

OCENA METOD CIEPŁEJ I ZIMNEJ ODCZYNU WIĄZANIA DOPEŁNIACZA

Duże trudności napotymane przy klinicznej diagnozie toksoplazmozy przyczyniły się do rozwinięcia laboratoryjnych metod rozpoznawczych. Wiele uwagi, szczególnie ostatnio, poświęca się odczynowi wiązania dopełniacza (OWD). Wykonanie odczynu ulegało często różnym modyfikacjom, w swej zasadzie nie odbiegało jednak od normalnie wykonywanych prób w serologii. Jest to nie tylko próba jakościowa, lecz i ilościowa, pozwalająca na określenie ilości krążących we krwi przeciwciał, co posiada bardzo ważne znaczenie rozpoznawcze.

Badania nad OWD w kierunku toksoplazmozy prowadzimy od r. 1953. Ostatnio odczyn wykonywaliśmy dwoma metodami: ciepłą i zimną. Zasadnicza różnica między nimi polega na tym, że reakcje przebiegają w różnych warunkach: przy metodzie ciepłej reakcja odbywa się w temp. 37°C w łaźni wodnej w ciągu 1 godz.; przy metodzie zimnej — w chłodni przez 18—24 godz. (temp. +4°C). Przeprowadzając równolegle badania surowic metodą zimną i ciepłą staraliśmy się ustalić, która z nich jest lepsza do laboratoryjnej diagnostyki toksoplazmozy.

Przebadaliśmy 287 surowic, w tym 282 surowice ludzkie i 5 surowic króliczych. Odczyn wiązania dopełniacza porównaliśmy w 39 przypadkach z wynikami próby barwnej Sabin-Feldmana i odczynu Frenkela, w 62 przypadkach z wynikami odczynu Frenkela, a w 23 przypadkach tylko z wynikami próby barwnej Sabin—Feldmana.

Ogólne dane dotyczące wykonywania odczynu wiązania dopełniacza:

1) Surowice — inaktywowane 30 min. w 56°C w łaźni wodnej. W dniu wykonywania odczynu surowice reinktywowano (10 min. w 56°C) i rozcieńczano w postępie geometrycznym rozpoczynając od rozcieńczenia 1 : 2.

2) Antygen — posługiwaliśmy się antygenem albo z błon kosmówkowo-omoczniovych, albo z wysięku otrzewnowego myszy. Antygen ujemny pochodził z nie zakażonych błon kosmówkowo-omoczniovych lub śledzion zdrowych myszy. Środkiem konserwującym był fenol 0,25% i merthiolat w rozcz. 1 : 10 000.

TABELA I
Schemat miareczkowania a boceptera

Kontrola			1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
dopełniacza	krwinek									
0,5	0,75	NaCl	—	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
—	—	amboceptor 1:100	0,25	0,25	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25 0,25→
—	—	NaCl			do wszystkich próbek po 0,25					
0,25	—	dopełniacz			do wszystkich próbek po 0,25					
0,25	0,25	krwinki 40/0			do wszystkich próbek po 0,25					
zahamowanie										

Wszystkie próbówki wstawia się do łaźni wodnej o temp. 37°C na 15—30 min., po czym odczytuje się wynik.

TABELA II
Schemat miareczkowania dopełniacza

		1:10	1:12	1:15	1:18	1:20	1:40	Kontrola	
								dopełniacza	krwinek
I rząd	dopełniacz 1:10	0,2	0,16	0,13	0,11	0,10	0,05	0,2	—
	NaCl	—	0,04	0,07	0,09	0,10	0,15	0,6	0,8
	amboceptor z miareczkowania	do wszystkich próbek po 0,2						—	—
	krwinki 40/0	do wszystkich próbek po 0,2						0,2	0,2
	NaCl	do wszystkich próbek po 0,4						—	—
II rząd	dopełniacz 1:10	0,2	0,16	0,13	0,11	0,10	0,05	zahamowanie	
	NaCl	—	0,04	0,07	0,09	0,10	0,15		
	antygen z miareczkowania	do wszystkich próbek po 0,2							
	NaCl	do wszystkich próbek po 0,2							

Wszystkie próbówki wstawia się do łaźni wodnej o temp. 37°C na 1 godz. (lub chłodni na 18—24 godz). Po tym czasie dodaje się do próbek II rzędu 0,4 ml uczulonych krwinek i ponownie umieszcza się w łaźni wodnej (37°C) na 15—30 min.

3) Komplement — świeża surowica świnek morskich. Dawka robocza 1,5—2 jednostek wg miareczkowania.

4) Amboceptor — dawka robocza 2 jednostki wg miareczkowania.

TABELA III
Schemat miareczkowania antygeny

Kontrola			Rozcieńczenie antygeny	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
surowicy dodatniej	krwinek	dopełniacza							
0,2	0,8	0,6	NaCl	do wszystkich próbek po 0,2					
—	—	—	antygen	0,2→	0,2→	0,2→	0,2→	0,2→	0,2→
0,2	—	—	surowica dodatnia w rozc. 1:5	do wszystkich próbek po 0,2					
0,2	—	0,2	dopełniacz w rozc. 1:10	do wszystkich próbek po 0,2					
—	0,2	0,2	krwinki 40/0						
0,4	zahamowanie		system hemolityczny do wszystkich próbek po 0,4						
hemo- liza									

Miareczkowanie antygeny dodatniego i ujemnego przeprowadza się identycznie. Wszystkie próbki wstawia się do łaźni wodnej o temp. 37°C na 1 godz. (lub chłodni na 18—24 godz.). Po tym czasie dodaje się po 0,4 ml uczulonych krwinek do wszystkich próbek z wyjątkiem kontrolnych i wstawia się do łaźni wodnej (37°C) na 15—30 min.

TABELA IV
Schemat właściwej reakcji wiązania dopełniacza

Rozcieńczenia	1:2	1:4	Kontrole	
			z antygenem	surowicy
NaCl	0,2	0,2	—	0,2
surowica	0,2 →	0,2		
		—0,2	0,2 rozc. 1:2	0,2 rozc. 1:2
antygen + i — z miareczkowania	do wszystkich próbek po 0,2		0,2	—
dopełniacz z miareczkowania	do wszystkich próbek po 0,2			
system hemolityczny	do wszystkich próbek po 0,4			

Metoda zimna — przygotowuje się rozcieńczenia surowic; dodaje antygeny i dopełniacz całość pozostawia się przez 18—24 godz. w chłodni. Po tym czasie dodaje się system hemolityczny i umieszcza się w łaźni wodnej (37°C) — na 15—30 min.

Metoda ciepła — przygotowuje się rozcieńczenia surowic, dodaje antygeny i dopełniacz, całość wstawia się do łaźni wodnej 37°C na 1 godz. Po tym czasie dodaje się system hemolityczny i wstawia się do łaźni wodnej (37°C) — na 15—30 min.

5) Krwinki — stosowano 4⁰/₀ zawiesinę krwinek baranich przemitych 3-krotnie fizjologicznym roztworem NaCl.

Wykonanie odczynu ilustrują schematycznie tabele (I—IV).

Wyniki badań i omówienie

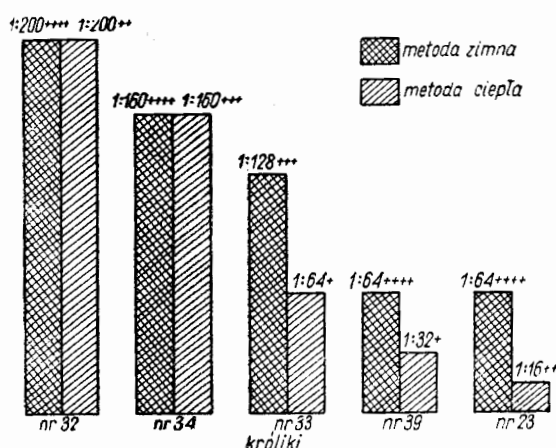
Otrzymane wyniki badań streszcza częściowo tabela V:

TABELA V

OWD	Ogólna ilość zbadanych	Wynik +	%	Wynik —	%
Metoda ciepła	282	16	5,6	266	94,3
metoda zimna	282	49	17,4	233	82,4

Widoczne są znaczne różnice w odsetkach wyników dodatnich i ujemnych w zależności od stosowanej metody odczynu wiązania dopełniacza. Korzystniejszą dla diagnostyki okazuje się metoda zimna.

O wartości wymienionych metod mówią nie tylko wyniki + i —, ale również wysokość uzyskanego miana. Przekonaliśmy się, że miano przy metodzie zimnej jest zawsze wyższe od miana uzyskanego przy metodzie



Ryc. 1

cieplej. Przy metodzie zimnej wyniki w określonym mianie można było oznaczyć +++++, +++, ++, przy metodzie ciepłej ++, + rzadko +++ lub +++++. Celem przekonania się, jaka jest różnica w zachowaniu się miana przebadaliśmy dla kontroli 5 surowic króliczych (króliki były uprzednio zakażane metodą Wildführa w modyfikacji własnej). Uzyskane wyniki ilustruje ryc. 1.

Tylko w dwóch przypadkach uzyskane miano były jednakowe, w pozostałych zaś różnice są dosyć duże. Podobne różnice, jeśli chodzi o wy-

sokość miana, stwierdziliśmy przy miareczkowaniu antygeny. Ilustruje to tabela VI.

TABELA VI

Rozcieńczenia antygeny	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Metoda ciepła	+++	+++	+	+	+	—
Metoda zimna	++++	++++	++++	++++	++++	+

Uzyskane wyniki przemawiają na korzyść metody zimnej. Jednak wyciągnięcia ostatecznych wniosków należy oczekiwać dopiero po przebadaniu większej ilości surowic. W toku pracy zwrócono również uwagę na zgodność wyników OWD oraz próby barwnej Sabin-Feldmana i odczynu śródskórnego Frenkela. Porównanie przeprowadzono w 39 przypadkach. Zgodność wyników rozpatrywano oddzielnie dla metody ciepłej i zimnej odczynu wiązania dopełniacza. Przy metodzie ciepłej zgodność wyników wymienionych prób wynosiła 61,5%, dla metody zimnej — 66,6%. Porównując wyniki OWD i odczynu śródskórnego Frenkela otrzymano zgodność dla metody ciepłej w 54,8%, dla metody zimnej w 58,06%. Przy porównaniu wyników OWD i próby barwnej zgodność wyników wynosiła 84%. Przebadano jednak zbyt małą ilość przypadków, by można było wyciągnąć wnioski co do zgodności odczynu wiązania dopełniacza i próby barwnej Sabin-Feldmana. Porównując wyniki OWD z próbą barwną Sabin-Feldmana i odczynem śródskórnym Frenkela, a także wyniki OWD i odczynu śródskórnego Frenkela na większym materiale — widzimy większą zgodność wyników dla metody zimnej. Różnica procentowa nie jest zbyt duża, ale przy diagnostyce toksoplazmozy nawet tak niski procent może mieć duże znaczenie.

Otrzymano 16.I. 1959 r.

Z Zakładu Parazytologii
Inst. Med. Pracy i Hig. Wsi
w Lublinie

LITERATURA

1. Jira J., Bozděch V., Komplementfixační reakce při toxoplasmose, *Časopis Lekarů Českých*, 44: 1346—1402, 1957.
2. Kozar Z., Toksoplazmoza, Warszawa 1954, PZWL, 134—145.
3. Makstenieks O., Verlinde J. D., Toxoplasmosis in the Netherlands, *Doc. de Med. Geograph. et Trop.* 9: 214, 1957.

M. STROCZYŃSKA, J. UMIŃSKI, S. TOŚ-LUTY

EVALUATION OF THE WARM AND COLD METHOD OF THE COMPLEMENT FIXATION REACTION IN TOXOPLASMOSIS DIAGNOSIS

287 sera were examined by means of the complement fixation reaction, applying the cold and warm method. 282 were human and 5 rabbit sera. The results of these examinations may be summarized as follows:

1) Positive results were obtained: by the warm method — 5,92%, by the cold method — 14,79%.

2) The titre with the cold method is always higher than the titre obtained with the warm method.

3) The conformity of the results of the complement fixation, Sabin-Feldman's dye test and Frenkel's intradermal test amounts to 61.5% for the warm method and to 66.6% for the cold method. The conformity of the results of the complement fixation and Frenkel's intradermal test amounts to 54.8% for the warm and 58.06% for the cold method. The conformity of the results of the complement fixation test and the dye test amounts to 84% for both methods.