

Andrzej SADZIKOWSKI, Jerzy Lech GUNDŁACH

**Odpowiedź immunologiczna szczurów uodpornionych ekstraktem
somatycznym *Fasciola hepatica***

Иммунологический ответ крыс, иммунизированных соматическим экстрактом
Fasciola hepatica

Immunological Response in Rats Immunized with a Somatic Extract
of *Fasciola hepatica*

Jak wynika z piśmiennictwa dotyczącego badań immunologicznych układu *Fasciola*—żywicieli, dotychczas najczęstszym celem uodpornienia zwierząt materiałem uzyskanym z motylicy wątrobowej było otrzymanie surowic do celów diagnostycznych, a także do badań struktury antygenowej tej przywry.

W ostatnich latach obserwuje się intensyfikację badań nad immunoprofilaktyką fasciolozы, a większość z nich przeprowadzana jest na szczurach, które uważa się za wygodne zwierzę modelowe, reagujące immunologicznie podobnie na inwazję *F. hepatica* jak bydło. Autorzy tych prac uodporniali zwierzęta antygenami uzyskiwanymi z różnych stadiów rozwojowych motylicy, stosując różnorodną procedurę immunizacji. W większości cytowanych prac autorzy nie określali metodami immunologicznymi stopnia indukowanej odpowiedzi, a jedynym jej miernikiem był procent przywr rozwijających się z dawki sprawdzającej metacerkarii (4, 5, 7, 9, 14).

Założeniem badań własnych było określenie poziomu odpowiedzi humoralnej i komórkowej u szczurów uodpornionych różnymi drogami oraz wybór optymalnej metody immunizacji tych zwierząt, przydatnej do badań nad immunoprofilaktyką fasciolozы.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto jako antygeny ekstraktu somatycznego *Fasciola hepatica* (EFh), o zawartości białka 72,5%, uzyskanego według Kenta (10) w modyfikacji Gundłacha (6).

Badania przeprowadzono na 52 szczurach rasy Wistar, w wieku 5 tygodni, podzielonych na 5 grup. Zwierzęta 4 grup po 12 sztuk uodporniono podając: w grupie I — domięśniowo po 5 mg EFh w 0,1 ml płynu fizjologicznego (pf); w gru-

pie II — domięśniowo po 5 mg EFh w 0,05 ml pf z dodatkiem 0,05 ml niekompletnego adjuwantu Freund'a; w grupie III — podskórnie w stożkę po 5 mg EFh w 0,1 ml pf; w grupie IV — podskórnie w stożkę po 5 mg EFh w 0,05 ml pf z dodatkiem 0,05 ml niekompletnego adjuwantu. Pozostałe 4 szczury stanowiły grupę kontrolną.

Po 2, 4, 6 tygodniach po immunizacji poddawano eutanazji po 4 zwierzęta z grup doświadczalnych, pobierając krew w celu uzyskania surowicy oraz śledzony do wykonania testu zahamowania migracji komórek. Szczury grupy kontrolnej uśmiercono w połowie doświadczenia. Surowice uzyskane od zwierząt poszczególnych grup łączono, liofilizowano i przetrzymywano w temp. 0°C.

Odczyn podwójnej dyfuzji (OPD) wykonywano według Ouchterlony'ego (12), stosując 1% agarozę w buforze weronałowym o pH 8,2. Odległość między basenami o średnicy 6 mm wynosiła 7 mm. Do odpowiednich basenów wkraplano czterokrotnie koncentrowane surowice oraz antygen — EFh w pf o koncentracji 20 mg/ml.

Test zahamowania migracji komórek śledzony (TZM) wykonywano według Pomorskiego (13) oddzielnie dla każdego szczura. Indeks migracji obliczano wg wzoru:

pole migracji komórek z dodatkiem antygeny

pole migracji komórek bez antygeny

W oparciu o uzyskane wyniki wyliczono średni indeks hamowania komórek dla danej grupy zwierząt.

WYNIKI

Przeprowadzona immunizacja nie wpłynęła negatywnie na zachowanie i kondycję użytych do doświadczeń zwierząt. U szczurów uodpornionych EFh z dodatkiem adjuwantu nie obserwowano zmian zapalnych w miejscu iniekcji.

Pojawienie się precypityn i ich występowanie w surowicach szczurów było zależne od drogi podania antygeny oraz dodatku adjuwantu. Podanie EFh domięśniowo bez adjuwantu (grupa I) nie prowadziło do powstania odpowiedzi humoralnej, ponieważ nawet w czterokrotnie koncentrowanych surowicach nie stwierdzono precypityn w ciągu całego doświadczenia. Natomiast krótkotrwałe występowanie tych przeciwciał formujących jedną linię precypitacyjną stwierdzono u szczurów grupy II 2 tygodnie po immunizacji domięśniowo EFh z dodatkiem adjuwantu. Również krótkotrwałą obecność precypityn, także tworzących jedną linię obserwowaną tylko w 4 tygodniu, stwierdzono u szczurów grupy III po podaniu EFh podskórnie w stożkę. Najsilniej wyrażoną odpowiedź humoralną stwierdzono u zwierząt uodpornionych EFh podskórnie w stożkę, z dodatkiem adjuwantu (grupa IV), u których precypityny zgrupowane w 2 linie występowały w 2 i 4 tygodniu po immunizacji (tab. 1).

W teście zahamowania migracji komórek śledzony w grupie I, tj. zwierząt uodpornionych domięśniowo bez adjuwantu, stwierdzono w 4 tygodniu pobudzenie migracji komórek, a w pozostałych okresach badań

wartości indeksu migracji odbiegały nieznacznie od wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej. U zwierząt grupy II, uodpornionych tą samą drogą, ale z dodatkiem adjuwantu, wartości indeksu migracji były w przebiegu całego doświadczenia nieznacznie wyższe od indeksu określonego dla całej grupy kontrolnej. Natomiast w obu grupach szczurów immunizowanych podskórnie w stopę (grupy III i IV) wartości indeksu migracji

Tab. 1. Wyniki odczynu podwójnej dyfuzji — OPD (liczba linii precypitacyjnych) oraz testu zahamowania migracji komórek śledziony — TZM (średni indeks migracji oraz $\pm S$) szczurów uodpornionych EFh oraz kontrolnych

Results of double immunodiffusion test — DID (number of precipitin lines) and spleen cells migration inhibition test — MIT (mean migration index and $\pm SD$) in rats immunized with EFh and control

Grupa	Sposób podania antygenu	n	Tygodnie po immunizacji					
			2		4		6	
			OPD-DID	TZM-MIT	OPD-DID	TZM-MIT	OPD-DID	TZM-MIT
I	Domięśniowo	12	0	0,89 $\pm$ 0,17	0	1,22 $\pm$ 0,35	0	0,85 $\pm$ 0,23
II	Domięśniowo z adjuwantem	12	1	1,13 $\pm$ 0,28	0	1,09 $\pm$ 0,28	0	0,97 $\pm$ 0,10
III	Podskórnie w stopę	12	0	1,12 $\pm$ 0,10	1	1,36 $\pm$ 0,24	0	0,75 $\pm$ 0,03
IV	Podskórnie w stopę z adjuwantem	12	2	1,86 $\pm$ 0,16	2	1,79 $\pm$ 0,13	0	0,64 $\pm$ 0,02
Kontrola		4			0	0,90 $\pm$ 0,05		

zachowywały się podobnie. W 2 i 4 tygodniu po uodpornieniu stwierdzono pobudzenie migracji komórek, większe w grupie zwierząt, która otrzymała antygen z adjuwantem. W 6 tygodniu po uodpornieniu w obu tych grupach nastąpiło wyraźne hamowanie migracji (tab. 1).

OMÓWIENIE

Stwierdzono, że stopień odpowiedzi immunologicznej szczurów był niski i krótkotrwały. Badania własne wykazały, że stopień odpowiedzi humoralnej na uodpornienie zależał wyraźnie od drogi podania antygeny oraz ewentualnego dodatku adjuwantu. Najbardziej optymalną drogą podania EFh u tego gatunku zwierząt jest iniekcja podskórna w stopę, wywołująca powstawanie precypityn bez względu na obecność adjuwantu. Również Howell (7), opierając się na badaniach Binaghi i wsp. (3), uważa tę drogę wprowadzenia antygeny za bardziej efektywną niż iniekcje domięśniowe lub dootrzewnowe. Autor ten, po dwukrotnej immunizacji szczurów w stopę precypitatem uzyskanym przez inkubację metacerkarii *F. hepatica* w surowicy odpornościowej, otrzymał w odczy-

nie podwójnej dyfuzji 2 linie precypitacyjne, podczas gdy po podaniu tych antygenów dootrzewnowo i domięśniowo stwierdzono występowanie tylko 1 linii (8).

Kontrowersyjna jest rola adjuwantu w procesie immunizacji zwierząt przeciwko *F. hepatica*. Wyniki badań własnych wskazują, że niekompletny adjuwant Freund'a wpływał znacząco na odpowiedź humoralną oraz komórkową, co wyrażało się między innymi wcześniejszym pojawieniem się przeciwciał i ich dłuższym okresem występowania w grupach zwierząt immunizowanych z dodatkiem tego preparatu. Jak wynika z piśmiennictwa, część autorów nie obserwowała wpływu adjuwantu na stopień odporności na zarażenie metacerkariami *F. hepatica* szczurów immunizowanych. Świadczą o tym prace Howella i Sandemana (8) i Hughesa i wsp. (9), którzy stosowali adjuwant kompletny, oraz Davies i wsp. (5), którzy używali adjuwantu niekompletnego. Inni autorzy uzyskali natomiast nieco odmienne rezultaty. Howell (7), Rajasekariah i wsp. (14) stwierdzili mianowicie, że podanie szczurom kompletnego adjuwantu Freund'a bez antygeny prowadziło także do redukcji liczby przywrw w porównaniu do grupy kontrolnej. Wskazywałoby to na niespecyficzną stymulację układu obronnego żywiciela, w czym główną rolę odgrywają prawdopodobnie w tym przypadku prątki, będące jednym ze składników kompletnego adjuwantu. Powstanie takiej nieswoistej odporności na inwazję różnych gatunków pasożytów udawało się wywołać podając zwierzętom BCG (16, 17).

Odrębnego omówienia wymaga dynamika odpowiedzi komórkowej po przeprowadzonej immunizacji. Odpowiedź komórkowa u zwierząt zarażonych *F. hepatica* rzadko była przedmiotem badań, brak jest natomiast zupełnie doniesień na ten temat w odniesieniu do zwierząt immunizowanych. Autorzy tych nielicznych prac stosowali różne modyfikacje testu zahamowania migracji, używając jako komórek wskaźnikowych leukocytów obwodowych, makrofagów otrzewnowych lub komórek narządów limfoidalnych. Wyniki cytowanych prac wskazują na rozwój odpowiedzi komórkowej w przebiegu fasciolozy królików, świnek morskich, kóz, owiec i cieląt oraz na wysoką przydatność tego testu do badań stanu odporności komórkowej (1, 2, 13, 15).

W badaniach własnych hamowanie migracji komórek, będące wynikiem pojawienia się populacji uczulonych limfocytów u zwierząt immunizowanych EFh, obserwowano jedynie w grupach szczurów uodpornionych podskórnie w stopę, przy czym w obu omawianych grupach hamowanie migracji poprzedzone było silnym pobudzeniem migracji komórek. Zjawisko to, także poprzedzające bezpośrednio okres hamowania migracji, obserwowano m. in. w przebiegu fasciolozy królików i cieląt, a także u

kurczą szczepionych przeciw chorobie Newcastle, jednak jego mechanizm oraz swoistość nie są całkowicie jasne (1, 11, 13).

Jak wynika z przeprowadzonych badań, odpowiedź humoralną i komórkową obserwowano jedynie w grupach zwierząt uodpornionych podskórnie w stopę, przy czym była ona silniej wyrażona u szczurów, którym podawano antygen wraz z adjuwantem. W związku z tym wydaje się, że podawanie antygeny tą drogą z dodatkiem adjuwantu powinno być metodą z wyboru w modelowych badaniach nad immunoprofilaktyką inwazji *F. hepatica* u szczurów.

WNIOSKI

1. Jednorazowe podanie szczurom ekstraktu somatycznego *F. hepatica* indukuje niskiego stopnia odpowiedź humoralną, zależną od drogi wprowadzenia antygeny.
2. Dodatek do antygeny niekompletnego adjuwantu Freund'a wpływa znacząco na występowanie w surowicy precypityn.
3. Hamowanie migracji komórek śledziony, będące miernikiem stanu odpowiedzi komórkowej, obserwowano jedynie w 6 tygodniu po immunizacji w grupach szczurów uodpornionych podskórnie w stopę, było ono poprzedzone silnym pobudzeniem migracji komórek.
4. Optymalną drogą podania ekstraktu somatycznego *F. hepatica* w celu wywołania u szczura odpowiedzi immunologicznej jest iniekcja podskórna w stopę.

PIŚMIENNICTWO

1. Aalund O., Nansen P.: Migration inhibition testing on peripheral leucocytes from liver fluke infected rabbits. *Acta Vet. Scand* 13, 591, 1972.
2. Aalund O., Nielsen K., Eriksen L.: Migration inhibition studies on peripheral leukocytes and lymph node cells from ruminants with fascioliasis. *Acta Vet. Scand.* 13, 290, 1972.
3. Binaghi R. A., Perrudet-Badoux A., Boussac-Aron Y.: Rapid and high production of precipitating antibodies in rats. *J. Immunol. Methods* 7, 65, 1975.
4. Burden D. J., Hammet M. C.: *Fasciola hepatica*: Attempts to immunise rats using fluke eggs and *in vitro* culture products. *Vet. Parasit.* 7, 51, 1980.
5. Davies C., Rickard M. D., Smyth J. D., Hughes D. L.: Attempts to immunise rats against infection with *Fasciola hepatica* using *in vitro* culture antigens from newly excysted metacercariae. *Res. Vet. Sci.* 26, 259, 1979.
6. Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozy owiec i bydła. *Praca habil.* AR, Lublin 1977.
7. Howell M. J.: Vaccination of rats against *Fasciola hepatica*. *J. Parasit.* 65, 817, 1979.

8. Howell M. J., Sandeman R. M.: *Fasciola hepatica*: some properties of a precipitate which forms when metacercariae are cultured in immune rat serum. *Int. J. Parasitol.* 9, 41, 1979.
 9. Hughes D. L., Harness E., Doy T. G.: The different stages of *Fasciola hepatica* capable of inducing immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitised rat. *Res. Vet. Sci.* 30, 91, 1981.
 10. Kent N. H.: Isolation of specific antigens from *Ascaris lumbricoides* (var. suum). *Expl. Parasit.* 10, 313, 1960.
 11. Larski Z., Grabowska G., Spohr de Faúndez I.: Poziom przeciwciał HI i indeks hamowania migracji leukocytów u kurcząt po dwustopniowym doustnym szczepieniu przeciw chorobie Newcastle. *Medycyna Wet.* 33, 153, 1977.
 12. Ouchterlony O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5, 1, 1958.
 13. Pomorski Z. J. H.: Development of the cellular immune reaction in the course of experimental or natural *Fasciola hepatica* (Trematoda) infection in cattle. *Acta Parasit. Pol.* 27, 517, 1980.
 14. Rajasekariah G. R., Mitchell G. F., Chapman C. B., Montague P. E.: *Fasciola hepatica*: attempts to induce protection against infection in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. *Parasitology* 79, 393, 1979.
 15. Renz B.: Die Immunantwort bei der experimentellen Fasciolose und Dicrocoeliose des Kaninchens. Inaug. Diss. Zürich 1972.
 16. Thompson R. C. A., Howell M. J.: Effect of BCG on the resistance of rats to infection with *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenkd.* 61, 93, 1979.
 17. Tribouley J., Tribouley-Duret J., Apprion M.: Influence du bacille de Calmette et Guérin (BCG) sur la migration larvaire de *Schistosoma mansoni* chez la souris. *Annals Parasitol.* 55, 87, 1980.
- Wpł. 6 XII 1982 r.

РЕЗЮМЕ

Крыс породы Вистар подвергли иммунизации соматическим экстрактом *Fasciola hepatica* (ЭФh), вводя его внутримышечно или подкожно в стопу без или с прибавкой некомплетного адьюванта Фрейнда. С применением реакции двойной диффузии или теста заторможения миграции клеток селезенки через 2, 4, 6 недель после иммунизации определяли степень гуморального и клеточного ответа. Исследования показали низкий и кратковременный иммунологический ответ на введенных антиген. Наиболее оптимальным путем ввода ЭФh признали подкожную инъекцию в стопу, вызывающую как гуморальный, так и клеточный ответ. Наблюдали также влияние прибавки к антигену некомплетного адьюванта Фрейнда на продолжительность появления преципитинов в сыворотках иммунизированных животных.

SUMMARY

Wistar rats were immunized intramuscularly or subcutaneously into a foot-pad with a somatic extract of *Fasciola hepatica* (EFh) with or without a Freund's incomplete adjuvant. The degree of humoral and cellular response was determined

after 2,4 and 6 weeks in a gel double diffusion test and in a spleen cells migration inhibition test. A low and short lasting immunological response to the applied antigen was found. For the most effective route of immunization with EFh, which stimulated both humoral and cellular response, was admitted subcutaneous injection of the antigen into a foot-pad. The influence of an incomplete Freund's adjuvant added into the antigen on the time of precipitin appearance in sera of immunized animals was also observed.

Jerzy RZEDZICKI, Józef MIKUCKI,
Maria KOWALSKA

Poziom immunoglobulin surowiczych z ciałek w dwóch systemach utrzymania w okresie wiosennym i letnim*

Wpływ sposobu immunizowania i czasu z jego częstotliwością odparowania (sezonu) w rezultacie

Immunoglobulin Levels in Sera of Rabbits in Two Feeding Systems in Spring and Summer

Występujące straty w hodowli królików, zwłaszcza w fermach przemysłowych, wynikają głównie z zachorowań i śmiertelności ciałek w okresie odchowu. Przy badaniu przyczyn zwiększonej podatności noworodków na zakażenia wielu autorów zwraca uwagę, że ciałka chorze w porównaniu ze zdrowymi przeżywalymi w tych samych warunkach wykazują znacznie niższą zawartość surowiczych immunoglobulin (28, 31, 32, 33, 34, 35). Bernstein i Seimann (1) oraz Reelid (29) stwierdzili, że ciałka z wyższym ogólnym poziomem immunoglobulin przeżywały zakażenia bez względu na to, czy zachorowało kręcenie. Wielu badaczy uważa, że istnieje możliwość prognozowania stanu zdrowia na podstawie stwierdzonego ogólnego poziomu immunoglobulin (1, 27, 32, 33, 35) a zwłaszcza stężenia niektórych klas tych białek oszczepniczych (3, 4, 13, 14, 15, 21, 22, 31, 32) w surowicy ciałek nowo narodzonych.

Mimo prowadzonych licznych badań dotychczas nie wyjaśniono kompletnie składowości prowadzącej do wystąpienia śmiertelności aparycznej i hipogammaglobulinemii (AG HGB) u noworodków ciałek króliczych oraz zaburzenia odporności humoralnej u ciałek chorej matki. Wiele powodów może prowadzić m.in. w wyniku optymalnego podania dawki wazy przez matkę (3, 4, 17, 18, 24, 25) podawania zbyt dużej ilości dawki o niskiej wartości immunologicznej (5, 11, 23, 24, 32), a nawet niedostatecznej jej podania (25). Inne HGB noworodka są również zależne od ciałek polojnych matki w sposób pośredni (3, 23, 24, 27, 31, 32). W poszukiwaniu innych przyczyn występowania zaburzeń odporności matki wykazano, że supresyjny wpływ zarodka na wytworzenie przeciwciał aparycznych, jak również ich poziom

* Badania finansowane w ramach projektu MRB-1977.