

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XLIX, 1

SECTIO DD

1994

KATEDRA PARAZYTOLOGII I KLINIKA CHOROBY PASOŻYTNICZYCH
WYDZIAŁU WETERYNARYJNEGO AR W LUBLINIE

Jerzy Lech GUNDŁACH, Andrzej Bernard SADZIKOWSKI

**Dynamika przeciwciał homocytotropowych w przebiegu doświadczalnej inwazji
Fasciola hepatica u owiec i bydła oraz próba alergicznej diagnostyki fasciolozы**

Dynamics of Homocytotropic Antibodies in the Course of Experimental *Fasciola hepatica* Invasion
in Sheep and Cattle and a Trial of Allergic Diagnosis of Fascioliasis

Z dotychczasowych badań zjawisk immunologicznych w przebiegu inwazji motylicy wynika, że przeciwciała homocytotropowe stwierdzano u doświadczalnie zarażonych cieląt i szczurów (2, 3, 4, 5, 13). Brak jest natomiast danych dotyczących dynamiki i charakterystyki przeciwciał homocytotropowych u zarażonych motylicą owiec, chociaż wiadomo, że w przebiegu inwazji innych pasożytów przeciwciała te występują u zwierząt tego gatunku (1, 16). Na możliwość ich występowania u owiec zarażonych motylicą wskazuje charakter odczynu skórno obserwowany podczas prób alergicznej diagnostyki tej inwazji (10, 11).

Celem badań było prześledzenie dynamiki przeciwciał homocytotropowych indukowanych doświadczalną inwazją motylicy u owiec i cieląt, charakterystyka fizykochemiczna tych przeciwciał oraz próba diagnostyki alergicznej tej inwazji u wymienionych gatunków zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta. Do badań użyto 5 owiec zarażonych metacerkariami *Fasciola hepatica* w dawce 20/kg mc oraz 3 wolne od inwazji. Na podstawie wyników badania sekcyjnego wykonanego 135 dnia doświadczenia zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupa I o wysokiej intensywności inwazji (424, 425 motylic), grupa II o niższej intensywności inwazji (101, 139, 193 przywry), grupa kontrolna – wolna od inwazji. Ośiem cieląt zarażono podając po 600 metacerkarii *F. hepatica*, a 4 zwierzęta niezarażone stanowiły grupę kontrolną. Na podstawie badania sekcyjnego wyodrębniono dwie grupy doświadczalne: grupa I o średniej intensywności inwazji – 32 motylicy (26, 30, 32, 41), grupa II o intensywności inwazji – 18 przywr (12, 27, 21, 21). Do badań użyto także 40 owiec i 56 krów podejrzanych o naturalne zarażenie motylicą wątrobową.

Surowice. Od owiec zarażonych *F. hepatica* i kontrolnych surowice pobierano w odstępach tygodniowych do 77 dnia doświadczenia, a następnie dwutygodniowych do 133 dnia. Surowice od cieląt pobierano w odstępach tygodniowych do 70 dnia inwazji, a następnie dwutygodniowych do 126 dnia. Do testów używano mieszaniny liofilizowanych surowic owiec lub cieląt poszczególnych grup.

Antygeny. Do badań użyto ekstraktu somatycznego *F. hepatica* (EFh), frakcji III EFh, frakcji III ekstraktu metabolicznego (E III), ekstraktów somatycznych przywr *Paramphistomum* sp. (EPs) i *Dicrocoelium dendriticum* (EDd) uzyskanych według metod opisanych uprzednio (9).

Metody badań. Metodę dekantacji wykonywaną zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami stosowano u zwierząt podejrzanych o naturalne zarażenie motylicą oraz określano długości okresu prepatentnego inwazji u zwierząt doświadczalnych. Parazytologiczne badania sekcyjne miały na celu określenie intensywności eksperymentalnej lub naturalnej inwazji motylicy u zwierząt użytych do badań.

Odczyn biernej skórnej anafilaksji wykonywano według Doyle'a (4, 5). Surowice doświadczalne zarażonych owiec lub cieląt wprowadzano śródskórnie 2 owcom lub 2 cielętom wolnym od inwazji, w wygoloną skórę boków ciała, w ilości 0,2 ml, nierozcieńczone oraz rozcieńczone – owcze: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256; cielęce: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. Po 72 godz. zwierzętom podawano dożylnie ekstrakt EFh w dawce 100 µg białka/kg mc oraz 1% jałowy roztwór błękitu Evansa w dawce 1 ml/5 kg mc. Po 15–30 min. po iniekcji antygeny i barwnika oceniano zmiany zabarwienia skóry w miejscach wprowadzenia surowic, poszukując najwyższego rozcieńczenia surowicy dającego wyraźne zabarwienie. W celu kontroli dokonywano na tych samych zwierzętach iniekcje śródskórne surowic owiec lub cieląt wolnych od inwazji oraz 1% roztwór peptonu.

Charakterystykę przeciwciał homocytotropowych określano na podstawie ich wrażliwości na ogrzewanie w temp. 56°C i redukcję dwumerkaptoetanołem (2-ME) (8).

Odczyn skórny. Owcom podejrzany (w liczbie 40) o naturalne zarażenie *F. hepatica* wprowadzano śródskórnie w dolną powiekę 0,1 ml ekstraktu somatycznego EFh (tj. 20 µg białka) lub jego frakcję EFh III (15 µg białka). W drugą powiekę podawano 1% roztwór peptonu. Zwierzęta obserwowano przez 72 godz. oceniając zmiany w miejscach iniekcji antygenów. Krowom (56) podawano śródskórnie w szyję lub fałd ogonowy po 0,2 ml roztworu EFh, jego frakcję EFh III lub frakcję III ekstraktu metabolicznego E. Zmiany skóry oceniano 30 min. po wprowadzeniu antygenów. Obserwację kontynuowano przez 72 godz. Za wyniki dodatnie przyjmowano u owiec pojawienie się obrzęku powieki, po 20 min. powiększającego się i osiągnącego szczytowe nasilenie w 4 godz. po iniekcji (1–5 godz.). Po 6–7 godz. od momentu iniekcji obserwowano cofanie się obrzęku, który po upływie 12 godz. zupełnie zniknął. Odczyn ujemny charakteryzował się zgrubieniem w miejscu iniekcji ginącym po 1 godz. U cieląt dodatni odczyn skórny manifestował się pojawieniem po 15–30 min. płaskiego obrzęku. Początkowo obrzęk ten o ostro zarysowanych brzegach osiągał szczytowe nasilenie (grubość 30–40 mm) w 3 godz. po iniekcji (2–4 godz.), a cofanie się obrzęku następowało stopniowo po upływie 5 godz. i trwało u niektórych zwierząt do 30 godz. po iniekcji. Wynik wątpliwy charakteryzował się powstaniem po 30 min. małego (o grubości 10–15 mm) obrzęku zanikającego po upływie 2–3 godz. Powstanie jedynie niewielkiego zgrubienia skóry, utrzymującego się tylko ok. 30 min. i całkowicie zanikającego po 1–1,5 godz. świadczyło o wyniku ujemnym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki odczynu biernej skórnej anafilaksji wykazały obecność w surowicach zarażonych motylicą owiec i cieląt przeciwciał posiadających zdolność łączenia się z pewnymi komórkami organizmu tzw. komórkami docelowymi. Występowanie tych przeciwciał – homocytotropowych warunkuje obecność stanu nadwrażliwości typu wczesnego.

Dynamika przeciwciał homocytotropowych w przebiegu inwazji motylicy u owiec charakteryzuje się dwufazowością (tab. 1). Pierwsza, stosunkowo krótka faza, trwająca tylko od 2 do 6 tygodni inwazji, cechuje się pojawieniem tych

Tab. 1. Dynamika przeciwciał homocytotropowych w przebiegu doświadczalnej inwazji *Fasciola hepatica* u owiec i bydła
Dynamics of homocytotropic antibodies in the course of experimental *Fasciola hepatica* invasion in sheep and cattle

Zwierzęta	Miana Tygodnie inwazji														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19
Owce gr. I	0	n	1/4	1/256	1/256	1/256	1/16	1/8	1/4	1/4	1/16	1/16	1/4	n	n
Owce gr. II	0	n	n	1/64	1/128	1/128	1/16	1/8	1/4	1/4	1/8	1/8	1/4	n	n
Bydło gr. I	0	0	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1/8	—
Bydło gr. II	0	0	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1/4	—

n – surowica nierozcieńczona

n – undiluted serum

przeciwciał i wzrostem ich poziomu do maksymalnych wartości w 4–6 tygodniu. Okres ten odpowiada początkowej fazie migracji pasożytów w mięszu wątrobowym i maksymalnej stymulacji antygenowej, czego wyrazem jest również wysoki poziom innych przeciwciał obserwowany we wcześniejszych badaniach (8). W następnej fazie trwającej od 7 tygodnia inwazji do końca okresu prepatentnego (71–73 dni), a także w okresie patentnym (poza przejściowym niewielkim wzrostem poziomu w 11–13 tygodniu inwazji), ma miejsce stopniowy spadek miana przeciwciał. Wydaje się on być nie tylko następstwem przechodzenia przeciwciał homocytotropowych z łożyska naczyniowego i osadzania się na komórkach docelowych, ale również w okresie patentnym inwazji spadkiem ich syntezy w następstwie ogólnie niższej stymulacji antygenowej (8).

Wpływ intensywności inwazji na poziom tych przeciwciał był niewielki i przejawiał się nieco wyższymi mianami w surowicach owiec grupy I (tab. 1).

Odminną od obserwowanej u owiec dynamikę przeciwciał homocytotropowych stwierdzono u cieląt zarażonych motylicą (tab. 1). Pojawienie się tych przeciwciał stwierdzono w 4 tygodniu po zarażeniu. W dalszym okresie inwazji niski poziom przeciwciał utrzymywał się do 15 tygodni po zarażeniu, co być może świadczy o niewielkim stopniu ich syntezy. W ostatnich tygodniach doświadczenia notowano wzrost poziomu tych przeciwciał wyrażający się dodatnimi odczynami z surowicami zarażonych zwierząt w rozcieńczeniu 1/4–1/8.

Powyższe obserwacje własne potwierdzają wyniki badań Doylea (4), który wzrost poziomu tych przeciwciał obserwował od 16 tygodnia inwazji, a ich maksymalny poziom w 24–28 tygodniu po zarażeniu. Wzrost ten może być spowodowany zwiększoną syntezą przeciwciał, ale również nie można wykluczyć, że jest to następstwo zmniejszenia populacji komórek docelowych w wyniku ich degranulacji, np. w następstwie reakcji na ich powierzchni antygenów *F. hepatica* + przeciwciała homocytotropowe.

Stwierdzone w surowicach owiec i cieląt przeciwciała homocytotropowe okazały się termolabilne i wrażliwe na redukcję dwumerkaptoetanołem (tab. 2, 3). Dane te potwierdzają obserwacje Doylea (4) i jednocześnie wskazują na podobieństwo ich właściwości do ludzkich IgE (14).

Tab. 2. Wpływ temperatury na aktywność przeciwciał homocytotropowych
Effect of temperature on activity of homocytotropic antibodies

	Czas ogrzewania (w godz.) w temp. 56°C				
	0	0,5	1	2	4
Najwyższe miano surowicy reagującej dodatnio w odczynie biernej skórnej anafilaksji					
owce	1/64	1/64	1/16	1/4	0
bydło	1/4	n	±	–	–

n – surowica nierozcieńczona

n – undiluted serum

Tab. 3. Wpływ redukcji dwmerkaptotanołem na aktywność przeciwciał homocytotropowych
Effect of the reduction with dimercaptoethanol on activity of homocytotropic antibodies

Surowice		Najwyższe miano surowicy dającej dodatni wynik w odczynie biernej skórnej anafilaksji					
		n	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Owce	normalna	+	+	+	+	+	+
	redukowana 2ME	+	+	+	-	-	-
Bydło	normalna	+	+	+	-	-	-
	redukowana 2ME	+	-	-	-	-	-

W badaniach własnych nie stwierdzano reakcji dodatnich w odczynie biernej skórnej anafilaksji z podanymi w celach kontrolnych surowicami pochodzącymi od zwierząt wolnych od inwazji, jak również z podanym jako antygen peptonem.

U owiec do odczynu śródskórnopowiekowego jako antygenów użyto ekstraktu somatycznego EFh oraz jego frakcji EFh III, która – jak wykazano w badaniach wcześniejszych – zawierała swoiste rodzajowo antygeny funkcjonalne motylicy (9). Z ogólnej liczby 40 owiec podejrzanych o zarażenie motylicą odczynem skórnym inwazję motylicy wykryto u 29 owiec, co potwierdzono badaniem sekcyjnym. U pozostałych 11 owiec, u których uzyskano ujemny odczyn, nie znaleziono przywr (tab. 4).

Tab. 4. Wyniki odczynu skórniego i sekcji owiec
Results of intradermal test and post-mortem examinations of sheep

Liczba badanych owiec	Antygen	Próba skórna		Badanie sekcyjne	
		+	-	inwazja motylicy	wolne
20	EFh	15	5	15	5
20	EFh III	14	6	14	6

U bydła dodatni odczyn skórnym z ekstraktem EFh i frakcjami EFh III i E III uzyskano u 23 krów (na 31 badanych). W wyniku sekcji mającej na celu konfrontację wyników odczynu z faktycznym stanem inwazjologicznym zwierząt stwierdzono, że spośród 23 krów z dodatnim odczynem skórnym u 20 wykazano inwazję motylicy (z obecnością żywych motylic), a u pozostałych 3 stwierdzono wyraźne zmiany poinwazyjne w wątrobie. U pozostałych zwierząt, reagujących w odczynie ujemnie, nie stwierdzono inwazji *F. hepatica*. W odczynie skórnym z ekstraktami heterologicznymi EPs i EDd wykonanym na 5 zamotyliczonym krowach tylko w 1 przypadku uzyskano wynik wątpliwy (tab. 5).

Wyniki badań własnych dotyczące charakteru odczynu skórniego występującego u owiec i bydła naturalnie zarażonych motylicą wskazują, że odczyn ten ma

Tab. 5. Wyniki odczynu skórno i sekcji bydła
Results of intradermal test and post-mortem examinations of cattle

Liczba zwierząt	Antygen	Odczyn skórny						
		zarażone +	<i>F. hepatica</i>		zmiany poinwazyjne		wolne	
			±	-	+	-	+	-
20	EFh	10	0	0	2	3	0	5
10	EFh III	5	0	0	1	2	0	2
10	E III	5	0	0	1	2	0	2
8	EDd	0	1	3	0	2	0	2
8	EPs	0	0	4	0	2	0	2

przede wszystkim charakter odczynu wczesnego, jednakże obserwowane powolne zanikanie zmian, trwające do 30 godz. po iniekcji antygeny, sugeruje o udziale również komponenty komórkowej.

Dane z literatury dotyczące tego zagadnienia są całkowicie zgodne. Dominujący wczesny charakter odczynu skórno obserwowali Patnaik i Das (12), Vareječko (15) i inni, a na udział komponenty komórkowej wskazują wyniki badań Fricka (7), Flagstad i wsp. (6).

Obserwowany w badaniach własnych dominujący obraz odczynu skórno typu wczesnego uwarunkowany wydaje się być nie tylko obecnością przeciwciał homocytotropowych (typ I reakcji alergicznej), ale również – jak można przypuszczać – aktywnymi kompleksami antygen + przeciwciało humoralne (typ II reakcji alergicznej) (4). Natomiast mniejsze znaczenie w świetle przytoczonych danych można przypisać typowi IV reakcji uwarunkowanemu obecnością swoście uczulonej populacji komórek.

Uzyskane wyniki badań odczynu skórno wskazują na możliwość alergicznej diagnostyki fasciolozy i wysoką czułość tego odczynu. Odczyny dodatnie dla ekstraktu EFh oraz swoistych frakcji EFh III i E III uzyskano u wszystkich zwierząt, u których sekcyjnie potwierdzono obecność żywych pasożytów. Obserwowane reakcje dodatnie u zwierząt wykazujących zmiany poinwazyjne wskazują na utrzymywanie jeszcze przez pewien okres po śmierci motylic stanu uczulenia nawet przez okres 9 miesięcy (15). Natomiast ujemne wyniki odczynu u zwierząt wolnych od inwazji po podaniu swoistych frakcji podkreślają przydatność tych frakcji jako antygenów do alergicznej diagnostyki fasciolozy.

PIŚMIENNICTWO

1. Curtain C. C., Anderson N.: Parasite antigens and host antibodies in *Ostertagia circumcincta* infection of the sheep. Int. J. Parasit. 2, 449, 1972.
2. Doy T. G., Hughes D. L., Harness E.: Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: lack of correlation between reaginic antibody levels and rejection of flukes. Res. Vet. Sci. 30, 357, 1981.

3. Doy T. G., Hughes D. L., Harness E.: Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Res. Vet. Sci.* **30**, 360, 1981.
4. Doyle J. J.: Homocytotropic antibodies induced in calves by infection with *Fasciola hepatica*. *Int. Arch. Allergy* **45**, 744, 1973.
5. Doyle J. J.: Skin hypersensitivity reactions induced in calves by experimental infections with *Fasciola hepatica*. *Int. Arch. Allergy* **45**, 752, 1973.
6. Flagstad T., Andersen S., Nielsen K.: The course of experimental *Fasciola hepatica* infection in calves with a deficient cellular immunity. *Res. Vet. Sci.* **13**, 468, 1972.
7. Frick W.: Zum immunologischen Nachweis der Rinderfasciolose. *Arch. exp. Vet. Med.* **22**, 1011, 1968.
8. Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozy owiec i bydła. Rozprawa habilitacyjna AR, Lublin 1977.
9. Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozy owiec i bydła. Część I. Antygeny *Fasciola hepatica*, ich charakterystyka i właściwości immunologiczne. *Annales UMCS, sect. DD* **40**, 101, 1985.
10. Jochontow B. W.: K woprosu o specificznosti polisacharydnowo antigena iz fascioły obyknoviennoj. *Med. Żywot. Uzb.* **5**, 61, 1968.
11. Jochontow B. W.: K woprosu immuno-biologicheskoy diagnostiki fascioleza. *Wsech. Sb. Skol. i Biol. Żiw. Uzbekistana, Taszkient* **88**, 1969.
12. Patnaik B., Das H. M.: Diagnosis of fascioliasis in cattle by intradermal allergic test. *Cornell Vet.* **51**, 113, 1961.
13. Sadzikowski A.: Badania immunologiczne w przebiegu eksperymentalnej inwazji *Fasciola hepatica* u szczurów. *Annales UMCS, sect. DD* **39**, 91, 1984.
14. Stanworth D. R.: Immunoglobulin E (reagin) and allergy. *Nature* **223**, 310, 1971.
15. Vareječko J.: Persistence of allergy in fascioliasis cattle after treatment. *Sb. Vys. Sk. Zemed. Brno* **14**, 137, 1966.
16. Williams B. M.: Homocytotropic antibody to *Coenurus cerebralis* antigen in sheep. *Br. Vet. J.* **131**, 361, 1975.

SUMMARY

Passive anaphylactic cutaneous test was to determine dynamics of homocytotropic antibodies in sera of experimentally infected by *F. hepatica* sheep and calves. In sheep antibodies appeared 2 weeks after invasion, attained their peak at 4–6 weeks and slowly disappeared starting from the 7th week after invasion. In calves homocytotropic antibodies appeared 4 weeks after invasion, their low level was noted up to 15 weeks of the experiment and they increased at the 17th week. Antibodies were thermolabile and sensitive to 2-mercaptoethanol.

In sheep and cattle naturally infected by *F. hepatica* develops an early cutaneous allergic reaction. By means of intradermopalpebral test with EFh and EFh III antigens invasion of the liver fluke was determined in 29 sheep, which was confirmed by post-mortem examinations. Other 11 sheep with negative allergic test were free of *F. hepatica*. In 23 out of 31, cows fascioliasis was diagnosed by the skin allergic test with extract EFh and with fractions EFh III and E III. In 20 cows fascioliasis was diagnosed by post-mortem examination and in 3 cows post-invasive lesions in livers were noted.

The results point to a possibility of diagnosis in sheep and cattle fascioliasis by using the allergic test.