

ODCZYN WIĄZANIA DOPEŁNIACZA  
A LEUKERGIA U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH  
ZARAŻONYCH JAJAMI *ASCARIS LUMBRICOIDES SUIS*

KONRAD ZEMBRZUSKI

Zakład Parazytologii Lekarskiej Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa

Z prac Koino (1922) Payne i wsp. (1925) oraz Phillsa i wsp. (1972) wynika, że człowiek może być zarażony inwazyjnymi jajami *Ascaris lumbricoides suis* oraz że pasożyt ten może odbyć w człowieku okres migracji larw i wczesną część okresu jelitowego. Inwazje te, choć mogą przebiegać burzliwie (Phills i wsp., 1972), są rozpoznawane tylko w wyjątkowych przypadkach.

Wydaje się, że w rozpoznawaniu tej nietypowej u człowieka inwazji mogą być pomocne odczyny serologiczne. W niniejszej publikacji autor zajmuje się odczynem wiązania dopełniacza. Odczyn ten\* jest jedną z najbardziej czułych, powtarzalnych i wystandardyzowanych metod serologicznych powszechnego użytku. Początki dali mu Bordet i Gengou (1901), a w parazytologii — Ghedini (1906). Rozwijano go w zastosowaniu do wszystkich chorób pasożytniczych, w których jest stosowana serologia (Fife, 1971; Kagan, 1974). W odniesieniu do glistnicy jako pierwszy zastosował go Ghedini (1907). W Polsce zajmowały się nim Jeziorańska i Dobrowolska (1956; 1957) oraz Zapart (1970 a, b).

**Materiał i metody**

Badania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych (Zembrzusi, 1965) na wolnych od helmintów jelitowych 43 samcach świnki morskiej o ciężarze około 700 g oraz 7 królikach, samcach o ciężarze około 3 kg. Świnki morskie zarażono dogębowo dawkami po 3000, a króliki po 30 000 jaj glisty świńskiej. Zwierzęta te, podobnie jak człowiek, są nietypowymi żywicielami *A. lumbricoides suis*. W czasie wieloletnich badań nie udało się autorowi uzyskać w warunkach doświadczalnych

\* Ze względu na pokaźną liczbę różnych technik OWD należałoby raczej mówić o odczynach wiązania dopełniacza.

dojrzałych pasożytów w przewodzie pokarmowym kilkunastu królików i kilkuset świnek morskich zarażonych inwazyjnymi jajami *A. lumbricoides suis*.

**Surowice.** Krew świnek morskich pobierano przez punkcję serca, a królików — z brzeżnej żyły usznej. Pierwszy raz pobrano krew w dniu zarażenia przed podaniem jaj *A. lumbricoides suis*. Następnie pobierano krew królików co 3 dni do 42 dnia po zarażeniu, a od świnek morskich — co 6 dni do 42 dnia, rozpoczynając u 22 zwierząt od 3, a u 21 zwierząt od 6 dnia po zarażeniu. Surowice ampułkowano, przechowywano w zamrażalniku i badano w ciągu najwyżej 3 tygodni po pobraniu.

**Antygen.** Przemyte kilkakrotnie w letniej wodzie wodociągowej, a w końcu przekroplonej, dojrzałe glisty świńskie homogenizowano w izotonicznym roztworze soli kuchennej za pomocą kuchennego miksera. Homogenat przechowywano przez 10 dni w temperaturze 4°C, często mieszając. Materiał wirowano, a płyn znad osadu sączono przez filtr Seitza. Przesącz, zawierający 0,16 mg białka w 1 ml roztworu, ampułkowano i przechowywano w temperaturze 4°C. Tak przygotowany i przechowywany pełny antygen był klarowny i nie tracił miana w OWD przez co najmniej 4 lata.

**Dopełniacz i dwuchwytnik.** Korzystano z liofilizowanych preparatów produkcji BIOMED.

**Eryocyty barana.** Krew barana pobraną aseptycznie do płynu Al-severa przechowywano w temperaturze 4°C i używano po tygodniu.

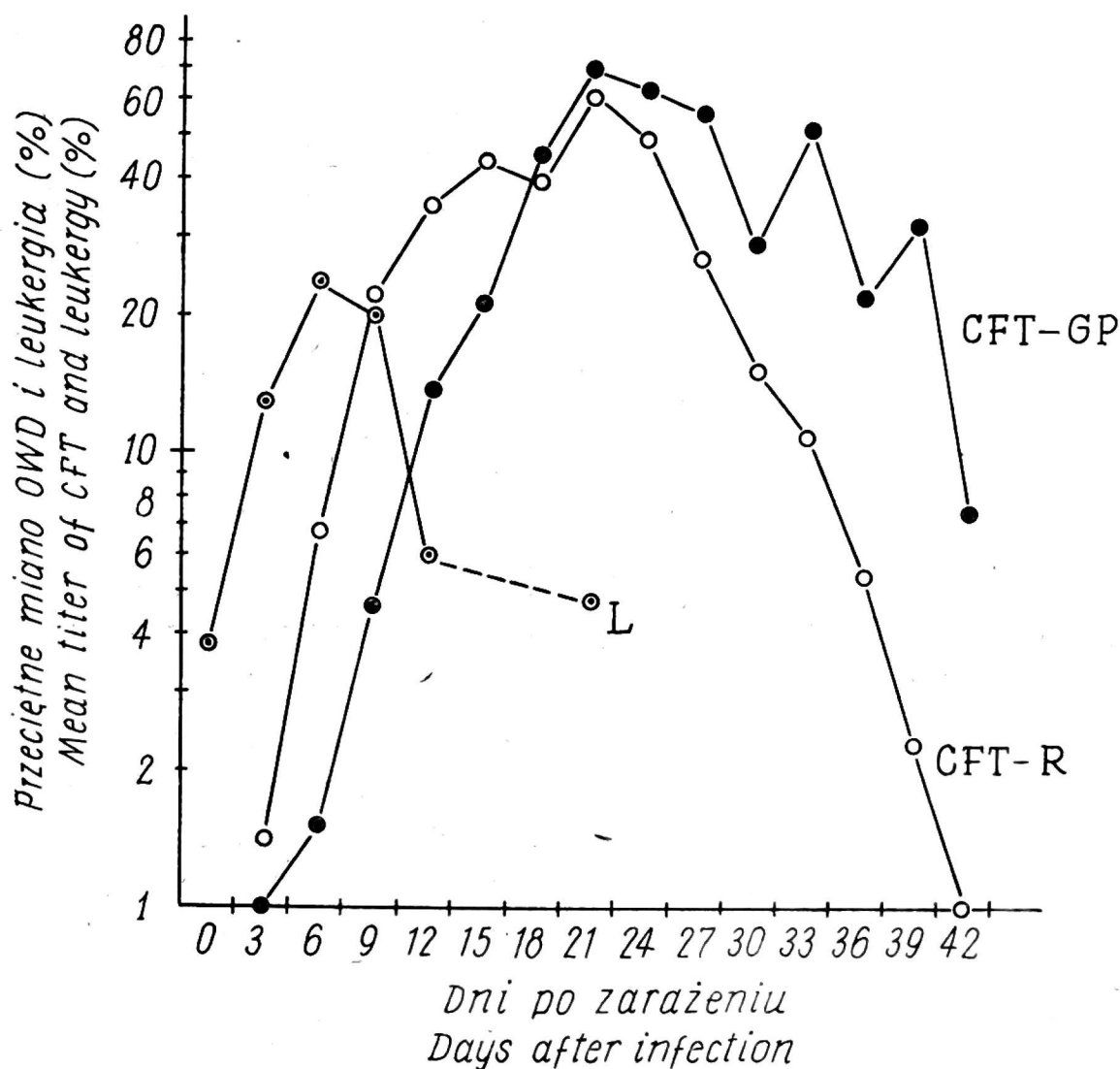
**Rozcieńczalnik.** Przed rozpoczęciem badań wypróbowano na dużej liczbie surowic anty-*Ascaris* o różnych mianach OWD zalecane (WHO techn. Rep. Ser., 1967), buforowane trójetanolaminą (triethanolamine-buffered) i barbituratami (barbital-buffered), roztwory izotoniczne soli kuchennej z dodatkiem soli wapnia i magnezu. Zanotowano jednakże spontaniczną lizę czerwonych krwinek barana. W przypadku izotonicznego buforu weronalowego udało się zapobiegać spontanicznej hemolizie przez dodanie do niego 0,1% żelatyny. Porównano wyniki OWD z zastosowaniem izotonicznego buforu weronalowego z solami wapnia i magnezu oraz żelatyną (0,1%), izotonicznego roztworu soli kuchennej z solami magnezu i wapnia oraz izotonicznego roztworu soli kuchennej bez dodatków. Uzyskano wyniki zgodne. W związku z tym w badaniach właściwych posługiwano się tylko izotonicznym roztworem soli kuchennej.

**Wykonanie odczynu.** Posługiwano się techniką zalecaną przez komitet ekspertów WHO do rozpoznawania bilharcjozy (WHO techn. Rep. Ser., 1967). Surowice rozcieńczano w postępie geometrycznym z mnożni-

kiem 2. Używano roztworów komplementu, zawierających 5 jednostek C'H<sub>50</sub> oznaczonych za pomocą wzorców barwnych. Posługując się takim stężeniem dopełniacza, mianowano roztwory antygeny i amboceptora. Reakcję wiązania dopełniacza przeprowadzano w temperaturze 4°C przez 16-18 godzin. Wyniki odczytywano za pomocą wzorców barwnych, przyjmując za dodatnie z hemolizą mniejszą lub równą 50%.

Oprócz wiązania dopełniacza, wykonywano u 7 badanych odczynem wiązania dopełniacza świnek morskich odczyn leukergiczny Flecka (Zembruski, 1964; 1973 a, b, c) techniką własną opisaną wcześniej (Zembruski, 1973 b, c).

Wyniki przedstawiono w 3 tabelach oraz na rycinie.



Ryc. Przeciętne miana wiązania dopełniacza u królików (CFT-R) i świnek morskich (CFT-GP) oraz leukergia (L) u świnek morskich doświadczalnie zarażonych jajami *A. lumbricoides suis*

Fig. Mean complement fixation titers in rabbits (CFT-R) and guinea-pigs (CFT-GP) as well as leukergy (L) in guinea-pigs experimentally infected with *A. lumbricoides suis* eggs

TABELA 1

Częstość występowania mian wiązania dopełniacza u świnek morskich zarażonych doświadczalnie jajami *A. lumbricoides suis*

TABLE 1

Frequency distribution of complement fixation titers in guinea-pigs experimentally infected with *A. lumbricoides suis* eggs

Dzień po zarażeniu Day after infection	Miano — Titer										Liczba surowiec No. of serums	Średnie miano Mean titer
	∅	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512		
0	43										43*	0
3	20	1			1						22	0.8
6	16	2	1	1	1						21	1.5
9	15	1	1	4			1				22	4.6
12	9	2			6	2	2				21	13.9
15	5	2	1	6	3	2	1	2			22	22.2
18	2		1	1	4	5	5	3			21	44.8
21	3		1	1	5	3	2	5		1	21	69.9
24	3			2	6	2	2	3		1	19	63.2
27	3		3	1	5	4	1		1	1	19	55.8
30	7	2	2		2	1	4	2			20	29.4
33	7		1	2	6	1		1	1	1	20	52.2
36	9	2		2	1	3	1	2			20	22.6
39	5	3	3	3			3	1	1		19	32.5
42	13	1	1	1		2	1				19	7.5

\*Kontrola — control

### Wyniki

Dodatni odczyn wiązania dopełniacza w niskich mianach pojawiał się u królików już od 3 dnia po zarażeniu (p.z.). W następnych dniach notowano wzrost mian w badanych surowicach, szczególnie od 9 dnia p.z. ( $\bar{x} = 1:22$ , mediana 1:16). Najwyższe, przeciętne miano uzyskano w 21 dniu p.z. ( $\bar{x} = 1:61$ , mediana 1:64). W następnych dniach spadało ono zwłaszcza od 30 dnia p.z. ( $\bar{x} = 1:16$ , mediana 1:16). U jednego królika w 21 i 24 dniu p.z. najwyższe miano wynosiło 1:128 (tabela 2, rycina).

Dodatni odczyn wiązania dopełniacza w mianie 1:16 zanotowano u jednej świnki morskiej już 3 dnia p.z. W następnych dniach miana surowic stopniowo narastały, szczególnie od 12 dnia p.z. ( $\bar{x} = 1:14$ , mediana 1:2). Najwyższą przeciętną wartość osiągnęły one w 21 dniu p.z. ( $\bar{x} = 1:70$ , mediana 1:32). Później wartości te opadały, choć w 36 ( $\bar{x} = 1:23$ , mediana 1:2) i 39 ( $\bar{x} = 1:32$ , mediana 1:4) dniu p.z. były jeszcze dość wysokie. Najwyższe miano, jakie zanotowano w 21-33 dniu p.z. u 4 świnek morskich, wynosiło 1:512 (tabela 1, rycina).

TABELA 2

Częstość występowania mian wiązania dopełniacza u królików zarażonych doświadczalnie jajami *A. lumbricoides suis*

TABLE 2

Frequency distribution of complement fixation titers in rabbits experimentally infected with *A. lumbricoides suis* eggs

Dzień po zarażeniu Day after infection	Miano — Titer								Liczba surowiec No. of serums	Średnie miano Mean titer
	∅	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		
0	7								7*	0
3	5	1		1					7	1.4
6	1		4		2				7	6.8
9			1	1	3	1	1		7	22.3
12				1	3		3		7	35.4
15					1	3	3		7	43.4
18					1	4	2		7	38.8
21				1		1	4	1	7	60.6
24				1	1	2	2	1	7	49.1
27			1	1	1	3	1		7	26.8
30		1	1	1	2	2			7	15.7
33	2			2	2	1			7	11.4
36	2	1	1	2	1				7	5.4
39	3	2	1	1					7	2.3
42	6		1						7	0,6

\*Kontrola — control

U królików zanotowano wcześniejszy, aniżeli u świnek morskich, wzrost i wcześniejsze opadanie do 42 dnia p.z. przeciętnych mian w odczynie wiązania dopełniacza. U 3 świnek morskich jeszcze w 42 dniu p.z. odczyn wiązania dopełniacza wystąpił w mianach 1:32-1:64.

Odczyn leukergiczny w dniu rozpoczęcia doświadczenia przed zarażeniem świnek morskich wykazał 3,8% (0,8-6,9) zlepionych leukocytów krwi obwodowej. Później spostrzegano wzrost tego odsetka. Najwięcej — 23,5% (8,9-51,1) — zagregowanych leukocytów zanotowano w 6 dniu p.z. W następnych dniach odsetek ten spadł do 5,9% (2,8-9,2) w 12 i 4,7% (2,9-8,6) w 21 dniu po zarażeniu. W znacznie większym stopniu zlepianiu ulegały granulocyty, aniżeli limfocyty (tabela 3, rycina).

#### Omówienie i wnioski

Zastosowana technika odczynu wiązania dopełniacza okazała się bardzo czuła. Zarówno u królików, jak i u świnek morskich uzyskano znacznie wyższe przeciętne miana OWD z pełnym antygenem aniżeli

TABELA 3

Leukergia u świnek morskich zarażonych jajami *A. lumbricoides suis*

TABLE 3

Leukergy in guinea-pigs infected with *A. lumbricoides suis* eggs

Dzień po zarażeniu Day after infection	Liczba zwierząt No. of animals	Zlepione leukocyty (%) Aggregated leukocytes (%)
0	7*	3.8 (0,8-6.9)
3	7	13.0 (3.0-25.6)
6	7	23.5 (8.9-51.1)
9	7	20.0 (5.1-32.6)
12	7	5.9 (2.8-9.2)
21	7	4.7 (2.9-8.6)

\* Kontrola — control.

podawała Zapart (1970 a, b), która posługiwała się inną techniką opisaną przez Jeziorańską i Dobrowolską (1956; 1957). Zastosowana technika daje powtarzalne wyniki, a ich odczyt jest bardziej zobiektywizowany ze względu na posługiwanie się wzorcami barwnymi. Wydaje się, że mogłaby być ona stosowana z powodzeniem w rutynowym rozpoznawaniu także innych pasożytów.

Nie rozwiązano sprawy swoistości odczynu wiązania dopełniacza. Powinowactwo antygenowe *A. lumbricoides suis* i *A. lumbricoides hominis* nie komplikuje sprawy w praktyce, choć nie pozwala na określenie gatunku. Daje jednak możliwość posługiwania się jednym antygenem pełnym w rozpoznawaniu wczesnych stadiów inwazji obu wymienionymi gatunkami fizjologicznymi. W odniesieniu do inwazji ludzi glistą ludzką może to mieć znaczenie praktyczne wówczas, gdy jeszcze nie ma możliwości wykrycia jaj glisty ludzkiej w kale. Powinowactwo antygenowe z *Toxocara* może jednak obecnie komplikować diagnostykę. Zagadnienie to można rozwiązać przez wyodrębnienie antygenów specyficznych gatunkowo, czego dotychczas nie udało się osiągnąć.

Dyskusyjna jest sprawa wysokości miana o wartości diagnostycznej. Wydaje się, że za takie można by uważać 1:16 i wyższe. Podstawowe znaczenie jednakże winno mieć śledzenie dynamiki wahań poziomu przeciwciał, którą na modelu biologicznym glista świnińska - świnka morska lub królik charakteryzuje rycina.

Krzywa leukergiczna znacznie wyprzedza krzywe w odczynie wiązania dopełniacza. Odczyn agregacji leukocytów obwodowych Flecka, jak również odczyn zahamowania migracji leukocytów (Zembrzuski, 1973 c) mogą być pomocne w zespole innych objawów chorobowych wówczas, gdy jeszcze odpowiedź humoralna nie została wyrażona.

Autor pragnie wyrazić swą wdzięczność Pani Janinie Ogonek za cenną pomoc techniczną.

Otrzymano: 29 XII 1975

Adres autora:

00-791 Warszawa, Chocimska 24

#### LITERATURA

1. Bordet, J., Gengou, O.: Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des serums anti-microbiens. — *Ann. Inst. Pasteur.*, 15, 289-302, 1901.
2. Fife, E. H. Jr: Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. — *Exp. Parasitol.*, 30, 132-163, 1971.
3. Ghedini, G.: Ricerche sur siero di sangue di individuo affetto da cisti da echinococco e sul liquido in essa contenuto. — *Gazz. Osp. Clin.*, 27, 1616-1617, 1906 (wg Taffs, L. F., 1961).
4. Ghedini, G.: Anticorpi elmintiacci nel siero di sangue di individui affetti da elmintiasi; anticorpi anchilostomiacci e ascaride. — *Gazz. Osp. Clin.*, 28, 476, 1907 (wg Taffs, L. F., 1961).
5. Jeziorańska, A., Dobrowolska, H.: Odczyny immunologiczne przy askarydozie. — *Wiad. Parazytol.*, 2, 5 suppl.: 117-118, 1956.
6. Jeziorańska, A., Dobrowolska, H.: Odczyny immunologiczne w glistnicy. — *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 9, 167-177, 1957.
7. Kagan, I. G.: Advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. — *Z. Parasitenk.*, 45, 163-195, 1974.
8. Koino, S.: Experimental infection on human body with ascarides. — *Japan Med. World*, 2, 317-320, 1922 (wg Taffs, L. F., 1961).
9. Payne, F. K., Ackert, J. E., Hartman, E.: The question of the human and pig *Ascaris*. — *Amer. J. Hyg.*, 5, 90-101, 1925 (wg Taffs, L. F., 1961).
10. Phills, J. A., Harrold, A. J., Whiteman, G. V., Perlenmutter, L.: Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. — *N. Engl. J. Med.*, 286, 965-970, 1972.
11. Taffs, L. F.: Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. I. An introduction with a review of the literature and the demonstration of complement-fixing antibodies in the serum. — *J. Helminthol.*, 35, 319-344, 1961.
12. WHO techn. Rep. Ser. No. 349, 1967.
13. Zapart, W.: Studies on the behaviour of some serological reactions in experimental animals, using the fractionated *Ascaris suum* antigens. — *Acta parasit. pol.*, 18, 7-23, 1970 a.

14. Zapart, W.: Diagnostic value of the *Ascaris suum* antigens obtained by different methods of fractionation. — *Acta parasit. pol.*, 18, 209-220, 1970 b.
15. Zembrzuski, K.: Leukergy in larval ascaridosis. — *Acta parasit. pol.*, 12, 193-194, 1964.
16. Zembrzuski, K.: Biologiczny model larwalnej glistnicy, żywiciel *Cavia porcellus* — pasożyt *Ascaris lumbricoides suis*, L. 1758. — *Wiad. Parazytol.*, 11, 531-540, 1965.
17. Zembrzuski, K.: Leukergy in guinea-pig infected with a lethal dose of *Ascaris lumbricoides suis* eggs. — *Acta parasit. pol.*, 21, 375-391, 1973 a.
18. Zembrzuski, K.: Leukergy and spleen cells migration inhibition in guinea-pigs after infection with *Ascaris lumbricoides suis* in the presence of *Ascaris* antigen in vitro. — *Acta parasit. pol.*, 21, 307-314, 1973 b.
19. Zembrzuski, K.: Odczyn hamowania migracji leukocytów krwi obwodowej w kapilarach w obecności homologicznego antygeny w przebiegu doświadczalnej glistnicy. — *Przegl. Epid.*, 27, 383-387, 1973 c.

#### COMPLEMENT FIXATION TEST AND LEUKERGY IN EXPERIMENTAL ANIMALS INFESTED WITH *ASCARIS LUMBRICOIDES SUIS* EGGS

by

K. ZEMBRZUSKI

The average titre of complement fixation test in the serums of rabbits and guinea pigs increased from the 3rd, and particularly on the 9th to 12th day after infestation. It reached its highest value on the 21st day, being about 1:60 in rabbits and 1:70 in guinea pigs, then to decline, especially from the 30th day after infestation. The peripheral leukocyte aggregation curve was far ahead of the complement fixation curves.