

JERZY LECH GUNDŁACH, ANDRZEJ SADZIKOWSKI

Dynamika precypityn oraz przydatność serodiagnostyczna odczynów immunoelektroprecypitacji (IEP) i podwójnej dyfuzji (OPD) w przebiegu fasciozy owiec

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Inwazja motylicy wątrobowej u ludzi i zwierząt indukuje odpowiedź immunologiczną, manifestującą się między innymi obecnością przeciwciał, które można wykazać różnymi odczynami serologicznymi. Dotychczas bardzo często do tego celu, z różnym powodzeniem, stosowano warianty odczynu precypitacji takie, jak odczyn podwójnej dyfuzji i odczyn immunoelektroforezy (1, 5, 7, 9, 10, 11, 17, 19, 28).

Ostatnio poczyniono próby zastosowania odczynu immunoelektroprecypitacji do wykrywania przeciwciał w przebiegu inwazji *Fasciola hepatica* u ludzi i niektórych gatunków zwierząt (12, 13, 14, 29). Metoda ta znana w piśmiennictwie anglosaskim pod nazwami cross-over electrophoresis, counter immunoelectrophoresis, counterelectrophoresis, countercurrent electrophoresis, electrosinensis i immunoelectrodifusion, w świetle danych z literatury wydaje się być najbardziej czułą spośród odczynów precypitacyjnych, przebiegających w środowisku stałym i polu elektrycznym. Sugestie tę potwierdzają wyniki badań nad przydatnością tej metody do serodiagnostyki amebozy (20), schistosomatozy (27), hydatidozy (25), toksokarozy (8), dirofilariozy (6), wucheriozy (16).

W związku z powyższym celem pracy jest obok określenia dynamiki precypityn w przebiegu doświadczalnej inwazji motylicy u owiec, również porównawcza ocena przydatności odczynów immunoelektroprecypitacji i podwójnej dyfuzji do serodiagnostyki tej inwazji.

Materiał i metody

Do badań użyto surowice pochodzące od owiec doświadczalnie i naturalnie zarażonych motylicą wątrobową oraz owiec wolnych od tej inwazji.

Surowice owiec doświadczalnie zarażonych uzyskano od 5 owiec, którym podano *per os* metacerkarie *F. hepatica* w ilości 20 tych form inwazyjnych na 1 kg c.c. Surowice pobierano początkowo w odstępach tygodniowych do 77 dnia doświadczenia, a następnie w dwutygodniowych do 133 dnia inwazji tj. do końca doświadczenia, liofilizowano i przechowywano w temp. -20°C . 135 dnia eksperymentu wykonano pośmiertne badania parazytologiczne w celu określenia intensywności inwazji. Do odczynów surowice te używano w stanie niekoncentrowanym oraz koncentrowanym 4-krotnie.

Do badań użyto również surowice 12 owiec rasy polskiej długowieśnej (w wieku 2—5 lat, wagi 45—70 kg) u których, w oparciu o badania koproskopowe stwierdzono naturalną inwazję motylicy wątrobowej oraz 10 surowic wolnych od inwazji *F. hepatica*. Surowice po zamrożeniu przechowywano w temp. -20°C , stosując je do odczynów w stanie niekoncentrowanym.

Jako antygenów użyto: — ekstrakt somatyczny *F. hepatica* (EFh), uzyskany z dojrzałych płciowo przywr wg metody Kenta (18) w modyfikacji Gundłacha (11) oraz przygotowane w analogiczny sposób ekstrakty somatyczne przywr *Dicrocoelium dendriticum* (EDd) i *Paramphistomum* sp. (EPs).

Odczyn immunoelektroprecypitacji (IEP) wykonano na płytkach szklanych o wymiarach 10×10 cm, pokrytych 20 ml 1% roztworu agaroz w buforze barbitałowym o pH 8,2. Na każdej płytce znajdowały się 3 rzędy par dołków o średnicy 3 mm. Odległość pomiędzy dołkami jednej pary wynosiła 4 mm. Badane surowice wkraplano do dołków znajdujących się bliżej anody, natomiast antygeny (EFh, EDd, EPs) w ilości 0,015 ml (ok. 0,011 mg białka) były wkraplane do dołków znajdujących się od strony katody. Elektroforezę przeprowadzano w komorze do elektroforezy stosując bufor barbitałowy o pH 8,2 przy $I=30$ mA, w temp. pokojowej przez 1,5 godz. W celu intensyfikacji linii precypitacyjnych po elektroforezie oraz usunięciu pozostałości surowic i antygenów, płytki płukano przez 72 godz. w 0,9% roztworze NaCl. Eliminację linii precypitacyjnych formowanych przez białko C przeprowadzono drogą inkubacji płytek przez 4 godz. w 5% roztworze cytrynianu sodu (21). Po przepłukaniu wodą destylowaną płytki odwadnia-

Tab. 1. Dynamika precypityn w odczynie immunoelektroprecypitacji (IEP) z surowicami owiec doświadczalnie zarażonych metacerkariami *Fasciola hepatica* i ekstraktem somatycznym motylicy wątrobowej (EFh)

Nr owcy	Inten- sywność inwazji	Surowice	Liczba linii precypitacyjnych																
			Tygodnie po zarażeniu																
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	
1	139	niekoncentrowane	—	—	1	1	1	1	1	1	2	nb	2	1	1	1	1	1	
		koncentrowane 4x	—	—	1	2	2	2	2	3	3	nb	3	3	3	2	2	2	
2	193	niekoncentrowane	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
		koncentrowane 4x	—	—	1	1	1	2	1	2	2	3	3	3	3	3	3	2	
3	223	niekoncentrowane	nb	—	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	
		koncentrowane 4x	nb	—	1	2	3	2	2	2	2	4	4	4	4	3	3	3	
4	238	niekoncentrowane	—	nb	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	
		koncentrowane 4x	—	nb	1	3	5	4	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	
5	290	niekoncentrowane	—	—	1	1	2	2	2	2	2	nb	2	1	1	1	1	1	
		koncentrowane 4x	—	—	1	3	4	3	3	3	3	nb	4	3	3	2	2	2	

Objaśnienie: n.b. — nie badano.

no przez 30 min. w mieszaninie etanol-woda-kwas octowy (70:25:5), przez 4 godz. w acetonie, a następnie suszono w temp. 37°C. Wysuszone płytki barwiono w 1% czerni amidowej, usuwając nadmiar barwnika przez płukanie w 2% roztworze kwasu octowego do momentu całkowitego odbarwienia tła.

Odczyn podwójnej dyfuzji (OPD) wykonywano wg Ouchterlony'ego (24) stosując 1% agarozę w buforze weronalowym o pH 8,2. Odległość między basenami wynosiła 0,7 cm, średnica basenów 0,6 cm. Po nastawieniu odczynów płytki umieszczano w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytywano co 24 godz. przez okres 7 dni. Eliminację linii precypitacyjnych tworzonych przez białko C przeprowadzono wg procedury opisanej wyżej.

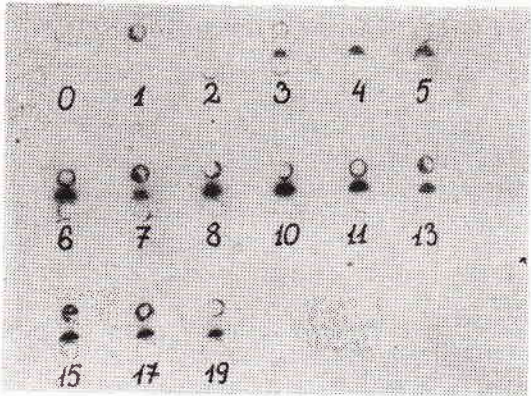
Wyniki badań

W wyniku badań parazytologicznych stwierdzono, że długość okresu prepatentnego u doświadczalnie zarażonych zwierząt wahała się w granicach 10–11 tyg., a intensywność inwazji u poszczególnych owiec wynosiła od 139 do 290 przywr.

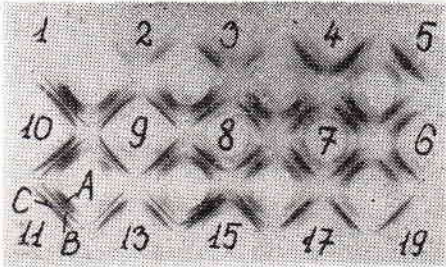
Odczynem immunoelektroprecypitacji wykrywano precypityny z ekstraktem EFh w niekoncentrowanych surowicach wszystkich tych owiec począwszy od drugiego tygodnia po zarażeniu przez cały okres doświadczenia tj. do 19 tyg. inwazji, obserwując obecność od 1 do 2 linii precypitacyjnych (tab. 1). W odczynie tym z surowicami koncentrowanymi obserwowano nie tylko dwukrotnie większą ilość linii precypitacyjnych oraz większą ich intensywność, ale również stwierdzono, że zaobserwowane wahania poziomu precypityn zależą od okresu inwazji i jej intensywności. Najwyższy poziom tych przeciwciał, wyrażający się największą ilością prążków precypitacyjnych obserwowano pomiędzy 3 a 13 tyg. inwazji, tj. głównie w jej okresie prepatentnym, a wpływ intensywności inwazji wyrażał się obecnością większej ilości linii precypitacyjnych u zwierząt z większą ilością przywr (tab. 1, ryc. 1).

Czas pojawienia się i występowania precypityn w niekoncentrowanych surowicach owiec doświadczalnych stwierdzony w odczynie podwójnej dyfuzji był podobny do obserwowanego w odczynie IEP. Przeciwciała te stwierdzano od 2–3 tyg. po zarażeniu przez cały okres doświadczalnej inwazji, obserwując występowanie od 1 do 3 linii precypitacyjnych (tab. 2). Uzyskany z surowicami koncentrowanymi i ekstraktem EFh obraz precypitacji w tym odczynie charakteryzował się dobrą czytelnością i wyrazistością,

stwierdzono bowiem obecność 3 wielokomponentowych kompleksów linii precypitacyjnych, które różniły się położeniem pomiędzy zbiornikami z reagentami. Pierwszy z kompleksów (A) leżał w pobliżu zbiorników z antygenami, drugi (B) w połowie odległości pomiędzy basenami i trzeci (C) w pobliżu zbiorników z surowicami (ryc. 2). Występowanie tak zróżnicowanych kompleksów obserwowano od 4–5 do 11–13 tyg. inwazji, tj. głównie w okresie prepatentnym. Natomiast z surowicami pochodzącymi z późniejszego okresu inwazji stwierdzono obecność jedynie kompleksu precypitacyjnego B (tab. 2, ryc. 2).



Ryc. 1. Dynamika precypityn w odczynie immunoelektroprecypitacji (IEP) z ekstraktem EFh w przebiegu doświadczalnej inwazji *Fasciola hepatica*. 0–19 — tygodnie inwazji



Ryc. 2. Dynamika precypityn w odczynie podwójnej dyfuzji (OPD) z ekstraktem EFh w przebiegu doświadczalnej inwazji *Fasciola hepatica*. 1–19 tygodnie inwazji, A, B, C — kompleksy linii precypitacyjnych

W oparciu o uzyskane wyniki badań można stwierdzić, że obydwa stosowane odczyny wykazały wysoką czułość, bowiem umożliwiły wykrycie precypityn w niekoncentrowanych surowicach wszystkich doświadczalnie zarażonych owiec. Natomiast dokładniejszy wgląd w dynamikę wahań poziomu tych przeciw-

Tab. 2. Dynamika precypityn w odczynie podwójnej dyfuzji (OPD) z surowicami owiec doświadczalnie zarażonych metacerkariami *Fasciola hepatica* i ekstraktem somatycznym motyliicy wątrobowej (EFh)

Nr owcy	Inten- sywność inwazji	Surowice	Liczba oraz kompleksy linii precypitacyjnych																
			Tygodnie po zarażeniu																
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	
1	139	niekoncentrowane	-	-	-	1	2	2	3	3	2	2	2	1	1	1	1		
		koncentrowane 4x	-	-	-	BC	BC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AB	B	B	B		
2	193	niekoncentrowane	-	-	1	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1		
		koncentrowane 4x	-	-	-	BC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AB	AB	AB	B		
3	223	niekoncentrowane	-	-	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1		
		koncentrowane 4x	-	-	C	BC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AB	AB	AB	B	
4	238	niekoncentrowane	-	-	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2		
		koncentrowane 4x	-	-	BC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AB	AB	AB	B	
5	290	niekoncentrowane	-	-	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2		
		koncentrowane 4x	-	-	BC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AB	AB	AB	B	

ciał możliwy jest przy użyciu odczynu podwójnej dyfuzji z surowicami koncentrowanymi, z uwagi na bardziej wyraźny i selektywny obraz linii precypitacyjnych.

Z niekoncentrowanymi surowicami owiec naturalnie zarażonych motylicą użyte odczyny wykazały ogólnie niższą i różną czułość. Bardziej czułym odczynem okazała się immunoelektroprecypitacja, którą przeciwciała wykryto w 6 spośród 12 badanych surowic (50%), obserwując od 1 do 3 linii precypitacyjnych. Natomiast w odczynie podwójnej dyfuzji dodatnio reagowały jedynie 4 surowice (33%) tworząc 1 linię precypitacyjną.

W badaniach kontrolnych nie obserwowano dodatknych reakcji ekstraktu EFh z surowicami owiec wolnych od inwazji motylicy, bez względu na stopień ich koncentracji.

Badania swoistości przeciwciał indukowanych inwazją *F. hepatica*, wykonane przy użyciu ekstraktów heterologicznych EDD i EPs, wykazały, że ekstrakty te reagowały jedynie z surowicami owiec doświadczalnie zarażonych motylicą a uzyskane rezultaty w obydwu odczynach były różne. W tym przypadku w odczynie IEP bardziej aktywny okazał się ekstrakt EPS, bowiem tworzył od 1 do 2 linii przede wszystkim z surowicami (koncentrowanymi), pochodzącymi z prepatentnego okresu inwazji (tab. 3). Natomiast ekstrakt EDD formował tylko jedną linię precypitacyjną. W odczynie podwójnej dyfuzji aktywność użytych ekstraktów była odwrotna tj. bardziej aktywnym okazał się ekstrakt EDD tworzący 2—4 linie z surowicami z okresu prepatentnego i 1—2 linie z surowicami z patentnej fazy inwazji. Natomiast ekstrakt EPs w tym odczynie formował tylko 1 linię precypitacyjną z surowicami owiec bez względu na czasokres ich pobrania (tab. 3).

Omówienie wyników

Badania dynamiki odpowiedzi humoralnej żywiciela na inwazję *F. hepatica* są możliwe jedynie w przebiegu doświadczalnej inwazji i obok aspektu poznawczego mają również istotne znaczenie praktyczne, bowiem zmierzają

do stworzenia realnych podstaw serodiagnostyki tej inwazji. Użycie do tego celu różnych modyfikacji odczynów precypitacyjnych, prócz oceny stopnia ich przydatności serodiagnostycznej, dostarcza w odróżnieniu od innych odczynów serologicznych istotnych informacji odnośnie wartości poszczególnych antygenów lub ich grup zawartych w ekstraktach totalnych do celów diagnostycznych.

Stwierdzona w badaniach własnych dynamika poziomu precypityn indukowanych doświadczalną inwazją *F. hepatica* u owiec kształtowała się podobnie w obydwu użytych odczynach, bowiem występowanie przeciwciał stwierdzano od 2—3 tyg. po zarażeniu do 19 tyg. inwazji, tj. do końca doświadczenia. Bardziej dokładne obserwacje, wskazujące na zależność poziomu przeciwciał nie tylko od intensywności inwazji, ale również od czasu jej trwania były możliwe do stwierdzenia przy użyciu do badań surowic koncentrowanych. W tym przypadku wpływ intensywności inwazji przejawiał się szybszym pojawieniem się precypityn jak i ogólnie wyższym poziomem, wyrażającym się większą ilością linii precypitacyjnych u zwierząt zarażonych większą ilością przywr. Powyższa obserwacja znajduje potwierdzenie w dotychczasowych wynikach badań innych autorów, dotyczących dynamiki odpowiedzi humoralnej indukowanej doświadczalną inwazją motylicy u owiec (1, 4, 9, 10, 15, 19, 22, 23, 26).

Wykazana zależność poziomu precypityn od czasu trwania inwazji wyrażała się najwyższym poziomem tych przeciwciał pomiędzy 4—6 a 13—15 tyg. inwazji, tj. głównie w jej okresie prepatentnym. Zależność ta uwidoczniała się szczególnie wyraźnie w odczynie podwójnej dyfuzji z surowicami koncentrowanymi, bowiem surowice pochodzące z tego okresu inwazji formowały z ekstraktem EFh trzy wielokomponentowe kompleksy linii precypitacyjnych (A, B,

Tab. 3. Dynamika precypityn w odczynach IEP oraz OPD z koncentrowanymi surowicami owiec doświadczalnie zarażonych metacerkariami *Fasciola hepatica* i ekstraktami somatycznymi *Dicrocoelium dendriticum* (EDD) oraz *Paramphistomum* sp. (EPs)

Nr owcy	Inten- sywność inwazji	Antygen	Metoda	Liczba linii precypitacyjnych Tygodnie po zarażeniu													
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
				17	19												
1	139	EDD	IEP	—	—	—	1	1	1	1	1	—	nb	1	1	1	1
			OPD	—	—	—	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
		EPs	IEP	1	—	—	1	2	2	2	2	1	nb	1	1	1	1
			OPD	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	193	EDD	IEP	—	—	1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	—
			OPD	—	—	—	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
		EPs	IEP	1	1	2	2	1	1	1	—	1	1	1	1	1	1
			OPD	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	223	EDD	IEP	nb	—	1	1	1	1	1	1	—	—	1	1	—	—
			OPD	—	—	1	2	2	3	3	3	3	3	2	1	1	1
		EPs	IEP	nb	—	2	2	2	2	2	2	—	1	1	1	1	1
			OPD	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	230	EDD	IEP	—	nb	—	1	1	1	—	1	1	1	1	1	1	—
			OPD	—	—	1	2	2	3	4	4	3	2	1	1	1	1
		EPs	IEP	—	nb	1	2	2	2	2	2	—	2	1	1	1	1
			OPD	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	290	EDD	IEP	—	—	1	1	1	1	1	1	1	nb	—	—	—	—
			OPD	—	—	1	2	3	4	4	4	4	3	2	2	1	1
		EPs	IEP	1	2	2	2	2	2	2	1	1	nb	1	1	2	2
			OPD	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Objaśnienie: n.b. — nie badano.

C). Ten wyższy poziom przeciwciał wydaje się być uwarunkowany faktem, iż w omawianym okresie inwazji niszą ekologiczną dla pasożytów stanowi środowisko mięszu wątrobowego a same pasożyty w tym okresie swego rozwoju podlegają szybkiemu i dynamicznemu rozwojowi morfo-fizjologicznemu. Te dwa momenty tj. ułatwiony kontakt antygenów z układem immunokompetentnym w tej histotropowej fazie inwazji, jak również zwiększająca się ilość materiału antygenowego (np. produktów przemiany materii), wydają się być czynnikami warunkującymi wyższy poziom przeciwciał.

W dalszym okresie inwazji, tj. od 13—15 tyg. do końca doświadczenia obserwowano spadek poziomu precypityn, uwidoczniający się wyraźniej także w odczynie podwójnej dyfuzji obecnością wyłącznie kompleksu precypitacyjnego B. W tym przypadku spadek poziomu przeciwciał w patentnym okresie inwazji wydaje się być uwarunkowany zmianą niszy ekologicznej przez przywry, które dojrzewając piciowo opuszczają środowisko mięszu wątrobowego, przechodzą sukcesywnie do światła przewodów żółciowych, tj. do miejsca ich ostatecznej lokalizacji w tym okresie inwazji. Aktywność antygenowa dojrziałych piciowo przywr jest równie silna jak postaci młodocianych, o czym świadczą wyniki badań immunofluorescencyjnych (4, 30). Pomimo tej aktywności antygenowej wynikającej chociażby z dużej biomasy pasożytów (139—290 przywr), niższy poziom przeciwciał w tym okresie inwazji zdaje się świadczyć o spadku stymulacji antygenowej żywiciela. Wydaje się, że przyczynami tego spadku stymulacji antygenowej mogą być: bariera, jaką stanowią ściany przewodów żółciowych, jak i stała eliminacja antygenów ze spływającą żółcią. Powyższe sugestie znajdują potwierdzenie w wynikach badań Caprona i wsp. (5) i Klimienki (19), którzy w odczynie podwójnej dyfuzji z surowicami pochodzącymi z późnego okresu inwazji uzyskiwali negatywne rezultaty.

Oceniając przydatność serodiagnostyczną obydwu stosowanych w badaniach własnych odczynów można stwierdzić, że w odniesieniu do surowic owiec doświadczalnie zarażonych, pochodzących z prepatentnego jak i patentnego okresu inwazji, wykazały one wysoką (100%) czułość przy intensywności inwazji wahającej się od 139 do 290 przywr. Inni autorzy w oparciu o uzyskane wyniki z eksperymentalnych inwazji różnie oceniają przydatność serodiagnostyczną omawianych odczynów. I tak Benex i wsp. (1) wykazali mniejszą przydatność odczynu podwójnej dyfuzji w patentnym okresie doświadczalnej inwazji, ale u owiec o niższej niż w badaniach własnych intensywności zarażenia. Natomiast bardziej czułym odczynem, jak wynika z badań Van Tiggele, Overa (29), wydaje się być odczyn immunoelektroprecypitacji, bowiem umożliwiał nie tylko w podobnym stopniu wykrywanie precypityn w obu okresach inwazji (od 3 do 26 tyg. inwazji doświadczalnej u owiec), ale także przy bardzo małej intensywności, która wahała się w granicach od 8 do 29 przywr.

Przytoczone powyżej dane z piśmiennictwa, uzyskane w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach eksperymentalnie zarażonych, wskazujące na wyższą czułość odczynu IEP, znalazły tylko częściowe potwierdzenie w naszych badaniach, wykonanych na owcach naturalnie zarażonych motylicą, bowiem w surowicach tych zwierząt odczynem immunoelektroprecypitacji przeciwciała wykryto w 50%, a odczynem podwójnej dyfuzji w 33%. Z powyższymi obserwa-

cjami własnymi w kontrowersji pozostają rezultaty badań Van Tiggele, Overa (29), którzy odczynem IEP wykrywali przeciwciała w 100% surowic pochodzących od owiec naturalnie zarażonych, u których intensywność inwazji była większa niż 4 przywry i w 75% surowic pobranych od owiec zamotyliczonych o intensywności inwazji wynoszącej 1—3 pasożyty. Zgodna jest natomiast nasza opinia jak i tych autorów odnośnie niższej w porównaniu z IEP czułości odczynu podwójnej dyfuzji.

Komentując kontrowersyjność dotyczącą różnic przydatności odczynu IEP do serodiagnostyki naturalnej fasciolozy owiec, przy uwzględnieniu podobieństwa metodycznego badań własnych jak i cytowanych autorów należy sądzić, że uzyskane przez nas wyniki badań, wskazujące na mniejszą przydatność tego odczynu w przebiegu chronicznej postaci fasciolozy, mogły być spowodowane jedynie obniżonym poziomem precypityn w patentnym okresie inwazji, bowiem surowice od naturalnie zarażonych owiec pobierano w 5 miesiącu po zakończeniu okresu pastwiskowego.

W ocenie przydatności odczynów serodiagnostycznych do wykrywania inwazji motylicy należy mieć na uwadze, że wartość odczynu zależy nie tylko od jego czułości uwarunkowanej przede wszystkim poziomem przeciwciał występujących w surowicach zamotyliczonych zwierząt, ale również od swoistości odczynu, determinowanej głównie właściwościami stosowanego antygenu. Swoistość odczynu jest szczególnie ważna w przypadku stosowania jako antygenu wielokompleksowego ekstraktu totalnego somy *F. hepatica*, zawierającego obok antygenów swoistych gatunkowo i rodzajowo również antygeny wspólne z innymi gatunkami pasożytów oraz substancję C (2, 3, 11, 31). Istotność tego zagadnienia podkreśla stwierdzenie w badaniach własnych dodatnich reakcji surowic owiec zarażonych motylicą z antygenami heterologicznymi tj. ekstraktami EDD i EPs, co wskazuje również na fakt, że niektóre spośród antygenów funkcjonalnych zawartych w ekstraktach somatycznych są wspólne dla różnych gatunków pasożytów. Sugestia ta tłumaczy fakt występowania reakcji dodatnich surowic zwierząt zarażonych motylicą z wieloma antygenami uzyskiwanymi z różnych, często bardzo odległych systematycznie gatunków pasożytów.

Występujące pokrewieństwo antygenowe między różnymi pasożytami warunkuje również uzyskiwanie reakcji dodatnich w układzie odwrotnym, tj. antygenów *F. hepatica* z surowicami zwierząt i ludzi zarażonych innymi gatunkami pasożytów.

Poza tym także inne, bliżej nieznane przyczyny mogą powodować występowanie dodatnich odczynów z surowicami zwierząt wolnych od inwazji. Wprawdzie w badaniach własnych nie obserwowano odczynów dodatnich ekstraktu somatycznego EFh z surowicami owiec wolnych od inwazji, to jednak z badań Van Tigge-

le, Overa (29) wynika, że 30% takich surowic reagowało dodatnio w odczynie IEP a 5% w OPD. Jeszcze wyższy procent (90%) reakcji dodatnich obserwowano w odczynie IEP z surowicami szczurów wolnych od fasciozozy (14).

Również przyczyną fałszywie dodatnich odczynów może być substancja C występująca w ekstraktach pasożytów oraz białko CRP obecne w surowicach zarażonych zwierząt w przebiegu wielu inwazji. Ta ostatnia przyczyna może jednak być eliminowana drogą odpowiedniego postępowania metodycznego (21).

Pozostałe, również istotne przyczyny, wpływające na wiarygodność odczynów mogą być eliminowane wyłącznie drogą stosowania swoistych antygenów funkcjonalnych lub frakcji zawierających wyłącznie te antygeny. Należy jednakże w doborze antygenów lub ich frakcji mieć na uwadze różnice czasokresu funkcjonalności poszczególnych antygenów u różnych gatunków żywicieli motylicy, bowiem jak wynika z badań własnych u owiec antygeny tworzące w odczynie podwójnej dyfuzji kompleks linii precypitacyjnych B są aktywne w ciągu całej inwazji, natomiast aktywność antygenów biorących udział w powstawaniu kompleksów A i C ogranicza się głównie do jej okresu prepatentnego.

Wnioski

1. Poziom precypityn w przebiegu fasciozozy owiec zależy od intensywności inwazji oraz od czasu jej trwania, bowiem wyższy poziom tych przeciwciał stwierdza się u zwierząt z większą intensywnością inwazji oraz w okresie prepatentnym.

2. Spośród dwóch badanych odczynów (IEP, OPD) bardziej czułym okazał się odczyn immunoelektroprecypitacji. Wydaje się jednak, że odczyny te są mniej przydatne do serodiagnostyki przewlekłej fasciozozy z uwagi na niski poziom precypityn występujący w tej fazie inwazji.

3. Wykazane w trakcie badań reakcje dodatnie surowic owiec doświadczalnie zarażonych z antygenami heterologicznymi EDd i EPs wskazują na konieczność stosowania do odczynów serologicznych antygenów swoistych, z równoczesnym uwzględnieniem czasokresu występowania przeciwciał dla tych antygenów.

Piśmiennictwo

- Benex J., Guilhon J., Barnabe R.: Bull. Soc. Path. exot. 66, 16, 1973.
- Biguet J., Capron A., Tran Van Ky P.: Anns Parasit. Hum. comp. 37, 221, 1962.
- Biguet J., Capron A., Tran Van Ky P., Rose F.: Rev. Immunol. 29, 233, 1965.
- Borojevic D., Jovanovic B., Mousesijan M.: Acta vet., Belgrad 23, 55, 1973.
- Capron A., Rose G., Luffau G., Biguet J., Rose F.: Rev. Immunol. 29, 25, 1965.
- Desowitz R. S., Una S. R.: J. Helminth. 50, 53, 1976.
- Doyle J. J.: Res. vet. Sci. 15, 119, 1973.
- Enayat M. S., Pezashki M.: J. Helminth. 51, 143, 1977.
- Gundlach J. L.: Mat. XI Zjazdu PTP Poznań 10-12 maja, '60, 1973.
- Gundlach J. L.: Mat. XI Zjazdu PTP Poznań 10-12 maja, '61, 1973.
- Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozozy owiec i bydła. Rozp. habil. AR Lublin, 1977.
- Hillyer G. V.: J. Parasit. 61, 557, 1975.
- Hillyer G. V., Capron A.: J. Parasit. 62, 1011, 1976.
- Hillyer G. V., de Weil S.: J. Parasit., 63, 430, 1977.
- Kadhim J. K., Al-Attar M.: Br. vet. J. 130, Liv-Lvi, 1974.
- Kaliraj P., Harinath B. C., Ghirnikar S. N.: Current Science 46, 603, 1977.
- Kapp Z., Nolewajka E., Pawlak K., Szaflarski J.: Medycyna Wet. 27, 144, 1971.
- Kent N. H.: Am. J. Hyg. Monographic Series Nr. 22, 30, 1963.
- Klimienko W. W.: Trudy Wsechsojuz. Ordena Trud. Krasn. Znamen. Inst. Geimint. im. K. I. Skrjabina 18, 145, 1971.
- Krupp I. M.: Am. J. trop. Med. Hyg. 23, 27, 1974.
- Longbottom J. L., Pepys J.: J. Path. Bact. 83, 141, 1964.
- Mauther P. B.: Inaug. Diss. Freie Univ. Berlin, 1966.
- Mousesijan M., Sokolic A., Sibalic S.: Acta vet., Belgrad 17, 409, 1967.
- Ouchterlony O.: Progr. Allergy 5, 1, 1958.
- Pinon J. M.: Lancet 7934, 310, 1976.
- Potuktajewa P. F.: Biul. Wsechsojuz. Ordena Trud. Krasn. Znamen. Inst. Geimint. im. K. I. Skrjabina 10, 90, 1973.
- Scapin M., Tendler M.: J. Parasit. 61, 561, 1975.
- Spuhler V., Moosbrugger G. A., Meyer K.: Schweizer Arch. Tierheilk. 100, 610, 1958.
- Van Tiggele L. J., Over H. J.: Vet. Parasitol. 1, 239, 1976.
- Thorpe E.: Parasitology 55, 209, 1965.
- Vior C., Fromunda V., Popescu S., Vior E., Alboiu M.: Arch. Vet. 7, 135, 1970.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Lech Gundlach, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Гундлах Е. Л., Садзиковский А. — Динамика преципитинов и серодиагностическая пригодность реакций иммуоэлектропреципитации (ИЭП) в двойной диффузии (РДД) в развитии фасциолеза овец.

Динамику преципитинов и пригодность реакций ИЭП и РДД для серодиагностики фасциолеза определяли, опираясь на сыворотки, происходящие от 5 овец, экспериментально зараженных метацеркариями *F. hepatica*, и 12 сыворок овец, натурально зараженных этим сосальщиком.

Применяя в качестве антигена соматический экстракт двуустки (EFh), показали, что в сыворках всех экспериментально зараженных овец противотела появились на 2-3 недели после заражения и удерживались до 19 недели инвазии, т.е. до конца опыта, ведя себя подобным образом в обеих примененных реакциях. Более подробные исследования показали, что уровень преципитинов в ходе экспериментального фасциолеза зависит от интенсивности инвазии и от ее продолжительности, так как высший уровень противотел отмечали у животных с большим количеством сосальщиков и в перипатентный период инвазии.

По отношению к сывороткам овец, зараженных естественным образом, примененные реакции показали в общем более низкую чувствительность, ибо реакцией ИЭП наличие противотел отметили в 50%, а РДД — в 33% исследуемых сыворках. В связи с этим эти реакции кажутся менее пригодными для серодиагностики затяжного фасциолеза из-за низкого уровня противотел в патентный период инвазии. Полученные положительные реакции сыворок, зараженных экспериментально, с экстрактами *Dicrocoelium dendriticum* (EDd) и *Paramphistomum* sp. (EPs) указывают на необходимость применения к серологическим реакциям специфических антигенов *F. hepatica*. Обнаружение же периодического появления противотел для различных компонентов, содержащихся в соматическом экстракте указывает на необходимость подбора для серодиагностики таких специфических антигенов, противотела которых отмечают в оба периода инвазии.

Gundlach J. L., Sadzikowski A. — **Dynamics of precipitins and usability of serodiagnostic reactions of immunoelectroprecipitation (IEP) and double diffusion (OPD) in the course of fascioliasis in sheep.**

The dynamics of precipitins and usability of IEP and OPD reactions for serodiagnosis of fascioliasis was determined on the basis of sera from 5 sheep experimentally infected with *F. hepatica* metacercariae and 12 sera from sheep naturally infected with this trematode.

By using somatic extract of fascioliasis (EFh) as antigen it was shown that in sera of all sheep experimentally infected antibodies occurred in 2–3 weeks after infection and remained for 19 weeks of invasion, i.e. till the end of the experiment, behaving similarly in both reactions used. More detailed studies showed that the level of precipitins in the course of experimental fascioliasis depends on the intensity of invasion and its period, because a higher level of antibodies was found in animals with a lar-

ger number of trematoda and in the prepatent period of invasion.

As regards sera of sheep naturally infected, the reactions used showed a generally lower sensitivity, because with IEP reaction the presence of antibodies was found in 50%, and with OPD reaction in 33% of the sera examined. In conclusion, the reactions seem to be less useful in serodiagnosis of chronic fascioliasis because of a low level of antibodies in the patent period of invasion. The positive reactions of sera from sheep experimentally infected, obtained with extracts of *Dicrocoelium dendriticum* (EDd) and *Paramphistomum* sp. (EPs) indicate the necessity of using specific *F. hepatica* antigens for serological reactions. However, the finding of periodical occurrence of antibodies for various components contained in the somatic extract points to the necessity of choosing such specific antigens for serodiagnosis, for which antibodies are found in both periods of invasion.

JERZY RZEDZICKI, ANDRZEJ WERNICKI

Sekrecyjne immunoglobuliny klasy IgA (SIgA) u przeżuwaczy

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

W ostatnich trzech dziesięcioleciach najbardziej dynamiczny rozwój w grupie nauk biologicznych wykazuje immunologia. Obecnie ogromne zainteresowanie badaczy zarówno w naukach podstawowych, jak i klinicznych wzbudają immunoglobuliny. Ostatnio coraz powszechniej przyjmuje się pogląd reprezentowany przez profesora Bernarda Zabłockiego, że „wszystkie immunoglobuliny są przeciwciałami, przy czym nie dla wszystkich znamy antygeny, które przyczyniły się do ich wytworzenia”.

W polskim piśmiennictwie weterynaryjnym informacji dotyczących immunoglobulin jest stosunkowo niewiele. Stąd też wydaje się uzasadnionym podanie informacji dotyczących występowania, struktury chemicznej a także właściwości biologicznych wydzielniczej immunoglobuliny klasy IgA.

Z trzech głównych klas immunoglobulin, które warunkują odporność miejscową licznych narządów pozostających w ścisłym kontakcie ze środowiskiem zewnątrzustrojowym, najwyższy ilościowy udział i największą rolę w procesach obronnych odgrywają immunoglobuliny klasy IgA. Częsteczka sekrecyjnej immunoglobuliny klasy IgA (SIgA) występująca w wydzielinach przeżuwaczy (8, 37, 51, 52, 63) w porównaniu z częsteczką IgA surowicy krwi posiada wyższy ciężar cząsteczkowy oraz dodatkowe determinanty antygenowe. Białka SIgA ze względu na odmienną budowę chemiczną cząsteczki charakteryzują się mniejszą podatnością na działanie czynników proteolitycznych (5, 65, 68), wyższą efektywnością w obronie organizmu (39) oraz dużą zdolnością do tworzenia form

polimerycznych (65). Według Portera i Allena (56) aktywność przeciwciał zlokalizowanych we frakcji SIgA jest 10 krotnie wyższa w porównaniu do IgA surowicy krwi.

Immunoglobuliny SIgA, produkowane lokalnie występują najczęściej w dwóch formach polimerycznych, które różnią się między sobą wielkością cząsteczki oraz stałą sedymentacji. Stała sedymentacji głównego piku tej immunoglobuliny wynosi $S_{20,w}$ —11.2 natomiast piku mniejszego $S_{20,w}$ —15.4 (6, 20, 41, 54, 57). Ciężar cząsteczkowy białka o stałej sedymentacji 11.2 S wynosi 385 000—417 000 (6, 20, 45). Zawartość węglowodanów ocenia się na 8—9% (25).

Komar i wsp. (32) badając sekrecyjne IgA występujące w wydzielinie jamy nosowej bydła podali dokładną charakterystykę dwóch form polimerycznych o stałych sedymentacji 15.3 S i 12.2 S. Łańcuchy polipeptydowe w cząsteczce białka 12.2 S są powiązane wiązaniami kowalencyjnymi, natomiast w cząsteczce 15.3 S występują wiązania niekowalencyjne. Cząsteczka ta rozkłada się na pik szybko wędrujący (4.2 S) oraz pik wolno wędrujący (3.8 S). Wyższy ciężar cząsteczkowy SIgA o stałej sedymentacji 15.3 S, wynoszący 642 000 sugeruje trymeryczną formę tego białka. Immunoglobuliny o tej samej wielkości stałej sedymentacji występują także u owiec (26).

Dimeryczna cząsteczka klasy SIgA składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych ciężkich (H) o ciężarze cząsteczkowym 61 000 oraz czterech łańcuchów lekkich, o ciężarze cząsteczkowym 23 000 (6). Analiza łańcuchów H (α) wykazała, że różnią się one zarówno pod wzglę-