

MIĘDZYNARODOWA KONFERENCJA nt. AMEBIAZY
27-29 PAŹDZIERNIKA 1975, CIUDAD DE MEXICO

Od kilku lat Ośrodek Badań nad Amebiazą w Meksyku-Mieście organizuje corocznie seminaria poświęcone biologii i morfologii *Entamoeba histolytica* oraz amebiazie klinicznej i doświadczalnej. Szóste seminarium odbyło się w 1974 r., natomiast w październiku 1975 r. miała miejsce międzynarodowa konferencja, którą zorganizowano z okazji setnej rocznicy odkrycia *Entamoeba histolytica* przez Fiedora Aleksandrowicza Lesha (Lösch) (1875, Petersburg). Pomysł zorganizowania konferencji o charakterze międzynarodowym wysunął Dr L. S. Diamond (National Institutes of Health, Bethesda, USA) w czasie obrad V Seminarium, a patronat nad imprezą przejęły najpoważniejsze instytucje naukowe Meksyku: Instituto Mexicano del Seguro Nacional, Secretaria de Salubridad y Asistencia, Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, Organización Panamericana de la Salud.

W konferencji wzięło udział około 130 uczestników głównie z Meksyku i USA. Większość krajów europejskich reprezentowali pojedynczy uczestnicy. Należy przy tym stwierdzić, że w konferencji brały udział głównie osoby mające aktualnie największy autorytet w zakresie zarówno terapii i kliniki amebiazy, jak i prac doświadczalnych nad *E. histolytica*.

W ramach konferencji odbyły się trzy sympozja, na których wygłoszono 14 referatów głównych:

I sympozjum nt. „Mikroskopia elektronowa *E. histolytica*” z referatami R. D. P. Eatona (Kanada), R. Michela i in. (RFN), E. M. Proctora (Rep. Poł. Afryki), N. Treviño i in. (Meksyk) oraz W. K. El-Hashimi'ego (Irak); II sympozjum nt. „Stosunek żywiciel-pasożyt” z referatami E. Merovitcha (Kanada), W. Kasprzaka (Polska), I. M. Krupp (USA) oraz L. Landy'ego i in. (Meksyk); III sympozjum nt. „Terapia amebiazy” z referatami V. Amato Neto (Brazylia), U. K. Shetha (Indie), D. Botero (Kolumbia), A. Perchesa i in. (Meksyk) oraz O. I. Bautisty (Meksyk).

Program naukowy konferencji przewidywał również wolne doniesienia z zakresu biologii i morfologii *E. histolytica* oraz kliniki i terapii amebiazy. Przedstawiono 57 prac reprezentujących wysoki poziom naukowy i mających w większości charakter oryginalny. Szczególnie uderzał wysoki poziom prac, jak również żywy udział w dyskusjach, badaczy meksykańskich. Należy stwierdzić, że Ośrodek Badań nad Amebią skupia wybitnych fachowców, głównie z zakresu kliniki i terapii.

Udział w tej doskonale zorganizowanej konferencji naukowej utwierdził przekonanie, że najlepszą formą konferencji jest zawężenie tematyki do stosunkowo wąskich zagadnień, przy ograniczonej liczbie uczestników. Stwarza to odpowiednie warunki do dobrych dyskusji, zacieśniania kontaktów oraz wymiany poglądów i doświadczeń, jak również ułatwia organizację spotkania, czego konferencja w Meksyku była znakomitym przykładem. Ta doskonała organizacja konferencji, podkreślana przez wszystkich uczestników, wynikała zarówno z dobrego administrowania, jak i niezwykle sprawnego przebiegu obrad, a mianowicie:

1. Inauguracja i wznawianie obrad po przerwach odbywały się z wzorową punktualnością.
2. Obecni byli wszyscy zgłoszeni referenci, co nie powodowało w programie „luk”, tak często dezorganizujących przebieg obrad.
3. Obrady poszczególnych sekcji odbywały się kolejno na jednej tylko sali, a nie równolegle — w różnych salach.
4. Doskonała praca tłumaczy była satysfakcją dla wszystkich uczestników, zwłaszcza w czasie żywych dyskusji prowadzonych w języku hiszpańskim.
5. Stanowczo i konsekwentnie przestrzegany limit czasu zmuszał dyskutantów do wypowiedzi krótkich i rzeczowych.

6. Technika audiowizualna na najwyższym poziomie zapewniała odbiór wrażeń bez najmniejszych zakłóceń.

7. Szybka obsługa w bogato zaopatrzonym barze sprawiała, że 15-minutowe przerwy były zupełnie wystarczające.

8. Bardzo sprawny sekretariat, w którym dwie osoby załatwiały szybko i z niezwykłą życzliwością absolutnie wszystkie formalności (w tym bilety na imprezy oraz bilety lotnicze).

Z wielu referatów kilka najciekawszych zasługuje na krótkie omówienie.

Doniesienie Martineza A. J. (USA) było jedynym, które dotyczyło pierwotnych zmian mózgowia wywołanych przez pełzaki z rodzaju *Naegleria* i *Acanthamoeba*. Autor dokonał doskonałego przeglądu obserwacji klinicznych, zwracając jednocześnie uwagę na istnienie wielu różnic między inwazjami wywoływanymi przez te dwa rodzaje pełzaków (przebieg kliniczny, możliwości leczenia, kontakt z wodą lub jego brak, okres inkubacji, okres przeżywania, drogi inwazji, zmiany histologiczne, lokalizacja w mózgowiu).

Said S. i López-Revilla R. (Meksyk) przedstawili wyniki badań nad całkowitą zawartością białek i ich analizy elektroforetycznej u różnych szczepów *E. histolytica* dochodząc do wniosku, że charakterystyka białek szczepów patogennych może stanowić kryterium taksonomiczne dla tego gatunku, jak również może wyjaśnić rolę białek w patogenezie choroby.

Weinbach E. C. (USA) przedstawił bardzo ciekawe wyniki wieloletnich badań prowadzonych przez grupę badaczy National Institutes of Health nad metabolizmem tlenowym aksonicznych kultur *E. histolytica*. Tradycyjnie zwykło się uznawać pełzaka czerwonki za beztlenowca. Badania autorów wykazały, że jakkolwiek pasożyt pozbawiony jest mitochondriów i funkcjonalnego cyklu kwasów trójkarboksylowych, to jednak łatwo zużywa dostarczany tlen. Obecnie prowadzi się badania w kierunku wyjaśnienia torów metabolicznych prowadzących do zużywania tlenu oraz identyfikacji składników toru transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. Z licznych substratów tylko glukoza, l-seryna i etanol (autorzy zbadali m. in. cały szereg napojów alkoholowych, od „polskiej czystej” począwszy na wysokogatunkowych whisky kończąc!) stymulowały oddychanie. Zredukowane nukleotydy pirydynowe, NADPH nie były utleniane przez całe, nienaruszone trofozoity, lecz były utleniane przez preparaty otrzymane przez lizę lub ultradźwięki. Jakkolwiek u *E. histolytica* zachodzi glikoliza, to jednak końcowy system transportu elektronów jest odmienny od spotykanego w komórkach eukariotycznych. Pełzak posiada aktywną diaforazę NADPH oraz transhydrogenazę nukleotydu nikotynamidowego. Enzymy te działając sekwencyjnie mogą pośredniczyć w utle-

nianiu NADH powstającego w czasie glikolizy. NADH jest utleniany przez NADP poprzez działanie transhydrogenazy; utlenianie powstającego NADPH jest katalizowane przez diaforazę. Ostatecznym akceptorem elektronów jest tlen. Badania nad metabolizmem l-seryny wykazały, że ten aminokwas jest utleniany pośrednio po przekształceniu w pirogronian przez l-seryno-dehydratazę. Pirogronian jest utleniany przez dwa typy oksydazy pirogronianowej: P_i -zależnej (fosforylującej) i CoA-zależnej (CoA acetylującej). Badania spektrofotometryczne, fluorometryczne i chemiczna analiza elementarna wykazały, że u *E. histolytica* przenośnikami elektronów są flawoproteiny. Nie wykryto spektrofotometrycznie cytochromów występujących u wszystkich organizmów tlenowych, jak również nie stwierdzono, aby metabolizm był hamowany przez cjanki lub antymycynę. Natomiast stwierdzono, że czynnymi inhibitorami oddechowymi są metale chelatujące. Analiza chemiczna pozwoliła wykryć obecność żelaza niehemowego oraz siarczków nietrwałych w środowisku kwaśnym, zarówno w nieuszkodzonych pełzakach, jak i oczyszczonych preparatach diaforazy. Te i dalsze badania pozwoliły zidentyfikować dwa ważne składniki łańcucha oddechowego u *E. histolytica*: flawoproteiny oraz proteiny żelazo-siarkowe. Obecnie autorzy usiłują określić budowę cząsteczkową kompleksu oksydazy diaforazowo-pirogronianowej u *E. histolytica* oraz sprawdzić jej rolę w metabolizmie tlenowym tego pasożyta.

Ciekawe doniesienie przedstawiła grupa badaczy meksykańskich (Trissl D., Martinez-Palomo A. i in.): w celu określenia, czy wirulencja u *E. histolytica* jest związana z właściwościami powierzchniowymi przeprowadzono szereg badań patogennych i niepatogennych szczepów. Wyniki tych badań wskazują na to, że u patogennych szczepów łatwo wywołać aglutynację komórek konkawalina A, natomiast ruchliwość elektroforetyczna jest zbyt niska, aby dała się mierzyć za pomocą stosowanej aparatury (aparat Banghama). W przeciwieństwie do tego szczepy niepatogenne nie aglutynują pod wpływem konkawaliny A i mają wysoce ujemny ładunek powierzchniowy. Autorzy sądzą, że brak ujemnych ładunków powierzchniowych może być ważnym czynnikiem w ustalaniu się patogenności wirulentnych szczepów.

Grupa badaczy z National Institutes of Health w Bethesda (Diamond L. S. i in.) przedstawiła wyniki interesujących badań interakcji wirusy-pełzaki, dotyczące kręgu żywicielskich szczepów. Wirusy te nigdy nie były obserwowane w „zdrowych”, aksenicznych kulturach pełzaków. Natomiast wykrywano je po inkubacji komórkowego lizatu szczepu dawcy i wrażliwego heterologicznego szczepu biorcy. Komórki zakażonego szczepu *E. histolytica* ulegały lizie, a badaniami elektromikroskopowymi znajdowano cząstki wirusowe. Rozpoznano trzy morfologiczne formy: cząstki

wielościenne, cząstki włóknkowe i struktury paciorkowate. Dowody potwierdzające wirusowy charakter dwóch pierwszych cząstek są pewne, a dla trzeciego typu struktur — wysoce prawdopodobne.

Stosując przedstawioną metodę wykrywania wirusów, przeprowadzono szereg krzyżowych zarażeń, posługując się 10 szczepami *E. histolytica*, z których każdy służył jako szczep-dawca, a 9 z nich — jako szczepy-biorcy. Najważniejsze wnioski z tych badań są następujące:

1. Wszystkie szczepy są w sposób naturalny zarażone jednym lub wieloma wirusami i są odporne na własne wirusy. Wielościenne wirusy występowały we wszystkich szczepach, dwa szczepy posiadały wirusy włókniste, a cztery posiadały dodatkowo wirusy paciorkowate. Jeden ze szczepów był zarażony wszystkimi typami wirusów.

2. Wszystkie wirusy wielościenne były morfologicznie identyczne, jednak zasięg szczepów żywicielskich wskazywał na istnienie szeregu różnych wirusów wielościennych.

3. Dwa wirusy włókniste posiadały różny krąg żywicieli, co wskazuje na ich odrębność.

4. Krąg żywicieli wirusów paciorkowatych wskazuje na istnienie co najmniej dwóch różnych typów wirusów.

5. Wirusy różnią się znacznie w odniesieniu do kręgu żywicieli. Z jednej strony, wirus jednego dawcy zarażał 8-9 szczepów-biorców, a z drugiej — wirus dawcy zarażał tylko jeden szczep.

6. Dany wrażliwy szczep niekoniecznie reprodukuje cały wirusowy garnitur dawcy licznych typów cząstek.

Autorzy prowadzą dalsze badania, podobne do wymienionych, w których dawcy są klonami 3 szczepów pełzaków. Jak dotychczas stwierdzili, wszystkie klony zawierają wirusowy komplet rodzicielskiego, dzikiego szczepu.

Z kilku doniesień dotyczących badań epidemiologicznych przy zastosowaniu metod serologicznych, pragnę przedstawić doniesienie G. R. Healy z Center for Disease Control (Atlanta, USA). Autor stwierdził, iż w ciągu ostatnich 10 lat w CDC stosowano test bezpośredniej hemaglutynacji jako rutynową metodę diagnostyczną oraz — w połączeniu z badaniami klinicznymi i parazytologicznymi — jako metodę w różnych dociekaniach epidemicznych. Od 1966 do 1974 r. zgłaszano do CDC średnio 2757 przypadków amebiazy rocznie. W 1966 r., kiedy zastosowano po raz pierwszy test bezpośredniej hemaglutynacji dla celów diagnostycznych, dostarczono 522 surowice, z których 12% było pozytywnych; w 1970 r. — 2055 surowic, w tym 11,5% pozytywnych, a w 1974 r. — 8055 surowic, w tym 6,6% pozytywnych. Zdaniem autorów, w ciągu ostatnich 10 lat w USA nie miała miejsca żadna epidemia amebiazy. Z drugiej strony, w szeregu badaniach stwierdzono endemiczne wystę-

powanie choroby w wybranych grupach ludności, potwierdzone badaniami serologicznymi. Obejmowały one inwazyjną amebiazę w trzech zakładach dla umysłowo chorych (10-54% seropozytywności) oraz rodzinne i małomiasteczkowe endemie z różnym odsetkiem dodatnich prób serologicznych. Zastosowano również test bezpośredniej hemaglutynacji dla przebadania ponad 6000 surowic przekazanych z terenu całego kraju dla innych badań; odsetek dodatnich surowic był niski (0-5).

B. Sepúlveda (Meksyk), przewodniczący komitetu organizacyjnego Konferencji, przedstawił wyniki prac grupy badaczy z Centro Médico National, dotyczące immunologii amebiazy. Podjęte badania obejmowały zagadnienia odporności humoralnej, odporności komórkowej, wywoływania odporności na drodze doświadczalnej i poinwazyjnej immunizacji u ludzi. Odporność humoralna charakteryzuje się obecnością krążących przeciwciał przeciwpełzakowych, rozpoznawalnych za pomocą różnych metod serologicznych; metody te mają znaczenie zarówno w diagnostyce, jak i w badaniach epidemiologicznych. Przeciwciała są zlokalizowane głównie we frakcji IgG i należą prawdopodobnie do podklasy IgG2. Wydają się pełnić rolę obronną, ponieważ zarówno ludzka surowica odpornościowa, jak i gammaglobuliny z niej izolowane wywołują cytolizę trofozoitów *E. histolytica*. Co więcej, ludzka surowica odpornościowa neutralizuje wirulencję kultur *E. histolytica*. Odporność komórkową u pacjentów wyleczonych z pełzakowych ropni wątrobowych można wykazać za pomocą następujących testów: a) testu reakcji śródskórnej z antygenem pełzakowym, b) testu zahamowania migracji limfocytów, c) testu rozetkowego i d) testu aktywności uczulonych limfocytów w stosunku do trofozoitów *E. histolytica*. Wiadomo również, że zwierzęta poddane immunosupresji są bardziej wrażliwe na patogenne działanie pasożyta. Doświadczalnie bierną odporność przeciwpełzakową można wywołać przez iniekcję odpornościowej surowicy ludzkiej. Czynną odporność można wzbudzić przez: a) iniekcję antygeny pełzakowego, b) iniekcję żywej kultury pasożyta, c) zarażenie pełzakami wyleczone metronidazolem. Według autorów reinwazje *E. histolytica* u osób wyleczonych z ropni wątrobowych są wyjątkowe (w ich obserwacjach 0,3% wśród 1000 przypadków). Jest to dowodem, według autora, że ciężkie przypadki amebiazy wywołują odporność. Autor wnioskuje, że wywołanie odporności przeciwpełzakowej u ludzi będzie możliwe wtedy, gdy otrzyma się skuteczny i nieszkodliwy antygen. Badania w tym zakresie są na etapie eksperymentu.

H. J. Bos i A. A. Van Den Eijk (Holandia) przedstawili wyniki zastosowania względnie nowej metody Elisa (Engvall i Perlmann, 1972) w serodiagnostyce amebiazy, porównując je z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu testów immunofluorescencji i dyfuzji w żelu. Surowice pacjentów z pełzakowymi ropniami wątroby wykazały dodatnie, wysokie

miana w metodzie Elisa, skorelowane z wynikami testów immunofluorescencji i dyfuzji w żelu. Natomiast trudno było wyciągnąć ostateczne wnioski z wyników dotychczasowych badań surowic pacjentów z czerwonością pelzackową lub zapaleniem okrężnicy. U połowy mieszkańców kraju zarażonych bezobjawowo *E. histolytica* stwierdzono niskie miana metodą Elisa, co może wskazywać na pewien kontakt pasożytów z tkanką żywicieli. Test Elisa z racji dużej czułości, możliwości obiektywnego oznaczenia ilościowego i łatwego wykonywania, zdaniem autorów, może mieć duże zastosowanie w serodiagnostyce amebiazy.

Witold Kasprzak