

ANDRZEJ SADZIKOWSKI, JERZY LECH GUNDLACH

Swoista i nieswoista stymulacja mechanizmów obronnych szczura przeciwko inwazji *Fasciola hepatica*

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Pomimo licznych badań nad fasciozą, wiele zjawisk towarzyszących tej inwazji jest nadal niejasnych. I tak m.in. nie w pełni poznane są mechanizmy odporności na reinwazję lub superinwazję, mechanizmy odpowiedzi komórkowej, jak też nadal kontrowersyjna jest możliwość immunoprofilaktyki tej parazytozy. Wcześniejsze badania własne, jak i dane piśmiennictwa wskazują na możliwość wywołania odporności na inwazję motylicy drogą uodpornienia zwierząt antygenami uzyskanymi z innych przywr lub też uprzedniego zarażenia zwierząt niektórymi gatunkami pasożytów, przy czym mechanizm tej protekcji (często bardzo wysokiej) jest niejasny (2, 3, 9, 12, 16, 17). Podobnie nie znany jest mechanizm odporności na inwazję pasożytów (*Babesia* sp., *Trypanosoma* sp., *Echinococcus* sp., *Schistosoma* sp., *Taenia taeniaeformis* i innych) u zwierząt zarażonych BCG (*Mycobacterium bovis*) (4, 19, 20).

Stąd też celem badań własnych było sprawdzenie możliwości swoistej i nieswoistej immunoprofilaktyki fasciozy (przy użyciu ekstraktu somatycznego *F. hepatica* oraz *Myc. bovis*), a także pośrednio próba wyjaśnienia niektórych mechanizmów obronnych żywiciela przed inwazją motylicy wątrobowej.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 90 szczurach, samcach rasy Wistar, w wieku 4 tyg. W trakcie doświadczenia zwierzęta otrzymywały karmę granulowaną LSM i wodę *ad libitum*.

Materiał inwazyjny. Metacerkarie *F. hepatica* uzyskano przy użyciu laboratoryjnej hodowli ślimaków *Galba truncatula*. Do momentu zarażenia szczurów metacerkarie przetrzymywano przez okres 3–6 tygodni w temperaturze 8°C.

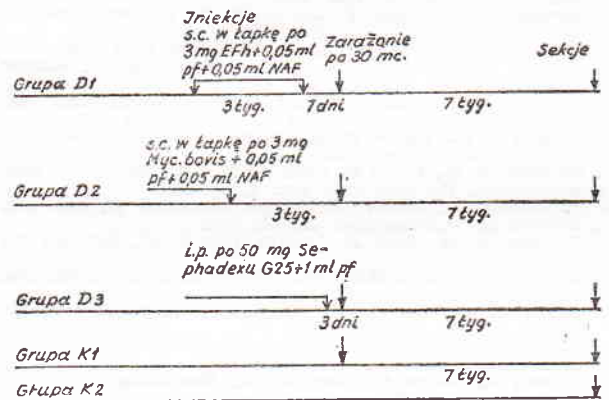
Antygeny. Ekstrakt somatyczny *F. hepatica* uzyskano z dojrzałych płciowo przywr według metody Kenta (11) w modyfikacji Gundłacha (10). W badaniach użyto także prątków gruźlicy — *Mycobacterium bovis*, zabitych w temperaturze 100°C i następnie suszonych w 37°C.

Plan doświadczenia. Zwierzęta podzielono na trzy grupy doświadczalne (D1 — D3) po 20 szczurów oraz dwie grupy kontrolne K1 i K2, liczące 20 i 10 zwierząt. Zwierzętom grup doświadczalnych podawano odpowiednio: podskórnie ekstrakt *F. hepatica*; podskórnie *Myc. bovis* lub dootrzewnowo Sepsadex G 25. Szczury tych grup oraz grupy kontrolnej K1 zarażano następnie podając *per os* po 30 metacerkarii *F. hepatica*. Po 7 tyg. od zarażenia wszystkie szczury (w tym także 10 nie zarażonych z grupy K2) uśmiercano i poddawano sekcji. W czasie sekcji określano u poszczególnych szczurów: procent powierzchni wątroby ze zmianami anatomopatologicznymi; stosunek masy ciała do masy wątroby i masy śledziony oraz intensywność inwazji *F. hepatica*.

Szczegółowy plan doświadczenia obejmujący dawki

i drogi podania preparatów oraz terminy iniekcji, zarażeń i sekcji przedstawiono na ryc. 1.

Ryc. 1. Plan doświadczenia



Objaśnienia: s.c. — podskórnie; EFh — ekstrakt somatyczny *F. hepatica*; pf — płyn fizjologiczny; NAF — niekompletny adiuwant Freund; i.p. — dootrzewnowo; m.c. — metacerkarie *F. hepatica*.

Wyniki i omówienie

W badaniach do indukcji mechanizmów obronnych użyto obok ekstraktu somatycznego *F. hepatica* również *Myc. bovis* — nieswoistego immunostymulatora (15) oraz Sepsadexu G 25, który podany dootrzewnowo powoduje powstanie wysięku z dużą liczbą komórek (głównie makrofagów) (18). Taki układ doświadczenia pozwalał na pośrednią ocenę roli komórek żywiciela w eliminacji wędrujących motylic, jak też swoistości tego procesu.

Wyniki uzyskane w trakcie doświadczenia przedstawiono w tabelach 1–6. Testem t-Studenta wykazano, że średnie intensywności inwazji *F. hepatica* w grupach D 1 i D 2; D 2 i D 3; D 2 i K 1 były istotnie różne przy $p < 0,001$; D 1 i D 3 oraz D 1 i K 1 były istotnie różne przy $p < 0,01$, natomiast brak było różnic pomiędzy średnimi w grupach D 3 i K 1.

Najniższą ekstensywność i intensywność inwazji, jak też najslabiej zaznaczone zmiany anatomopatologiczne stwierdzono w grupie D 2, w której szczury przed zarażeniem immunizowano *Myc. bovis*. Znacznie więcej pasożytów oraz nieco bardziej rozległe zmiany w wątrobach obserwowano u zwierząt uodpornionych ekstraktem *F. hepatica*. Natomiast liczba motylic u szczurów grupy D 3, którym przed zarażeniem wprowadzono Sepsadex, jak też rozległość zmian w wątrobach, były zbliżone do uzyskanych dla grupy kontrolnej K 1. Parametry na-

Tab. 1. Wyniki badań sekcyjnych szczurów grupy D 1; uodpornionych ekstraktem somatycznym *F. hepatica* i zarażonych motylicą wątrobową

Nr szczura	Intensywność inwazji	% powierzchni wątroby ze zmianami	Parametry narządowe - ilorazy	
			masa ciała masa wątroby	masa ciała masa śledziony
1	10	75-100	15,5	238,5
2	9	75-100	13,7	136,8
3	9	0-25	12,7	175,0
4	8	75-100	14,2	142,1
5	7	25-50	12,7	186,7
6	7	25-50	13,5	192,9
7	5	25-50	16,8	203,6
8	5	25-50	18,2	258,3
9	5	25-50	17,9	250,0
10	5	0-25	20,6	291,7
11	4	25-50	13,2	290,0
12	4	0-25	18,1	322,2
13	4	0-25	18,0	337,5
14	4	0-25	18,7	350,0
15	4	0-25	20,0	214,3
16	3	25-50	16,1	338,9
17	3	0-25	18,2	344,4
18	2	0-25	19,4	310,0
19	2	0-25	16,8	290,9
20	0	0-25	18,7	214,3
\bar{x}	5,0		16,65	254,4

Tab. 2. Wyniki badań sekcyjnych szczurów grupy D 2; uodpornionych *Myc. bovis* i zarażonych motylicą wątrobową

Nr szczura	Intensywność inwazji	% powierzchni wątroby ze zmianami	Parametry narządowe - ilorazy	
			masa ciała masa wątroby	masa ciała masa śledziony
1	12	25 - 50	11,2	55,9
2	9	50 - 75	13,1	123,5
3	7	50 - 75	10,0	120,0
4	4	50 - 75	11,8	90,4
5	3	0 - 25	15,4	143,3
6	2	25 - 50	14,5	233,3
7	1	0 - 25	18,1	181,8
8	1	0 - 25	17,9	238,9
9	0	0 - 25	14,7	240,9
10	0	0 - 25	15,9	125,0
11	0	0	22,9	400,0
12	0	0	23,2	425,0
13	0	0	20,8	340,0
14	0	0	17,5	194,4
15	0	0	19,6	392,9
16	0	0	15,5	342,9
17	0	0	14,4	94,7
18	0	0	17,7	230,0
19	0	0	20,0	400,0
20		padł w trakcie doświadczenia		
\bar{x}	2,05		16,54	238,0

rządowe (stosunek masy ciała do masy wątroby i masy śledziony), uzyskane dla szczurów grup doświadczalnych były zbliżone do otrzymanych dla zwierząt zarażonych motylicą z grupy K 1, a jednocześnie znacznie niższe niż u zwierząt nie uodpornionych, wolnych od inwazji (grupa K 2). Świadczy to o zwiększeniu masy wątroby w wyniku procesów zapalnych i ich włóknienia i bliznowacenia u szczurów zarażonych oraz powiększeniu śledzion, towarzyszącemu procesom odpornościowym.

Wyniki badań dotyczące użycia do immunizacji szczurów ekstraktu somatycznego *F. hepatica* wykazały ograniczoną możliwość swoistej immunoprofilaktyki i całkowicie potwierdziły wcześniejsze obserwacje własne w tym względzie (16).

Szczególnie interesujące wydają się wyniki uzyskane w grupach szczurów, którym przed

Tab. 3. Wyniki badań sekcyjnych szczurów grupy D 3; którym dootrzewnowo wprowadzono Sepsadex G 25 i zarażono motylicą wątrobową

Nr szczura	Intensywność inwazji	% powierzchni wątroby ze zmianami	Parametry narządowe - ilorazy	
			masa ciała masa wątroby	masa ciała masa śledziony
1	12	0,25	20,0	355,5
2	11	75-100	14,0	186,6
3	11	75-100	12,5	157,9
4	11	50-75	17,2	288,5
5	10	0-25	20,0	355,6
6	9	75-10	13,2	166,7
7	9	0-25	20,4	316,7
8	8	75-100	17,2	357,1
9	8	25-50	17,9	260,0
10	8	25-50	15,0	240,0
11	8	0-25	18,1	235,0
12	7	50-75	14,1	206,7
13	7	50-75	15,0	225,0
14	6	75-100	14,7	200,0
15	5	50-75	13,0	136,4
16	5	25-50	20,8	357,1
17	5	25-50	17,2	163,2
18	4	25-50	19,1	366,7
19	3	25-50	17,5	233,3
20	3	25-50	12,3	206,0
\bar{x}	7,5		16,46	247,9

Tab. 4. Wyniki badań sekcyjnych szczurów grupy K 1; zarażonych motylicą wątrobową

Nr szczura	Intensywność inwazji	% powierzchni wątroby ze zmianami	Parametry narządowe - ilorazy	
			masa ciała masa wątroby	masa ciała masa śledziony
1	13	0-25	15,2	320,0
2	12	75-100	14,1	172,2
3	10	75-100	12,0	166,7
4	10	50-75	15,2	205,9
5	10	50-75	15,3	181,3
6	8	25-50	21,3	320,0
7	8	25-50	17,8	246,2
8	8	0-25	21,3	290,9
9	8	0-25	16,8	266,7
10	8	0-25	18,8	256,7
11	7	60-75	13,6	261,5
12	7	0-25	21,4	250,0
13	7	0-25	21,3	340,0
14	7	0-25	20,0	375,0
15	6	75-100	17,8	192,3
16	6	50-75	19,3	245,5
17	5	50-75	16,7	250,0
18	5	25-50	15,9	180,0
19	5	25-50	17,9	312,5
20	4	75-100	17,4	173,7
\bar{x}	7,7		17,5	250,9

Tab. 5. Wyniki badań sekcyjnych szczurów grupy K 2; wolnych od inwazji

Nr szczura	Intensywność inwazji	% powierzchni wątroby ze zmianami	Parametry narządowe - ilorazy	
			masa ciała masa wątroby	masa ciała masa śledziony
1	0	0	23,3	466,7
2	0	0	20,6	462,5
3	0	0	27,8	390,0
4	0	0	26,4	528,5
5	0	0	25,4	412,5
6	0	0	23,1	600,0
7	0	0	22,0	550,0
8	0	0	24,3	340,0
9	0	0	24,2	483,3
10	0	0	25,0	375,0
\bar{x}	0		24,2	450,9

zarażeniem podawano *Myc. bovis* i Sepsadex. Zdaniem wielu autorów w eliminacji wędrujących motylic biorą udział przeciwciała, jak też komórki, przy czym nie jest wykluczone, że działanie komórek musi być poprzedzone opłaszczeniem motylic przez przeciwciała. Brak

Tab. 6. Nasilenie zmian anatomopatologicznych w wątrobach szczurów grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej

Grupa	Liczba wątrob bez zmian	Liczba wątrob ze zmianami anatomopatologicznymi obejmującymi % powierzchni			
		0-25	25-50	50-75	75-100
D1 - sodporna ekstraktem <i>F. hepatica</i> , zarażone	0	10	7	3	0
D2 - uodpornione <i>Myc. bovis</i> , zarażone	9	5	2	3	0
D3 - dootrzewnowa iniekcja <i>Sephadexu</i> , zarażone	0	4	7	4	5
K1 - kontrolne, zarażone	0	7	4	5	4

jest także pewnych danych co do rodzaju komórek biorących udział w „zabijaniu” wędrujących *F. hepatica* — przyjmuje się, że główną rolę odgrywają tu eozynofile (1, 5, 6, 8, 9, 13, 16). Podanie szczurom dootrzewnowo *Sephadexu*, a tym samym drastyczne zwiększenie w obrębie jamy otrzewnowej liczby komórek (głównie makrofagów) pozostało bez widocznego wpływu na rozwój motylic. Fakt ten sugeruje udział w eliminacji przywr, poza komórkami, także innych czynników lub też, że muszą w niej brać udział komórki swoście uczulone. Powyższe obserwacje wydają się potwierdzać badania Doya i Hughesa (6), którzy używali *in vitro* opłaszczanie ekscystowanych motylic komórkami wysięku otrzewnowego jedynie w obecności surowicy odpornościowej.

Należy sądzić, że odporność komórkowa, a może także i przeciwciała dla antygenów wspólnych *Myc. bovis* i *F. hepatica* odegrały główną rolę w obserwowanej u dużej liczby szczurów uodpornionych prątkami znacznej odporności na zarażenie motylicą. Niska ekstensywność (42%) i intensywność (2,05 pasożyta) inwazji, przy stosunkowo niewielkich zmianach anatomopatologicznych w wątrobach (u 9 szczurów wątroby bez zmian; brak wątrob zmienionych w 75—100%) wskazują, że eliminacja motylic miała miejsce przed ich dotarciem do wątroby, to jest w obrębie ściany jelita i w jamie otrzewnowej. Jednak w chwili obecnej trudne jest jednoznaczne określenie wszystkich czynników biorących udział w likwidacji inwazji, jak też niemożliwa jest odpowiedź na pytanie dlaczego u części szczurów doszło do normalnego rozwoju pasożytów.

Wyniki badań własnych nie potwierdziły obserwacji Thompsona i Howella (19), którym nie udało się uzyskać u szczurów zarażonych BCG statystycznie istotnej odporności na zarażenie *F. hepatica*. Autorzy ci stosowali jednak żywe prątki podając je dootrzewnowo. Wyniki badań innych autorów (14, 20, 21) wskazują na możliwość wywołania wysokiej protekcji przed zarażeniem między innymi *Mesocostoides corti*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia taeniaeformis* drogą podania BCG lub ścian komórkowych tych bakterii. Przyjmuje się, że wynikiem działania *Mycobacterium* na układ immunologiczny żywiciela jest między innymi wzrost odporności komórkowej, pojawienie się przeciwciał, wzrost nieswoistej aktywności enzymatycznej makrofagów, nasilenie fagocytozy, wzrost poziomu lizozymu oraz wzrost liczby monocytów i makro-

fagów (14, 15, 20, 21). Wszystkie te czynniki mogą ograniczać także rozwój pasożytów.

Należy sądzić, że w przyszłości po głębszym poznaniu mechanizmów obronnych przed inwazją motylicy indukowanych swoście lub nieswoście możliwe będzie, po połączeniu tych metod immunizacji, podjęcie kolejnych, już skutecznych prób immunoprofilaktyki fasciolozu.

Piśmiennictwo

- Burden D. J., Bland A. P., Hammet N. C., Hughes D. L.: *Expt Parasit.* 56, 277, 1983.
- Campbell N. J., Kelly J. D., Townsend R. B., Dineen J. K.: *Int. J. Parasit.* 7, 347, 1977.
- Christensen N. Ø., Monrad J., Nansen P., Frandsen F.: *Expt Parasit.* 49, 116, 1980.
- Coß F. E. G.: *Nature* 273, 623, 1978.
- Doy T. G., Hughes D. L.: *Int. J. Parasit.* 12, 357, 1982.
- Doy T. G., Hughes D. L.: *Res. vet. Sci.* 32, 118, 1982.
- Doy T. G., Hughes D. L., Harness E.: *Res. vet. Sci.* 25, 41, 1978.
- Doy T. G., Hughes D. L., Harness E.: *Res. vet. Sci.* 29, 98, 1980.
- Doy T. G., Hughes D. L., Harness E.: *Parasite Immunology* 3, 171, 1981.
- Gundlach J. L.: *Badania immunologiczne w przebiegu fasciolozu owiec i bydła. Praca hab.*, AR Lublin, 1977.
- Kent N. H.: *Expt Parasit.* 10, 313, 1960.
- Monrad J., Christensen N. Ø., Nansen P., Frandsen F.: *J. Helminth.* 55, 261, 1981.
- Rajasekariach G. R., Howell M. J.: *J. Parasit.* 65, 481, 1979.
- Reuben J. M., Tanner C. E., Portelance V.: *Infection and Immunity* 23, 582, 1979.
- Rzucidło L.: *Immunologia ogólna i doświadczalna*. PWN Warszawa 1981.
- Sadzikowski A.: *Badania immunologiczne w przebiegu eksperymentalnej inwazji Fasciola hepatica u szczurów oraz próby immunoprofilaktyki*. Praca dokt., AR Lublin, 1983.
- Sirag S. B., Christensen N. Ø., Nansen P., Monrad J., Frandsen F.: *J. Helminth.* 55, 63, 1981.
- Stankiewicz M., Jeska E. L., Hajstad M. S.: *Acta parasit. pol.* 28, 349, 1983.
- Thompson R. C. A., Howell M. J.: *Z. ParasitKde* 61, 93, 1979.
- Thompson R. C. A., Penhale W. J., White T. R., Pass D. A.: *Parasite Immunology* 4, 93, 1982.
- Tribouley J., Tribouley-Duret J., Apprion M.: *Annls Parasit.* 55, 87, 1980.

Adres autora: dr Andrzej Sadzikowski, ul. F. Lessla 2/22, 24-100 Puławy

Садзиковский А., Гундлах Е. Л. — Специфическая и неспецифическая стимуляция защитных механизмов крысы против инвазии *Fasciola hepatica*

Крыс иммунизировали, вводя подкожно в лапку соматический экстракт *F. hepatica* (группа D 1); подкожно в лапку умерщвленные микробактерии *Myc. bovis* (группа D 2), либо вводили внутривентриально *Sephadex G 25*, а затем инфицировали, вводя по 30 метацеркарий печеночной двуустки. Контролем являлись неиммунизированные животные, зараженные (группа K 1) и свободные от инвазии (группа K 2). 7 недель после инфекции все крысы убивали и во время секции определяли: % площади печени с анатомопатологическими изменениями; отношение массы тела к массе печени и массе селезенки, а также интенсивности инвазии *F. hepatica*.

Результаты, полученные для группы D I, низшие полученные для контрольной группы K I, подтвердили ограниченную возможность специфической иммунопрофилактики фасциолеза. Зато наи-

меньшую экстенсивность и интенсивность инвазии, а также наиболее слабые анатомопатологические изменения в печенях отметили в группе D 2, где крыс иммунизировали *Myc. bovis*. Внутривентриальный ввод Sephadex не повлиял на интенсивность патологических изменений в печенях. Полученные результаты вводят участие в ограничении инвазии двуустки, вне клеток, также других факторов.

Sadzikowski A., Gundlach J. L. — Specific and unspecific stimulation of protective mechanisms against invasion of *Fasciola hepatica* in the rat

Rats were immunized subcutaneously with the somatic extracts of *Fasciola hepatica* (group D₁), the suspension of killed *Mycobacterium bovis* strain (group

D₂) or intraperitoneally with Sephadex G 25, and then they were infested with thirty metacercariae of *F. hepatica*. Non-immunized animals served as a control: group K₁ was infested and the second (K₂) was free from invasion. Seven weeks after infestation all the rats were bled and at necropsy there were determined: (i) the per cent of liver surfaces with gross lesions, (ii) the relation of bodyweight to the liver weight and spleen weight, and (iii) intensity of invasion by *F. hepatica*. The findings (see group D₁ and K₁) confirmed a limited possibility of specific immunoprophylaxis against fasciolosis. However, the extensiveness and intensity of invasion and gross lesions were reduced mainly in the livers of group D₂, i.e. in rats immunized with *M. bovis*. Sephadex given i.p. did not effect the intensity of *F. hepatica* invasion and gross lesions in the liver. The findings suggest the involvement apart from cells also other factors in the limitation of *F. hepatica* invasion.

HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

ZBIGNIEW SAMBORSKI
Wrocław

Schorzenia gruczołu mlekowego u krów jako główna przyczyna obniżenia jakości mleka i strat gospodarczych*)

Schorzenia gruczołu mlekowego powodują znaczne obniżenie wydajności krów i jakości mleka przeznaczonego do bezpośredniego spożycia lub wyrobu przetworów mleczarskich, a nawet dyskwalifikację omawianego produktu i jego pochodnych, zanieczyszczonych zarówno swoistą, jak i warunkowo chorobotwórczą florą bakteryjną. Oprócz zaniku lub obniżenia mleczności na straty związane ze schorzeniami wymienia składają się następujące czynniki: przedwczesne wybrakowanie krów wskutek nieuleczalnych zmian patomorfologicznych w tkankach gruczołu, koszty rozpoznania i leczenia oraz choroby i padnięcia cieląt karmionych mlekiem pochodzącym z zakażonego wymienia. Nie można pominąć faktu, że mleko i jego przetwory zawierające drobnoustroje, głównie gronkowce i paciorkowce, a także zanieczyszczone antybiotykami po leczeniu różnych postaci *mastitis* względnie środkami chemicznymi, sztucznie podtrzymującymi tzw. świeżość mleka, stanowią niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi. Te ostatnie straty są niewymierne.

Opierając się na własnych obserwacjach Hryniewicz i Straś (8) przeprowadzili ocenę strat w produkcji mleka biorąc pod uwagę różne nieprawidłowości gruczołu mlekowego. W stacjach podrażnienia tego narządu, określanych jako zaburzenie w wydzielniczości, mleczność chorego płata zmniejsza się mniej więcej o

10%, w utajonym zakażeniu i stanie podklicznym spadek wydajności waha się w granicach 15—20%, natomiast przy klinicznej postaci *mastitis*, z wyjątkiem ostrych przypadków, ubytek mleka z danego płata sięga 50% i więcej.

Oceniając porównawczo stan zdrowotny gruczołu mlekowego u krów zgrupowanych w uspołecznionych i indywidualnych gospodarstwach rolnych Dzieciuchowicz (3) stwierdził, że nasilenie *mastitis* o charakterze podklicznym i klinicznym kształtowało się bardziej niekorzystnie u zwierząt w sektorze uspołecznionym, wykazując tylko nieznaczną poprawę w latach 1976—1980, pomimo szeroko prowadzonych badań rozpoznawczych, inwentaryzacyjnych i akcji profilaktycznych z udziałem terenowej służby weterynaryjnej. W gospodarstwach chłopskich zaburzenia w wydzielniczości obejmowały odsetek krów dwu- i trzykrotnie mniejszy w poszczególnych latach przy stosunkowo wysokim stopniu zakażenia wymienia chorobotwórczą mikroflorą, co świadczy o niedostatecznych warunkach sanitarno-higienicznych pozyskiwania mleka. Według danych uzyskanych przez Kurka i wsp. (18) oraz Wiśniowskiego (40), w gospodarstwach średnio- i wielkotowarowych niekiedy 40—50% płatów krów dotkniętych jest zakażeniem lub stanem zapalnym.

Udział paciorkowców bezmleczności oraz serologicznej grupy C lub E w zakażeniach wymion jest nadal wysoki i wynosi co najmniej 70% w stosunku do infekcji spowodowanych

*) Referat wygłoszony na sesji naukowej PTNW, Sekcji Higieny i Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Lublin 28.IX.1984 r.