Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XXXI, knj. 12.

Grin, Ernest

1966

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/60a95f89-de4e-4373-a768-3d02caca85d9

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXXI

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

KNJIGA 12.

ANU BiH АНУ БиХ

Urednik
ERNEST GRIN,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1966

ZLATKO FORŠEK i ANTE NEVJESTIĆ

KORPUSKULARNI ANTIGENI U MIKROAGLUTINACIJSKOM TESTU KOD ENZOOTSKOG POBAČAJA OVACA

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka, održanoj 12. II 1968. god.)

U dijagnostici enzootskog pobačaja ovaca, kao i kod ostalih infekcija mikroorganizmima iz grupe Miyagawanella, serološka ispitivanja imaju veliki značaj, posebno u otkrivanju inficiranih životinja kod kojih infekcija protiče u klinički neizraženom obliku. U serološkim postupcima najčešće se koristi reakcija vezanja komplemenata (RVK), kojom se i pored pouzdanih rezultata u dijagnostici infekcija izazvanih Miyagawanellama ipak ne postižu zadovoljavajući rezultati, jer daje pozitivne reakcije ne samo sa tipski specifičnim uzročnicima nego i unakrsne reakcije sa svim članovima ove grupe mikroorganizama. Primjenjujući RVK kod infekcija sa različitim članovima Miyagawanella mikroorganizmima, mnogi su autori (Barwell i Bishop (2), Parker (14), Terzin i sarad. (15), Paccaud i sarad. (13) i dr.) sa serumima raznovrsnih životinja dobili visoki procenat pozitivnih reakcija ne samo sa homolognim antigenima nego i sa antigenima ostalih mikroorganizama ove grupe. Ovakvi rezultati proističu iz činjenice što svi mikroorganizmi ove grupe posjeduju zajedničke termostabilne grupne i tipski specifične termolabilne antigene od kojih bi se potonji u RVK mogli dokazati samo primjenom imunih seruma iz kojih su grupna antitijela uklonjena adsorpcijom ili destrukcijom grupnih antigena.

Faye (4) je još 1958. godine utvrdio da RVK nije najpodesnija niti za rutinsku dijagnostiku enzootskog pobačaja ovaca nakon što su Monsur i Barwell (8) dokazali da i uzročnik enzootskog pobačaja ima također grupni stabilni i tipski specifični termolabilan antigen od kojih je tipski specifična komponenta mnogo manje aktivna i brzo gubi svoje djelovanje.

Metode aglutinacije (CA, DF, MA) pokazale su se kod mnogih članova Miyagawanella mikroorganizama specifičnijima od RVK, a osobito je kod rikecijskih infekcija utvrđeno da je mikroaglutinacijski test (MA) veoma specifičan i osjetljiviji od RVK (Babudieri (1), Ormsbee (12) i dr.). Na osnovu tih nalaza steklo se uvjerenje da će se poteškoće koje se pojavljuju kod RVK moći ukloniti primjenom aglutinacijskih testova i to tim više što su aktivni i sa termolabilnim komponentama antigena. Međutim, u praktičnoj primjeni tehnike aglutinacija, koje su do sada bile opisane kod mamalnih i aviarnih sojeva Miyagawanella kao i kod

rikecijskih infekcija (1, 3, 6, 12), osnovnu poteškoću predstavlja adekvatno dobivanje maksimalno purificiranih i koncentriranih antigena. U ovom dijelu naših studija o antigenim strukturama Miyagawanella mikroorganizama osvrnut ćemo se na kvalitete purificiranih korpuskularnih antigena (7, 12, 18) koje smo u toku posljednjih godina ispitivali i primjenjivali u mikroaglutinacijskom testu u dijagnostici Miyagawanella ovis infekcije kod enzootskog pobačaja ovaca.

MATERIJAL I METODE RADA

Za purifikaciju antigena i MA test upotrijebljen je soj Miyagawanella ovis K-8 izoliran iz plodnih ovojnica ovce koja je pobacila, a potjecala iz stada u kojem su se javili mnogobrojni pobačaji. Soj je nakon višekratnih serijskih pasaža, upotrebom 6 dana starih embrioniranih kokošijih jaja, zadobio ustaljenost u ubijanju embriona (4—6 dana), a u tkivu žumanjčanih membrana stvarao konstantno visoku koncentraciju namnoženih mikroorganizama.

Kao početni materijal za pripremanje korpuskularnog antigena služile su žumanjčane membrane, odnosno žumanjak embrioniranih kokošjih jaja inficiranih u žumanjčanu vreću sa 0,2 ccm 10^{-1} do 10^{-2} razrijedene suspenzije K-8 soja Miyagawanella ovis.

Imune serume dobili smo od ovaca koje su potjecale iz stada iz kojih je izoliran soj K-8 i kod kojih je ranijim kliničkim i epizootiološkim ispitivanjem ustanovljeno, a ponovljenim serološkim reakcijama (RVK i MA — 10, 11, 12) potvrđeno da u stadu vlada infekcija sa uzročnikom enzootskog pobačaja. Iste serume smo neposredno prije ispitivanja pripremljenih korpuskularnih antigena ponovno ispitali na sadržaj i visinu titra antitijela u RVK.

Antigen za RVK pripremljen je po metodi T e r z i n a i sarad. (16) koncentracijom eter ekstrakta iz grijanih žumanjčanih membrana sa K-8 sojem Miyagawanella ovih inficiranih embrioniranih kokošjih jaja.

Radi stvaranja različito intenzivno formiranih precipitata stvorenih rezidualnim žumanjčanim antigenim supstancama (7), koji mnogu stvarati znatne poteškoće i nejasnoće u procjenjivanju mikroaglutinacijskih reakcija, nismo u ovom ispitivanju pripremali tipski specifične imune serume.

Korpuskularne antigene pripremali smo po slijedećim metodama:

a) Metoda Z d r o d o v s k i j — G o l i n e v i č za purifikaciju rikecija. Inficirane žumanjčane membrane su homogenizirane i suspendirane u fiziološkoj otopini sa 1% formalina i 5% fosfatnog pufera pH 7,0. Nakon držanja u hladioniku tokom 3—5 dana suspenzija je centrifugirana 10 min. na 1500 obrt./min., talogu dodana formol-fiziološka otopina i ponovno centrifugirana. Supernatanti su centrifugirani 2 sata na 5000 obrt./min., a dobivenom centrifugatu dodana fiziološka otopina sa 0,4% formalina i 0,5% fenola u količini od 10 ccm po membrani. Ova suspenzija ostavljena je preko noći na sobnoj temperaturi, a zatim obrađena eterom u lijevku za odvajanje dodajući jednake dijelove etera. Poslije odvajanja slojeva odliven je vodeni sloj i ostatku dodana fiziološka otopina sa formalinom i fenolom. Vodene faze su centrifugirane 2 sata pri 5000 obrt./min. Tretiranje sa eterom ponovljeno je 2—3 puta, a nakon zadnjeg

centrifugiranja talog je resuspendiran u fiziološkoj otopini sa 5% saharoze.

b) Metoda po Ormsbeeu za purifikaciju rikecija. Homogeniziranje žumanjčanih membrana vršeno je uz dodavanje molarne otopine KCl tako da se dobije 20%-tna suspenzija kojoj je nakon 1 sat dodan 35%-tni formaldehid do konačne koncentracije od 0,5%. Suspenzija je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi i zatim dodana molarna otopina KCl da se postigne 10%-tna suspenzija, koja je dobro homogenizirana i procijeđena kroz dvoslojnu gazu, a zatim centrifugirana 15.000 obrt./min. u toku 15 minuta. Poslije centrifugiranja talog je resuspendiran u molarnoj otopini KCl, preliven u epruvete i držan na sobnoj temperaturi 40 min. uz povremeno miješanje. Suspenzija je ponovno centrifugirana 5 min. pri 1500 obrt./min., a supernatant 20 min. pri 17350 obrt./min. Nakon što je talog resuspendiran i temeljito homogeniziran u 0,15% molarnoj otopini NaCl, suspenzija je tretirana eterom u lijevku za odvajanje. Dobivena vodena faza predstavljala je antigen.

c) Metoda Mendlowski-Segreova za purifikaciju Miyagawanella ovis. Za izradu ovog antigena korišten je žumanjak iz žumanjčanih vreća inficiranih embrioniranih kokošjih jaja. Žumanjak je dobro miješan sa dva volumena 2,5 M KH_2PO_4 pH 7,6 i zatim centrifugiran 10 min. pri 1800 obrt./min. Nakon što je izdvojen donji vodeni sloj, žumanjčani sloj resuspendiran je u puferiranoj fiziološkoj otopini pH 7,2 i ostavljen 24 sata na 4° C. Nakon centrifugiranja suspenzije pri 3000 obrt./min. u toku 5 minuta izdvojen je srednji vodeni sloj i dializiran u vodovodnoj vodi kod +5° C tokom 24 sata sa dvokratnim mijenjanjem vode. Nakon dodatka fluorocarbon-trifluorotrichloretana u volumenu za pola manjem od volumena dializiranog žumanjka ponovno je izvršeno homogeniziranje. Homogenat je centrifugiran 5 min. pri 1800 obrt./min. i vodena faza sa tjelešcima mikroorganizma na vrhu služila je kao antigen.

Po svakoj od navedenih metoda dobivene antigene ispitivali smo mikroskopski na koncentraciju i raspored tjelašaca kao i na sadržaj stranih primjesa (tkivo, žumanjak), a zatim im na osnovu gustine određivali konačne koncentracije, koje su se u pravilu postizavale razrjeđivanjem 1 : 2 do 1 : 4.

Mikroaglutinacijski test vršili smo sa 147 imunih seruma ovaca po metodi Pasteurovog instituta u Parizu (19).

REZULTATI

Finalne purificirane suspenzije sve 3 vrsti korpuskularnih antigena bojadisane po May—Grünwaldu ili Stampu mikroskopski su pokazivale dosta ujednačeno raspoređena tjelešca mikroorganizama. Međutim, konstantno najgušća koncentracija tjelešaca bez kontaminacije sa stranim materijama dolazila je jasno do izražaja kod antigena pripremljenog po Ormsbeeu (12). Iako se i kod antigena po metodi Mendlowski—Segre (7) nisu javljale jače nakupine slijepljenih tjelešaca, opažene su prilične količine sitnijih kapljica žumanjčane mase. Pod istim uslovima provjeravanja u antigenu po Zdrodovskij—Golline-

v i č u (18) redovito smo nalazili dosta tkivnih čestica žumanjčanih membrana.

Sa sva 3 korpuskularna antigena u mikroaglutinacijskom testu sa pozitivnim serumima postignuti su oblici reakcije kakvi su opisani u dijagnostičkoj proceduri Pasteurovog instituta u Parizu. Treba ipak istaći da su reakcije i po konstantnoj jasnoći očitanja redovito postignute samo sa antigenom pripremljenim po metodi O r m s b e e, dok su se kod ostala dva antigena često javljale nejasnoće ovisne o stranim primjesama ili nedovoljnoj koncentraciji antigenskih korpuskula.

Ukupno 147 uzoraka konvalescentnih imunih seruma ovaca ispitano je u MA testu sa svakim od 3 korpuskularna antigena (tabela 1).

Tabela 1.

MIKROAGLUTINACIJA 3 KORPUSKULARNA ANTIGENA MIYAGAWANELLA OVIS SA KONVALESCENTNIM SERUMIMA OVACA

Reakcija	Antigen po	Ispitano seruma	Pozitivno		Titri	Srednji titar
			Broj	%		
MA	Zdrodovskij	147	62	42.18	1:20—1:160	36,13
MA	Ormsbee	147	104	70,75	1:20—1:640	66.35
MA	Mendlowski	147	85	58,81	1:20—1:160	43.53
RVK	Terzin	147	108	73,47	1: 4—1:256	16,46

Najveći broj (70,75%) jasnih pozitivnih reakcija (1: 20 i više) kao i najviši titri (1: 640) postignuti su sa antigenom po O r m s b e e u. Ostala dva antigena dala su niži broj pozitivnih reakcija (58,81, odnosno 42,18%), kao i niže titre (1 : 160 sa oba antigena). Kod upotrebe potonja dva antigena (po M e n d l o w s k o m i Z d r o d o v s k o m) svrstani su u negativne reakcije i svi oni oblici kod kojih se, osobito u nižim razrjeđenjima (1: 20) bilo zbog nedovoljne koncentracije tjelešaca, bilo zbog nejasnoća izazvanih primjesama kontaminatnim materijama ili nakupljanja slijepljenih tjelešaca, nije mogla sa sigurnošću determinirati jasna mikroaglutinacija.

Rezultati dobiveni pod uslovima rada sa konvalescentnim imunim serumima u MA testu sa antigenom O r m s b e e i u RVK, uzevši u obzir osnovne karakteristike oba antigena, ukazuju da je korpuskularni antigen u MA testu i dovoljno osjetljiv i dovoljno specifičan.

Sigurno negativni serumi nisu sa niti jednim od 3 antigena stvarali aglutinate. Uočene strane primjese u antigenskim preparatima nisu kod primjene tih seruma stvarale nejasnoće, jer su tjelešca i u takvim slučajevima bila jednolično raspoređena u vidnom polju. Iz tih razloga nismo te rezultate posebno registrirali u tabeli.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

U literaturi je opisano više metoda pripremanja korpuskularnih antigena u aglutinacijskim testovima, ali pretežno kod rikecijskih infekcija kod kojih je MA test najprije i primijenjen (1, 3, 6, 7). Medutim, u procesu pripremanja korpuskularnih antigena ima nekoliko faza obrade

od kojih bitno ovisi kvalitet antigena, a time i osjetljivost aglutinacijskog testa. Ova uslovljavanja, nametnuta prvenstveno nedovoljnom čistoćom i koncentracijom korpuskula u antigenu, mogu se znatno ublažiti izborom početnog izvornog materijala u kojem se razmnožavaju (žumanjčane membrane), ili se nalaze (žumanjak) mikroorganizmi. Najveću količinu homologne populacije tjelešaca Miyagawanella postizavali smo u žumanjčanim membranama kada smo proračunali i upotrijebili takva razrjeđenja infektivnog inokuluma koja su embrione ubijala između 8—10 dana nakon inokulacije. U to vrijeme su mikroskopski u žumanjčanim membranama opažene i pojave najvećeg broja vakuola za koje se smatra da imaju regulatorni utjecaj na rast Miyagawanella (5).

U žumanjku redovito smo utvrdivali manju količinu oslobođenih tjelešaca (mikroskopski i titracijom na embrioniranim jajima). Osim toga, u pripremanju antigena iz žumanjka javljale su se velike poteškoće u uklanjanju žumanjčane supstance, pa su u raznim količinama i oblicima ostajale i u već gotovim preparatima antigena. Pretpostavljamo da su ove pojave bile i osnovni razlog što po metodi M e n d l o w s k i u našim uslovima ispitivanja nismo uspjeli postići dovoljnu purifikaciju i koncentraciju antigena.

Faza purifikacije je druga važna faza u obradi. U toj fazi bitna je komponenta sastav medija u kojem se vrši suspendiranje tkivnog materijala, koji sadrži korpuskule. Važna je u ovom dijelu procesa purifikacije (sa nusdjelovanjem i u smislu efekta koncentracije) postizavanje što veće topivosti kontaminantne materije putem visoke koncentracije soli. Svakako da i kemijski sastav medija, pH i dr., imaju određeni značaj, jer nepuferiranom otopinom NaCl se stvaraju u vodenoj fazi zamućenja koja se u niti jednoj kasnijoj fazi pročišćavanja (dializa, eter, fluorocarbon) ne mogu otkloniti. Uporedo sa molarnim povišenjem otopina soli, prelazi i povećana količina kontaminanata u otopinu. Ove pojave mogu se lako uočiti u promjeni boje i izgledu supernatanta (zbog otapanja kontaminantnog materijala) i smanjenju sedimentiranja kontaminanta (smeđi sloj iznad žućkastog taloga tjelešaca). I u našim ispitivanjima mogli smo potvrditi važnost ove procedure, jer smo najčišće antigene postizavali upotrebom molarne otopine soli (KCl ili NaCl). Striktna primjena veće koncentracije soli u mediju za suspendiranje korpuskula ima vrlo povoljan utjecaj na konačni efekat gustoće (koncentracije) tjelešaca koja se postiže kasnijim centrifugiranjem kod visokog broja okretaja (15 do 17.350 obrt./min.). Iz početnih sedimenata tjelešaca i kontaminantne materije kontaminanti se ne mogu ukloniti niti jednim postupkom ako upotrijebljena koncentracija soli nije bila dovoljno visoka (suspendiranje žumanjčanih membrana, npr., samo u 0,15 molarnoj otopini soli).

Zbog ograničenih vrijednosti epizootiološkog prikaza statusa antitijela (Miyagawanella antitijela u populaciji dom. životinja ovisna je gotovo redovito o sudjelovanju diferentnih serotipova) i već istaknutih nejasnoća reakcije izazvanih precipitatima žumanjčanih antigena u tipski specifičnim serumima, specifičnost korpuskularnih antigena ispitivali smo sa konvalescentnim imunim serumima ovaca.

Specifičnost sva 3 korpuskularna antigena u MA testu utvrđena je dokazivanjem antitijela u konvalescentnim serumima i izostajanjem

aglutinabilnosti antigena sa negativnim serumima. Međutim, u osjetljivosti 3 antigena, utvrđena je znatna razlika koja je, prema našem mišljenju, vezana za izbor izvornog materijala za purifikaciju korpuskula (žumanjčana vreća) kao i za tehniku purifikacije (visoka konc. soli u mediju za suspendiranje) kojom se antigenska tjelešca oslobađaju kontaminantnih materija (slabije reagiranje antigenskih korpuskula koje nisu dovoljno oslobođene kontaminanata).

Mnogi autori su do sada utvrdili veću osjetljivost MA testa od RVK (B a b u d i e r i (1) i W e l s h (17) kod rikecija, M e n d l o w s k i i S e g r e kod enzootskog pobačaja ovaca, B e r n k o p f i sarad. (3) kod mikroorganizma trahoma, M a s o n (6) kod ornitoze pura i dr.) što se, između ostalog, pripisuje aktivnosti specifičnih termolabilnih komponenata antigena, koji se primjenjuju u MA testu. Iako niti te antigene ne treba smatrati u potpunosti tipski specifičnim, oni ipak reagiraju u tom smislu više od testova kod kojih se upotrebljavaju termostabilni antigeni. Premda se rezultati dokazivanja antitijela u MA i RVK testu ne mogu adekvatno i u potpunosti uspoređivati, naši rezultati u ispitivanju kvalitete i specifičnosti korpuskularnih antigena sa konvalescentnim imunim serumima djelomično ukazuju da su ispitivani serumi imali pretežno tipski specifična antitijela Miyagawanella ovis, jer je broj pozitivnih reakcija u RVK i MA sa najosjetljivijim od 3 ispitana antigena (antigen po Ormsbeeu) gotovo se podudarao — 73,47% prema 70,75%, odnosno brojčana razlika iznosila je samo 4 uzorka seruma. Pretpostavljamo da se ta razlika može tumačiti ne manjom specifičnosti MA testa nego više jače izraženom selektivnosti tipski specifičnih termolabilnih antigena u korpuskularnom antigenu. M e n d l o w s k i i S e g r e (7) su u jednom pokusu utvrdili da korpuskularni antigeni tretirani sa eterom posjeduju jače izraženu specijes specifičnu komponentu.

Ovim ispitivanjem ukazali smo da se poteškoće u pripremanju kvalitetnih korpuskularnih antigena za MA test kod enzootskog pobačaja ovaca mogu otkloniti prvenstveno izborom izvornog tkivnog materijala u kojem se razmnožavaju mikroorganizmi, kao i adekvatnom procedurom kojoj se u purifikacionim fazama primjenjuju više koncentracije soli u mediju za suspendiranje korpuskula.

Po rezultatima dobivenim pod uslovima ovih ispitivanja najosjetljiviji od 3 ispitana antigena u MA testu u dokazivanju antitijela enzootskog pobačaja ovaca pokazao se antigen pripremljen po metodi Ormsbee.

ZLATKO FORŠEK and ANTE NEVJESTIĆ

CORPUSCULAR ANTIGENS FOR MICROAGGLUTINATION TEST IN ENZOOTIC ABORTION OF EWES

SUMMARY

Investigations have been made on the preparation of corpuscular antigens of the microorganisms of enzootic abortion in ewes for microagglutination test and the quality of these antigens regarding purity, concentration of bodies of microorganisms, the number of positive reac-

tions with sera of convalescent ewes from infected farms and the titer levels. The antigen which was prepared from yolk sacs by centrifugation-separation was not of good quality. It included a great deal of tissue fragments and a low concentration of bodies of microorganisms. Using fluorocarbon and dialysis it could not be received antigen from the yolk with enough concentration of bodies. Antigen which was prepared from yolk sacs by use of M/1 KCl and high centrifugation (17.350 r. p. m.) was sufficient pure with high concentration of bodies and gave the most of positive reactions with sera of naturally infected sheep (70.75%) in titers up to 1 : 640.

LITERATURA

1. Babudieri B.: Bull. Wld. Hlth. Org., 19, 981—994, 1958.
2. Barwell C. F., Bishop L. W. J.: Nature, 167, 988, 1951.
3. Bernkopf H., Nishni M., Maytar B., Feitelberg I.: J. infect. Dis. 106, 83—86, 1960.
4. Faye P.: Rec. Med. Vet., 134, 351, 1958.
5. Litwin J.: J. infect. Dis., 105, 129—161, 1959.
6. Mason D. M.: J. immunol., 83, 661—666, 1959.
7. Mendlowski B., Segre D.: Amer. J. Vet. Res., 25, 637—645, 1964.
8. Monsur K. A., Barwell C. F.: Brit. J. Exp. Path., 32, 414—421, 1951.
9. Nevjestić A., Foršek Z.: Vet. glas., 12, 1085—1088, 1964.
10. Nevjestić A.: Veterinaria, 14, 3, 347—358, 1965.
11. Nevjestić A., Foršek Z.: Veterinaria, 4, 545—549, 1967.
12. Ormsbee R. A.: J. immunol., 88, 1, 100—108, 1962.
13. Paccaud M. F., Despres P., Poncioni B.: Schweiz. Arch. Thlkunde 105, 294—320, 1963.
14. Parker H. D.: Amer. J. Vet. Res. 21, 243—250, 1960.
15. Terzin A., Hlača D., Fornazarić M.: Ges. Virusforsch., 8, 511, 1958.
16. Terzin A., Matuka S., Fornazarić M., Hlača D.: Acta virol. Prag, 5, 78—85, 1961.
17. Welsh H. H., Jemsem F. W., Lennette E. H.: Am. J. Hyg., 70, 1—13, 1959.
18. Zdrodovskij P. F., Golinevič E. M.: Učenie o riketsiah i riketsiozah, Moskva, 1956.
19. * * * Diagnostic des rickettsioses par la methode de microagglutination des rickettsies sur lame. Institut Pasteur, Paris.