwieniu po wymiareczkowaniu używano do odczynu wiązania dopełniacza.

Tabela V przedstawia wyniki odczynu hemaglutynacji z różnymi antygenami (I, II, III i IV). Wyniki te świadczą, że antygen używany do odczynu wiązania dopełniacza wywołuje hemaglutynację z surowicami dodatnimi w wysokich mianach: 1/64, 1/128, natomiast sympleksy o własnościach antygenowych (I, II, III) wywołują odczyn hemaglutynacji w niskich mianach: 1/8, 1/16, 1/32, albo dają wyniki ujemne. Antygen stosowany w odczynie wiązania dopełniacza (IV) wywołuje jednak zjawisko hemaglutynacji również z surowicami ujemnymi (lub co najwyżej wątpliwymi) w mianach 1/32, 1/64 i wyższych. Fakty te wskazują na nieswoistość odczynu hemaglutynacji przy użyciu na pozór bardzo czułego antygenu (IV). Antygeny I, II i III zachowują się z surowicami ujemnymi swoiście.

Czułość i swoistość odczynu hemaglutynacji przy brucelozie zależy w głównej mierze od antygenu używanego do uczulenia krwinek. Najlepsze wyniki otrzymano przy użyciu frakcji zwanej białkowo-wielocukrową. Najmniej swoisty okazał się antygen IV używany do odczynu wiązania dopełniacza (wyciąg wodny *Brucella*). Frakcja białkowa i cukrowa, uzyskane przez nas, okazały się mało czułe i mało swoiste. Prawdopodobnie oczyszczanie antygenu powoduje utratę swoistości.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Odczyn hemaglutynacji może być zatem użyty do diagnostyki brucelozy jako odczyn uzupełniający odczyn Wrigtha i odczyn wiązania dopełniacza.

Starano się również zastąpić alergen komórkowy preparatami chemicznymi. Wykonano w tym celu próby porównawcze z bruceliną *PS* i *PD* oraz poszczególnymi frakcjami uzyskanymi z *Brucella*. Do badań użyto frakcji białkowo-wielocukrowej, wielocukrowej i frakcji używanej do odczynu wiązania dopełniacza (otrzymywanych tak, jak do odczynu hemaglutynacji).

Frakcja II (białkowa) okazała się dobrym antygenem i wywoływała dodatnie odczyny serologiczne trwające przez 8 tygodni. Frakcja I (biał-

TABELA IV

Aktywność preparatu z odmiany *bovis* w odczynie wiązania dopełniacza
Antigenic characteristics of *B. bovis* preparations in complement fixation test

Sposób otrzymania preparatu The method of preparation	Stopień rozcieńczenia antygenu w % Dilution of the antigen per cent								
	0,5	1	3	5	8	10	15	20	25
Rozbijano mechanicznie, komórki odrzucano Mechanical desintegration, supernatant fluid	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Rozbijano przez zamrażanie i odtajanie, komórki odrzucano Freezing and thawing, supernatant fluid	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Zawiesina wyjaławiana w autoklawie (115°) przez 20 minut i sączona Autoclaved (115°) for 20' and filtered	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa I Polysaccharide fraction I	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa II Polysaccharide fraction II	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Frakcja wielocukrowa III Polysaccharide fraction III	–	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++
Frakcja białkowa I Protein fraction I	–	–	–	–	–	+	++	+	+++
Frakcja białkowa II Protein fraction II	–	–	–	–	–	+	++	++	+++
Abortyna radziecka Abortine	–	–	–	–	–	+	++	++	+++

Doświadczenia przeprowadzono wspólnie z S. Stępkowskim.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

TABELA V

Odczyn hemaglutynacji z różnymi antygenami *Brucella* odmiana *bovis*
Hoemagglutination test — various antigens of *Brucella* variant *bovis*

Nr badanej surowicy bydlęcej Serum No	Odczyn Wrighta Agglutination test (titer)	Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation test	Odczyn hemaglutynacji Hoemagglutination test — frakcja - fraction			
			wielocukrowo-białkowa glicoproteide	białkowa proteide	wielocukrowa polysaccharide	antygen do O.W.D. antigen for rutine complement fixation test
2	1/200 +	—	—	—	—	1/16
3	1/100 +	+	1/16	1/16	1/16	1/28
4	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/32
5	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/32
6	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/8
7	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/32	1/32
8	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/128
9	1/100 ±	+	—	—	—	1/16
11	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/8	1/64
13	1/200 ±	—	1/8	1/8	1/16	1/128
14	1/800 +	+	1/32	—	1/8	1/32
15	1/200 +	—	—	—	1/8	1/32
16	1/100 +	+	1/16	1/8	1/16	1/32
17	1/200 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/16
19	1/200 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/128
20	1/200 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/32
21	1/400 ±	—	—	—	—	1/16
22	1/200	+	1/8	—	1/8	1/32
23	1/200 +	—	1/16	1/8	1/32	1/32
24	1/200 ±	—	1/8	—	—	1/32
26	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/16	1/128
27	1/200 +	—	1/8	1/8	1/8	1/32
28	1/800 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/64
29	1/400 ±	+	1/16	1/16	1/13	1/64
30	1/800 +	—	1/8	1/8	1/8	1/32
31	1/100 +	—	1/8	1/8	1/8	1/32
32	1/800 +	+	1/16	1/8	1/16	1/64
33	1/800 +	+	1/16	1/16	1/32	1/128
34	1/100 +	—	1/8	1/8	1/8	1/32
35	1/200 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/64
36	1/200 +	+	1/8	1/8	1/16	1/32
37	1/100 +	+	1/8	1/8	1/8	1/32
38	1/400 +	+	1/8	1/8	1/16	1/64
43	1/400 +	+	1/8	1/8	1/16	1/64
44	1/200 +	+	1/8	1/8	1/8	1/128
45	1/400 +	—	—	—	1/8	1/32

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Nr badanej surowicy bydlęcej Serum No	Odczyn Wrighta Agglutination test (titer)	Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation test	Odczyn hemaglutynacji Hoemagglutination test — frakcja - fraction: wielocukrowo-białkowa glicoproteide	białkowa proteide	wielocukrowa polysaccharide	antygen do O.W.D. antigen for rutine complement fixation test
47	1/25 +		-	-	1/8	1/64
48	1/200 +		1/8	1/8	1/8	1/64
49	1/50 +		1/8	1/8	1/8	1/128
51	1/100 +	—	1/8	1/8	1/8	1/16
52	1/200 +	—	1/8	1/8	1/16	1/32
53	1/100 +		1/8	1/8	1/8	1/32
56	1/100 ±		1/8	1/8	1/16	1/32
57	1/800 ±	+	1/16	1/8	1/8	1/64
58	1/800 ±	+	1/8	1/8	1/16	1/128
59	1/800 +	+	1/8	1/8	1/8	1/32
63	1/100 ±	—	1/8	1/8	1/8	1/32
65	1/100 ±	—	1/8	—	—	1/8
Surowice kontrolne — Control sera						
71	—	—		—	—	1/16
72		—	—	—	—	1/16
73				—	—	1/16
74			—	—	1/8	1/16
75			—	—	—	1/16
76				—	—	1/16
77		—	—	—	1/8	—
78				1/8	1/8	1/16
79	—		—	1/8	1/8	1/16
80			—	—	—	1/32

Doświadczenia przeprowadzono wspólnie z K. Łazugą.

kowo-cukrowa) jest słabo antygenowa (ujemny wynik odczynu wiązania dopełniacza i szybsze — do 5 tygodni — wygasanie odczynu zlepnego).

Frakcja III (wielocukrowa) jest najsłabszym antygenem.

Po podskórnym wprowadzeniu uczulonym królikom tych frakcji oraz bruceliny *PS* i *PD* stwierdzono, że wyodrębnione sympleksy (frakcje I, II, III i IV) ustępują czułością brucelinie *PS* i *PD* i nie nadają się do odczynu Burneta.

Następnie sporządzono jeszcze dwie frakcje alergenowe, mianowicie *M* i *MM*. Przemytą masę bakteryjną zadawano 200-krotną objętością 5-procentowego kwasu octowego, pozostawiając w temperaturze 20° przez 24 godziny, gotowano przez 10 minut, a następnie wirowano. Otrzymany

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

płyn oddzielano od osadu, nastawiano na *pH* 4 i zadawano acetonem w stosunku 1 : 1. Po 48 godzinach wirowano, otrzymany osad przemywano i wysuszano. Suchy proszek rozpuszczano w jałowej wodzie destylowanej o *pH* 7 z dodatkiem 0,5-procentowego fenolu. Tak otrzymany roztwór stanowił alergen *M*.

Osad po gotowaniu z kwasem octowym zadawano N/10 HCl, gotowano przez 25 minut pod chłodnicą zwrotną, a następnie wirowano. Płyn z nad osadu doprowadzano do *pH* 4,5. Otrzymano przy tym osad, który przemywano acetonem i suszono w suszarce w 80°. Suchy proszek rozpuszczano w jałowej destylowanej wodzie z dodatkiem 0,5% fenolu. Tak otrzymany roztwór stanowił alergen *MM*.

Wyniki ilustruje tabela VI.

TABELA VI

Odczyny alergiczno-skórne u królików zakażonych brucelą
Allergic skin test in infected rabbits

Nr królika Rabbit N°	Brucelina *PS* i *PD*	P.E.B.A.*	Alergen *M*	Alergen *MM*
1	+	−		
2	++			
3	++	−		−
4	+	+−		
5	+	+−		−
6	+++	+−		−+
7	++			
8	+			
9	+	−		−
10	−	−		−
11	++	+		−
12	++	−	−	
13	+	+	−	
14	−			
15	+	+	−	−
16	+−	+−		
17	+	−		−
18	+−	+−		

* Alergen duński Pluma i Ottosena, odpowiadający preparatowi Huddlesona.

Widoczne jest, że najczulszym alergenem jest brucelina *PD*, co potwierdziły dalsze eksperymenty tu nie referowane oraz badania kliniczne.

Badania te są nadal kontynuowane.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

LITERATURA

1. Chodkowski A. i Parnas J., 1956: Badania nad odmianami pałeczek *Brucella* występującymi w Polsce. *Annales UMCS, S DD.*, w druku.
2. Dambovicenau A., Barber C., Marinov I., 1938: Complete antigen of the *Brucella*, Chemical characteristics. *Compt. rend. soc. biol.*, **127** : 736.
3. Dubrowska I. I., 1950: Antigieny *Brucella suis*. Wydielenije, oczistka i chimiczeskaja charakteristika, *Biochimia*, **15** : 490.
4. Dubrowska I. I., 1951: Gidroliz antigiennogo kompleksa *Brucella suis* i chimiczeskaja priroda komponientow. *Biochimia*, **16** : 41.
5. Dubrowska I. I., 1954: Srawnitielnoje chimiczeskoje isledowanije antigienowych kompleksow brucell raznych tipow. *Biochimia*, **19** : 137.
6. Huddleson I. F., 1942: Brucellosis in Man and Animals, New York.
7. Huston R. C., Huddleson I. F., Hershey A. D., 1934: The chemical separation of some cellular constituents of the *Brucella* group of microorganisms. *Michig. Coll. Agr. Expt. Sta. Techn. Bull.* N° 137.
8. Lisbonne H., Monnière P., 1936: Some properties of the complete (Boivin) antigen of *Br. melitensis*. *Compt. rend. soc. biol.*, **123** : 1114.
9. Opieńska-Blouth J., Madecka-Borkowska I., 1950: Rozdzielanie cukrów o zbliżonym współczynniku *R* z mieszanin metodą chromatografii bibułowej. *Acta Physiol. Polon.*, **1** : 134.
10. Mikulaszek E., 1951: Immunologicznie czynne wielocukrowce, Kraków.
11. Miles A. A., Pirie N. W., 1939: The properties of antigenic preparations from *Brucella melitensis*. I. Chemical and physical properties of bacterial fractions. *Brit. J. Exp. Path.*, **20** : 63, 83, 109.
12. Miles A. A., Pirie N. W., 1939: The properties of antigenic preparations from *Brucella melitensis*. IV. Hydrolysis of the formamino linkage. *Biochem. J.*, **23** : 1708, 1716.
13. Parnas J., Stępkowski S., 1949: Badania rozpoznawcze w przebiegu brucellozy w Polsce. *Annales UMCS, S DD*, **2** : 147.
14. Parnas P., Łazuga K., Mierzejewski T., 1953: Próba zastosowania odczynu hemaglutynacji w diagnostyce brucellozy. *Annales UMCS, SD*, **5** : 25.
15. Parnas J., Mierzejewski T., Feltynowski A., Łazuga K., 1956: Badania porównawcze nad właściwościami pałeczek: *Pasteurella tularensis*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella rodentium* i *Brucella brucei*. *Annales UMCS, SD*, w druku.
16. Paterson J. S., Pirie N. W., Stableforth A. W., 1947: Protective antigens isolated from *Br. abortus*, *Brit. J. Exp. Path.*, **28** : 223.
17. Penell R. B., 1950: Brucellosis. The chemistry of *Brucella* organisms, Washington.
18. Renoux-Machaffey, 1955: World Health Organisation. Bull. **12**.

J. Parnas and *T. Mierzejewski*

BIOCHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON *BRUCELLA*

Summary

Strains of *Brucella brucei var. bovis (B. abortus), suis, melitensis* and of *Pasteurella tularense, P. rodentium* and *P. multocida* were studied.

The polysaccharide-protein symplexes were extracted from the bacterial cells, hydrolysed and examined by paper chromatography.

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8

The aminoacid composition of proteide fraction of symplexes isolated from *Brucella* and *Pasteurella* cells was similar (table II, fig. 4, 5).

There was noted some differences in polysaccharide fractions of examined variants of *Brucella* and of *Pasteurella* strains (table I, fig. 3).

In connection with the observations of Huddleson on the correlation between the virulence and the activity of catalase and urease in the *Brucella* strains — this activity was studied in strains of *B. abortus*, *B. bovis* and *B. suis*. No correlation between virulence and catalase or urease activity was observed (table III). Nevertheless there was some difference in the ability to decompose urea between *B. suis* on one side and *B. abortus* and *B. melitensis* on the other side.

The antigenic properties of isolated fractions were also examined. The polysaccharide fraction was shown to be a hapten, specially suitable for complement fixation test (table IV).

The polysaccharide-protein symplex was antigenic and good results were obtained with it in haemagglutination test (table V).

These preparations were not suitable for allergic skin test in brucellosis (table VI).

Approved For Release 2008/04/29 : CIA-RDP80T00246A003800210009-8