

WARTOŚĆ IMMUNOGENNA ANTYGENU SOMATYCZNEGO  
Z LARW *STRONGYLOIDES PAPILLOSUS* W EKSPERYMENTALNEJ  
STRONGYLOIDOZIE KRÓLIKÓW

STEFAN M. FUKSIEWICZ

Zakład Parazytologii, Instytut Zoologiczny Uniwersytetu Warszawskiego,  
Warszawa

*Strongyloides papillosus* jest często występującym nicieniem w Polsce; pasożytuje on w jelicie cienkim owiec, kóz i innych przeżuwaczy. Ze względu na dość wysoką ekstensywność inwazji [8] oraz znaczne zmiany patologiczne, jakie wywołuje, nie jest on obojętny z gospodarczego punktu widzenia. Dlatego też cenne są wszelkie badania zmierzające do uodpornienia zwierząt przeciwko temu pasożytowi.

W naszym Zakładzie wykonano szereg eksperymentów, które wykazały możliwość uzyskania odporności w strongyloidozie królików i owiec drogą kilkakrotnego podawania larw inwazyjnych [9, 10-12]. Stwierdzono również możliwość wywoływania odporności na zarażenie dawką letalną 200 000 normalnych larw węgorka po uprzedniej immunizacji królików i jagniąt larwami naświetlanymi promieniami ultrafioletowymi [3, 13].

Ponieważ nikt dotąd nie zajmował się immunizowaniem zwierząt przeciwko *S. papillosus* za pomocą antygeny larwalnego — wydawało się słuszne podjęcie tematu.

Celem niniejszej pracy było określenie wartości immunogennych pełnego antygeny somatycznego z larw *S. papillosus* oraz porównanie patogenności tego pasożyta wobec królików immunizowanych tym antygenem i wobec zwierząt kontrolnych. Królik, zgodnie z wynikami Bezubika [2], jest zwierzęciem, do którego węgorek owczy dobrze się adaptuje, a obraz kliniczny i patologiczny schorzenia jest identyczny jak u żywiciela właściwego — owcy.

**Materiał i metody**

Eksperyment przeprowadzono na 28 królikach obu płci, rasy mieszanej, w wieku 3-4 miesięcy, o średniej wadze 2400-2750 g. Badania kontynuowano w ciągu 140 dni. Zwierzęta losowo podzielono na trzy grupy:

**Grupa I.** 14 królików immunizowano antygenem somatycznym larwalnym wykonanym według metody Bozicevicha [5] z niewielkimi modyfikacjami. Do przygotowania antygeny użyto 5-dniowych larw zebranych z kultur kałowych, które były prowadzone według ogólnie przyjętych metod [1]. Suchą masę robaków (materiał liofilizowany) ekstrahowano w stosunku 1:100 przez okres 48 godzin w temperaturze  $-4^{\circ}\text{C}$  jałowym 0,9% roztworem NaCl. Następnie zawiesinę tę homogenizowano w obniżonej temperaturze, w łaźni lód — woda do uzyskania silnie opalizującej zawiesiny. Homogenat dziesięciokrotnie zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i odmrażano w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . W trakcie odmrażania zawiesinę silnie wytrząsano. Homogenat dwukrotnie wirovano przy 6000 obr./min. przez 15 minut. Supernatant liofilizowano, ampułkowano i przechowywano w ekcykatorze. Królikom grupy I podawano antygen z kompletnym adjuwantem Freund'a domięśniowo, trzykrotnie w odstępach trzydniowych, w mięśnie uda na przyśrodkowej jego powierzchni. Dla zwiększenia bodźcowego działania antygeny iniekcji dokonywano w paru miejscach uda. Każdorazowo wstrzykiwano 1% antygeny (tj. 10 mg białka rozpuszczonego w 0,5 ml 0,9% NaCl + 0,5 ml pełnego adjuwantu Freund'a). Po upływie czterech tygodni od ostatniej dawki podano drogą iniekcji dootrzewnowej ten sam antygen po raz drugi w ilości 10 mg — bez adjuwantu. Po 21 dniach od tego momentu wszystkie króliki z tej grupy zarażono naskórną dawką letalną 200 000 larw inwazyjnych owczego szczepu *S. papillosus*.

**Grupa II.** 10 zwierząt nie immunizowanych stanowiło kontrolę jednorazowego zarażenia dawką 200 000 larw *S. papillosus*.

**Grupa III.** 4 króliki kontrolne, w ogóle nie zarażano. Badania przeprowadzane co tydzień obejmowały:

1. badania kału na obecność jaj *S. papillosus*,
2. sekcje; poszukiwano samic *S. papillosus* w jelicie cienkim,
3. ważenie zwierząt,
4. oznaczanie hematokrytu.

W badaniach tych stosowano wcześniej opisane, ogólnie przyjęte metody [1, 4].

#### Wyniki i omówienie

Dobrym odzwierciedleniem tego, czy i w jak dużym stopniu nastąpiło uodpornienie zwierząt na inwazję *S. papillosus*, jest produkcja jaj na gram kału w dwóch eksperymentalnych grupach, tzn. w grupie I i II. Tabela 1 oraz ryc. 1 wyraźnie wskazują, że pod względem produkcji

TABELA 1

Maksymalna produkcja jaj na gram kału u poszczególnych królików

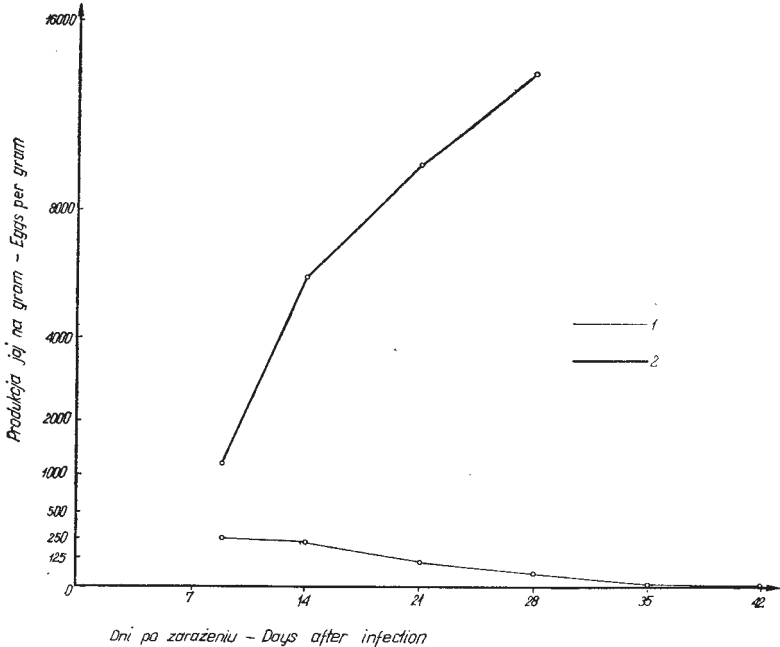
TABLE 1

Maximal production of eggs per gram faeces in individual rabbits

Grupa Group	Numer królika No. of rabbit	Liczba jaj No. eggs	DPZ DAI	Padł (DPZ) Died (DAI)
I	1	850	17	przeżył — survived
	2	310	14	
	3	110	14	
	4	110	14	
	5	170	21	
	6	960	11	
	7	230	11	
	8	0	0	
	9	180	14	
	10	450	14	
	11	7800	27	31
	12	6850	16	19
	13	100	12	przeżył — survived
	14	0	0	
średnia mean		289	12	
II	15	7500	27	27
	16	5100	33	34
	17	8000	30	32
	18	9100	24	26
	19	9600	24	25
	20	18500	16	16
	21	17100	17	17
	22	16400	21	22
	23	16630	18	19
24	29500	15	15	
średnia mean		13743	23	23

jaj istnieje zasadnicza różnica między królikami zarażonymi dawką letalną 200 000 larw *S. papillosus* — po uprzednim immunizowaniu — a królikami, które zostały zarażone tą samą dawką pasożyta bez wcześniejszego uodporniania. Potwierdza to przebieg krzywych na ryc. 1. Ze względu na to, iż otrzymane wartości znacznie różniły się rzędem wielkości, chcąc przedstawić je w sposób jak najbardziej przejrzysty, stosowano skalę nierównomierną, dzięki której można było skonfrontować wszystkie wyniki na jednym wykresie. Należy zwrócić uwagę na to, że podczas gdy w grupie II średnia maksymalna liczba jaj na gram kału po podaniu dawki letalnej wynosi 13 743 (23 dnia po zarażeniu,

DPZ) — to w przypadku zwierząt immunizowanych ten sam wskaźnik jest wielokrotnie niższy i wynosi 289 jaj na gram (12 DPZ) (tab. 1). Charakterystyczne jest również to, że u dwóch królików (nr 8 i nr 14), mimo zarażenia ich letalną dawką larw w ogóle nie znaleziono jaj pasożyta.



Ryc. 1. Zmiany w produkcji jaj pasożyta na gram kału po zarażeniu dawką letalną. 1 — króliki immunizowane AgSI; 2 — króliki nie immunizowane  
 Fig. 1. Changes in production of eggs per gram faeces after lethal dose infection. 1 — rabbits immunized with AgSI; 2 — not immunized rabbits

Następnym, równie ważnym wskaźnikiem nabycia odporności jest liczba pasożytów znalezionych podczas sekcji zwierząt. Tutaj także można zaobserwować spore różnice między zwierzętami immunizowanymi a zwierzętami nie immunizowanymi (tab. 2). U królików w grupie I znaleziono w jelicie nieznaczne liczby samic pasożytniczych sięgające zaledwie 0,2, 0,1, 0,2 0,4% dawki letalnej (królik nr 1, 2, 6, 10). U pozostałych królików w tej grupie nie stwierdzono pasożytów. Zdecydowana większość immunizowanych osobników przeżyła zarażenie dawką letalną i wykazywała przez cały czas trwania eksperymentu dobrą kondycję. Dwa króliki z omawianej grupy (nr 11 i 12) padły z objawami strongyloidozy 31 i 19 dnia po zarażeniu. Analiza wyników wskazywałaby na to, że nabyły one częściowej odporności, co przejawiało się w obniżonej produkcji jaj i liczbie pasożytów

TABELA 2

Liczba pasożytów znaleziona podczas sekcji

TABLE 2

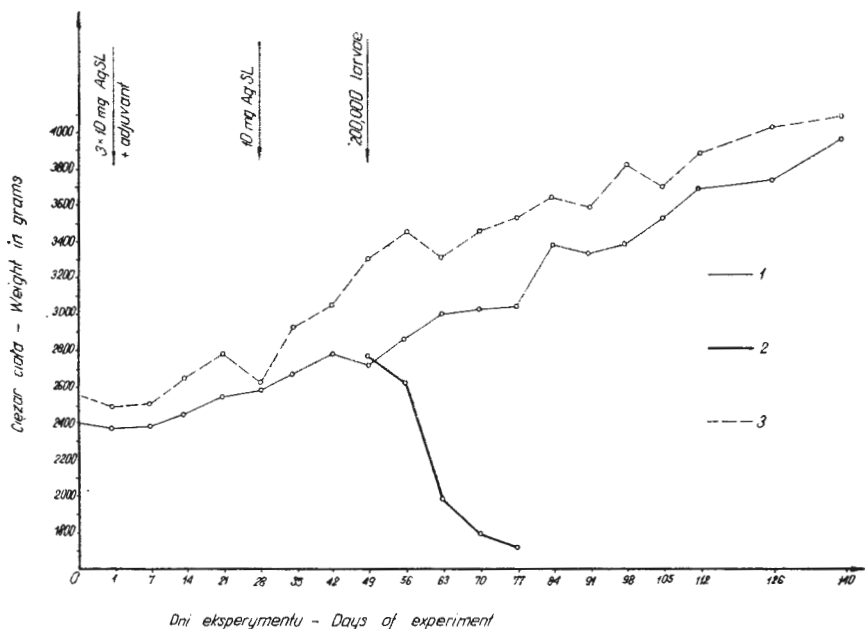
Numbers of parasites found at dissection

Grupa Group	Numer królika No. of rabbit	Liczba pasożytów No. of parasites	Procent dawki letalnej Per cent of lethal dose
I	1	410	0.2
	2	280	0.1
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
	6	120	0.1
	7	0	0
	8	0	0
	9	0	0
	10	785	0.4
	11	47250	23.5
	12	61240	30.5
	13	0	0
	14	0	0
średnia mean		8576	0.2
II	15	9280	4.6
	16	7240	3.6
	17	6142	3.1
	18	18200	9.1
	19	37500	18.8
	20	82400	41.2
	21	80500	40.3
	22	74600	37.3
	23	78500	39.3
	24	91500	45.8
średnia mean		48586	24.3

w jelicie w porównaniu ze średnimi tych wielkości u zwierząt immunizowanych, zarażonych jednorazową dawką letalną. Być może powodem ich śmierci były także inne czynniki nie pasożytniczego pochodzenia, które mogły obniżyć odporność organizmu. W grupie II natomiast nie przeżyło żadne zwierzę; wszystkie padły, wykazując symptomy strongyloidozy: duży spadek ciężaru ciała, silną biegunkę, apatię i brak apetytu.

Jednym z parametrów świadczących o ogólnej kondycji zwierzęcia jest ciężar jego ciała. Jeżeli za punkt odniesienia przyjmie się króliki kontrolne (grupa III), można wówczas powiedzieć, że zwierzęta z grupy I

podczas całego okresu immunizacji jak i później, po podaniu dawki letalnej, wykazywały dobrą kondycję. Znalazło to swoje odbicie w stałym wzroście ciężaru ciała — od 2400 g na początku do 3900 g na końcu eksperymentu. W grupie II otrzymano zupełnie inny obraz: po zarażeniu zwierzęta wyraźnie traciły na wadze (z 2740 g do 1730 g) ryc. 2.



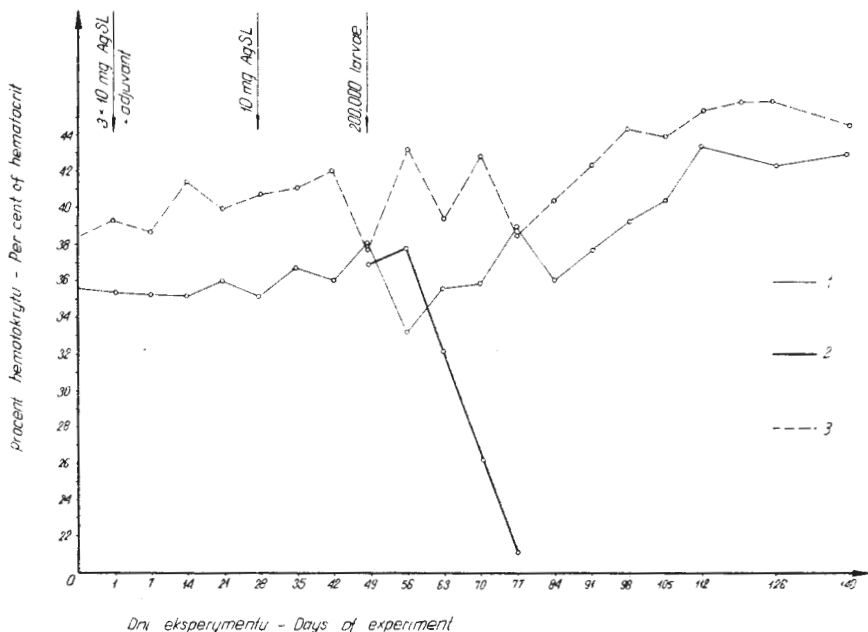
Ryc. 2. Zmiany ciężaru ciała. 1 — króliki immunizowane AgSL; 2 — króliki nie immunizowane; 3 — grupa kontrolna

Fig. 2. Changes in body weight. 1 — rabbits immunized with AgSL; 2 — not immunized rabbits; 3 — control group

Jako uzupełnienie powyższych badań potraktowano śledzenie zmian hematokrytu (ryc. 3). Porównując przebieg krzywych dla grup I i III można powiedzieć, że wykazują one ogólną tendencję do wzrostu. Świadczy to o tym, że ani okres immunizacji, ani zarażenie nie wywołały raptownych zmian w poziomie hematokrytu królików z grupy I. Jedyne spadki hematokrytu nastąpił w tej grupie 7 dnia po zarażeniu (DPZ). Jednakże był to spadek nieznaczny (z 38% do 33%) i krótkotrwały, ponieważ poczynając od 7 DPZ zauważyć można stały wzrost tego parametru do 42,5%. Dynamika zmian poziomu hematokrytu w grupie II jest zupełnie inna i charakteryzuje się gwałtownym spadkiem z początkowej wartości 36,8% do 21% — w 28 dniu po zarażeniu.

Wyniki niniejszej pracy wykazały możliwość wywołania odporności na zarażenie dawką letalną *S. papillosus* zwierząt immunizowanych

antygenem somatycznym z larw. Na temat skuteczności immunizacji zwierząt antygenami somatycznymi i metabolicznymi zdania są podzielone. Jako przykład pozytywnych rezultatów w tej dziedzinie można przytoczyć pracę Guerrero i Silvermana [6]. Badali oni u myszy aktywność immunologiczną somatycznych i metabolicznych antygenów uzyskanych z II i III stadium larwalnego *Ascaris suum*. Zwierzęta immunizo-



Ryc. 3. Zmiany hematokrytu. 1 — króliki immunizowane AgSI; 2 — króliki nie immunizowane; 3 — grupa kontrolna  
 Fig. 3. Changes in the hematocrit. 1 — rabbits immunized with AgSI; 2 — not immunized rabbits; 3 — control group

wane w ten sposób wykazywały dużą odporność na inwazję tego nicienia. Również Van Zandt [14] z dobrym efektem uodporniał białe myszy na zarażenie *Nematospiroides dubius*, przez podanie im antygeny z kompletnym adjuwantem Freund'a, sporządzonego z dorosłych form tego nicienia. Z kolei próby dootrzewnowej immunizacji owiec somatycznymi i metabolicznymi antygenami III i IV stadium larwalnego oraz formami dorosłymi *Chabertia ovina* nie dały pomyślnych rezultatów [7].

### Wnioski

1. Uzyskane wyniki świadczą, że immunizacja królików antygenem somatycznym z larw *S. papillosus* wywołała powstanie odporności na zarażenie dawką letalną tego pasożyta.

2. U królików nie immunizowanych występuje widoczne oddziaływanie pasożyta na żywiciela, co przejawia się wysoką produkcją jaj pasożyta, znacznym spadkiem ciężaru ciała i hematokrytu u żywiciela i w konsekwencji doprowadza do śmierci wszystkich zwierząt w tej grupie.

3. Wydaje się słuszne zbadanie, która z frakcji antygeny somatycznego z larw *S. papillosus* w maksymalny sposób indukuje mechanizmy obronne zarówno komórkowe, jak i humoralne.

Otrzymano: 18 IV 1975

Adres autora:

00-927 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 26/28

#### LITERATURA

1. Bezubik, B.: Investigations on the sheep strain of *Strongyloides papillosus*. I. Observations on the effect of cortisone on the susceptibility of hamsters and guinea pigs to the sheep and rabbit strains of the threadworm. — *Acta Parasitol. Polon.*, 9, 427-440, 1961.
2. Bezubik, B.: Investigations on the sheep strain of *Strongyloides papillosus*. II. Adaptability to abnormal hosts and changes in virulence after serial passages in rabbits. — *Acta Parasitol. Polon.*, 10, 321-346, 1962.
3. Bezubik, B.: Immunological response of 1-month-old lambs to normal and UV-irradiated larvae of *Strongyloides papillosus*. — *Acta Parasitol. Polon.*, 20, 583-595, 1972.
4. Bezubik, B., Turner, J. H.: Investigations on the sheep strain of *Strongyloides papillosus*. IV. The physiological and pathological blood picture of sheep and goats experimentally infected with *Strongyloides papillosus* after 5 or 7 serial passages through rabbits. — *Acta Parasitol. Polon.*, 12, 101-116, 1964.
5. Bozicevich, J.: Studies on trichinosis. XII. The preparation and use of an improved trichina antigen. — *Public Health Rep.*, 53, 2130-2138, 1938.
6. Guerrero, J., Silverman, P. H.: *Ascaris suum*. Immune reactions in mice. I. Larval metabolic and somatic antigens. — *Expl. Parasitol.*, 26, 272-281, 1969.
7. Hürchner, F.: Zur Immunisierung von Schafen gegen *Chabertia ovina*. — *Berlin. München. Tierärztl. Wochenschr.*, 81, 212-218, 1968.
8. Patyk, S.: Zarobaczenie przewodu pokarmowego owiec i kóz na Ziemiach Zachodnich. — *Acta Parasitol. Polon.*, 4, 107-146, 1956.
9. Siński, E., Krzysztofowicz, M. M.: The blood picture and immunological reactions in rabbits exposed to repeated doses of the sheep and rabbit strains of *Strongyloides papillosus*. — *Acta Parasitol. Polon.*, 19, 427-444, 1971.
10. Stankiewicz, M.: Studies on immunity in experimental strongyloidiasis in sheep. I. Parasitological observations and changes in the hematocrit. — *Acta Parasitol. Polon.*, 17, 147-159, 1969.
11. Stankiewicz, M.: Studies on immunity in experimental strongyloidiasis in sheep. II. Differential leucocyte counts during successive infections. — *Acta Parasitol. Polon.*, 17, 161-173, 1969.



12. Stankiewicz, M.: Studies on immunity in experimental strongyloidiasis in sheep. III. Complement fixation test and double diffusion test. — *Acta Parasitol. Polon.*, 18, 463-472, 1970.
13. Stankiewicz, M., Bezubik, B., Siński, E.: The effect of UV-rays on the infective larvae of *Strongyloides papillosus* in the rabbit. III. Production of immunity by irradiated larvae. — *Acta Parasitol. Polon.*, 19, 327-336, 1971.
14. Van Zandt, P. D.: Immunity relationships in withe mice infected with *Nematospiroides dubius*. III. Artificial immunization with antigen prepared from adults. — *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 87, 74-76, 1971.

IMMUNOGENIC VALUE OF LARVAL SOMATIC ANTIGEN OF  
*STRONGYLOIDES PAPILLOSUS* IN EXPERIMENTAL STRONGYLOIDOSIS  
IN RABBITS

by

S. M. FUKSIEWICZ

Twenty eight rabbits were divided at random into 3 groups.

Group I. 14 animals were immunized with larval somatic antigen of *S. papillosus* prepared after Bozicevich. Antigen with complete Freund adjuvant was injected intramuscularly, three times in 3-day intervals (each time 1% antigen was injected, i.e. 10 mg of protein dissolved in 0.5 ml 0.9% NaCl + 0.5 ml of complete Freund adjuvant). Four weeks later, the same antigen — but without Freund adjuvant — was injected intraperitoneally in the amount of 10 mg. Twenty one days later all animals of this group were exposed percutaneously to the lethal dose of 200,000 larvae of *S. papillosus*.

Group II. 10 animals, not immunized previously, were exposed percutaneously to 200,000 larvae.

Group III. 4 control rabbits, not infected.

The investigations covered: production of eggs per gram faeces, changes in body weights, postmortems, changes in hematocrit.

The experiments have shown that the immunization was positive. Most immunized rabbits survived infection with the lethal dose of 200,000 larvae and showed much lower egg production faeces, per gram insignificant numbers of adult parasites found at postmortems and no decreases in the hematocrit and body weights in relation to not immunized animals, exposed to the lethal dose of larvae.