

Institutul „Dr. I. Cantacuzino“ (cond.: acad. C. Ionescu-Mihăiești)
Secția de helmintologie și Laborator de chimie parazitologică

CONTRIBUȚII LA STUDIUL IMUNITĂȚII ÎN TRICHINOZA EXPERIMENTALĂ

Gh. Lupașcu, Alice Hacıg, Paula Solomon, C. Ciurea, Larissa Iancu

În 1889, Roux și Jersin (1) deschid un drum nou în cercetările imunologice, încercînd pentru prima dată să realizeze adsorbția toxinei difterice pe suport mineral folosind fosful de calciu. Găsirea unei substanțe insolubile capabile să fixeze mai puternic substanța toxică, care să poată fi inoculată animalelor fără a produce accidente grave, ar permite substanței toxice, care aderă de substratul mineral, să difuzeze lent în organism, producînd astfel o imunitate mai durabilă. Durata imunității este legată de durata excitației antigenice; prin folosirea adsorbentului mineral se creează în regiunea inoculată, un depozit de antigen, care se resorbte lent și continuu, stabilindu-se astfel o imunitate prelungită printr-un număr redus de injecții.

Intr-o lucrare publicată anterior (2) s-a arătat că pentru a obține seruri imune cu titruri suficiente de ridicate (1:3.200) au fost necesare 5—9 inoculări intraperitoneale sau intravenoase totalizînd 15—25 ml antigen 1:100 sau 0,15—0,25 gr pulbere de vierme. Rezultatele favorabile obținute cu antigene și vaccini adsorbite pe suport mineral în bacteriologie (3) ne-a determinat să preparăm un antigen liofilizat de *Trichinella spiralis*, adsorbit pe fosfat de aluminiu, pe care l-am inoculat la cobai urmărind acțiunea lui „in vitro“, prin testarea serurilor în reacții de precipitare inelară, și reacții de precipitare pe larve vii, iar „in vivo“ prin reacții alergice cutanate. De asemenea s-au urmărit variațiile formulei leucocitare, a glicemiei și a proteinemiei.

Aceste cercetări au fost efectuate comparativ cu alt lot de cobai, care a fost imunizat pe cale intragastrică, folosindu-se pentru infestare larve vii de *Trichinella spiralis*.

S-a efectuat de asemenea analiza chimică a antigenului total de *Trichinella spiralis* utilizat în imunizări.

Dintr-o tulpină de *Trichinella spiralis* menținută în laborator (șobolani și cobai) se prepara un antigen total liofilizat. Larvele recuperate prin digestie peptică, din musculatura animalelor infestate experimental după metoda Mc. Coy (4), sînt spalate de 4—5 ori în sol. NaCl izotonică și de 2—3 ori în apă distilată, apoi sînt liofilizate în maximum 2 cc apă distilată. Pulberea obținută este cîntărită, triturată și diluată 1% în apă distilată. După 7—8 zile de maturare la + 4°C, extractul lichid este centrifugat 20' la 2.500 T/m, iar supernatantul repartizat cite 1 cmc în fiole, este din nou liofilizat. Antigenul obținut sub formă de pulbere este adus la diluția inițială de 1% în sol. NaCl izotonică sterilă, este filtrat la Seitz, testat bacteriologic și biologic și păstrat la + 4°C.

Asupra acestui antigen total s-au efectuat următoarele determinări: extract sec, azot total, corpi reductori înainte și după hidroliză, acizi grași, utilizînd metodele clasice de determinare.

Rezultatele obținute sînt consemnate în tabelul Nr. 1, cantitățile fiind reprezentate în procente în raport cu extractul sec.

Componența

Extract sec	3,45 mg la 1 cc antigen
Azot total	7,79%
Corp. reductori înainte de hidroliză	37,1%
Corp. reductori după hidroliză	63,63%
Acizi grași totali	6,6%

Fosfatul de aluminiu se prezintă sub forma unei suspensii care conține 16 mgr fosfat la 1 ml soluție, conservată în condiții de perfectă sterilitate și mertiolată 1:10.000.

Antigenul preparat după tehnica descrisă, se amestecă în proporție egală cu adsorbantul și se lasă timp de 3—4 zile la frigider + 4°.

Larvele de *Trichinella spiralis* necesare infestării cobaiilor pe cale intragastrică, se obțin de la animalele infestate experimental în laborator și recuperate prin digestieptică (Mc. Coy).

Pentru obținerea serurilor imune de *Trichinella spiralis* s-au folosit 2 loturi de câte 10 cobai, variind în greutate între 280—330 gr.

Din primul lot de 10 cobai, 2 au servit ca martori, iar restul de 8 au fost inoculați cu 3 doze, la interval de 12 zile, respectiv 1 ml, 1,5 ml și 1,5 ml antigen total liofilizat adsorbit pe fosfat de aluminiu; inocularea s-a făcut intramuscular în membrele posteroare. Antigenul astfel inoculat a fost bine suportat de cobai, neapărând nici un fel de leziune la locul de inoculare.

Concomitent cu primul lot din al doilea grup de 10 cobai 2 rămân martori, iar 8 sînt infestați pe cale orală (animalele ținute „a jeune”) cu circa 1.000 larve de *Trichinella spiralis* viabile, obținute după tehnica menționată anterior.

Înainte de infestare și inoculare, precum și după fiecare inoculare, respectiv la 12, 24 și 36 zile de la infestare și inoculare, s-a recoltat sînge periferic de la cobaii ambelor loturi, inclusiv martorii pentru formula leucocitară, glicemie și electroforeză. După 40 de zile de la introducerea loturilor în experiență, toți cobaii au fost testați pentru reacții alergice cutanate: parte din ei au fost sîngerăți din cord, iar serurile lor titrate pentru precipitare în reacții de precipitare inelară și precipitare pe larve vii.

Formula leucocitară a prezentat în timpul perioadei de imunizare prin larve și antigen, variații destul de mari. Ținîndu-se seama de datele lui *Kleineberger Karl* (5) și *Dumas* (6) — care au stabilit variații mari la animalele normale — constatăm că la majoritatea animalelor noastre de experiență, variațiile formulei se integrează în limitele procentuale constatate de autorii menționați. Astfel la ambele loturi de cobai imunizate, eozinofilia n-a depășit niciodată procentul de 7%, iar limfocitoza a variat între limitele considerate normale de 33%—78%; numai în 4 cazuri a prezentat o tendință ușoară de scădere pînă la 28%. Eozinofilia normală (0%—7%) confirmă rezultatele lui *Deschiens* și *Poirier* (7) care într-un studiu anatomopatologic asupra intoxicațiilor sub-acute și cronice la pisică, șobolani și cobai cu extracte de viermi, au constatat la toate aceste animale studiate o eozinofilie în limite normale.

Variațiile proteinemiei și ale glicemiei

Înainte de începerea experienței propriu zise s-a efectuat la toți cobaii atît dozarea glucozei, cît și determinarea proteinelor serice prin microelectroforeză pe hirtie pentru a stabili valorile medii normale ale fiecărei componente.

Determinările ulterioare din cursul experienței s-au efectuat la intervalele menționate.

Rezultatele obținute sînt consemnate în tabelul nr. 2.

Examinarea datelor din tabel arată că la cobaii martori, atît valorile glicemiei, cît și valorile procentuale ale diferitelor fracțiuni proteinice, se mențin sensibil la același nivel în tot cursul experienței.

Tabelul Nr. II.

	Proteinemia												Glicemia		
	Albumine			α globuline			β globuline			γ globuline			glucoze în g ‰		
Valorii medii normale	57,2 ^{3/8}			13,9%			8,9%			19,7%			1,05 — 1,28 ‰		
Data	Martor	Inoc. antig.	Infest. larve	Martor	Inoc. antig.	Infest. larve	Martor	Inoc. antig.	Infest. larve	Martor	Inoc. antig.	Infest. larve	Martor	Inoc. antig.	Infest. larve
17 II.	57,7	55,5	55	13,5	14,2	14,4	8,9	9,5	9,7	19,2	20,7	20,8	1,20	1,19	1,13
29 II.	57,3	50,2	50	13,9	16,8	17	9	10,5	10,7	19,7	22,4	22,2	1,19	1,14	1,07
11 III.	56,5	39,4	39	13,8	22,5	23	9,1	14	14,1	20,1	24,1	23,9	1,17	0,79	0,74

La cobaii inoculați și la cei infestați, atât valorile procentuale ale proteinelor serice, cât și glicemia arată modificări profunde, care nu diferă ca ordine de mărime între lotul inoculat cu antigen și cel infestat cu larve.

Se observă o scădere progresivă a proporției albuminelor, însoțită de o creștere a tuturor fracțiunilor globulinice, în special a alfa globulinelor.

În ceea ce privește glicemia, la ambele loturi, în faza finală se remarcă o scădere medie de 25—30% față de valoarea minimă normală.

Reacții alergice cutanate

Cu antigen total de *Trichinella spiralis* liofilizat dar neadsorbit, preparat după metoda descrisă, în diluții de 1:10.000 s-a urmărit alergia cutanată pe fiecare lot de cobai în experiență, inclusiv martorii, inoculând strict intradermic 0,1 ml antigen în flancurile epilate, proba martoră efectuându-se cu aceeași cantitate de sol. NaCl izotonică sterilă. Citirea rezultatelor s-a făcut după 1—2 ore și 24 ore, notându-se reactivitatea locală manifestată eventual prin veziculă și eritem.

Din totalul de 11 cobai testați, 9 au prezentat reacții alergice pozitive, mai intense fiind cele de tip precoce: reacțiile tardive s-au semnalat numai în 5 cazuri, cu reacție simțitor mai slabă, uneori puțin vizibilă; dintre acestea 4 au fost pozitive și în reacția precoce. Analizând aspectele pe loturi, se constată că lotul infestat cu larve, a reacționat ceva mai puternic în intradermo-reacția de tip precoce, în comparație cu lotul inoculat cu antigen; cele de tip tardiv sînt mai slab aparente. Martorii au fost negativi.

Tabelul Nr. III.

Reacții alergice cutanate la cobai

	Infestați cu larve						Martori		Inoculați cu antigen					Martori	
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7
2 ore	++	+	+++	++	-	+	-	-	+	-	++	+	-	-	-
24 ore	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-

Intensitatea reacțiilor alergice cutanate a fost apreciată astfel :

0—5—1.0 cm Ø = reacție slab pozitivă +
1 —2 cm Ø = „ pozitivă ++
peste 2 cm Ø = „ intens pozitivă +++

Reacții de precipitare inelară

Cîte 0,2 ml ser imun de cobai nediluat și neinactivat, se pun în contact cu cantități egale de antigen 1% diluat în progresie geometrică cu rația 2. Se formează o linie de demarcație la nivelul celor 2 lichide. Reacția este considerată pozitivă, dacă la acest nivel apare un inel albicios după 10' și 2 ore la temperatura camerei, și un precipitat sedimentat pe fundul eprubetelor după 20 ore la +4°C. Martorul folosit este un tub conținând 0,2 ml ser imun pus în contact cu 0,2 ml sol. NaCl izotonică.

După 38 zile de la infestare și prima inoculare de antigen (9 zile de la ultima inoculare) animalele sînt sîngerate iar serul obținut este păstrat în condiții aseptice fără conservant la +4°C.

Serurile au fost testate pentru puterea lor precipitantă, față de un antigen total liofilizat de *Trichinella spiralis*. S-a constatat că serurile imune, provenind de la cobai infestați (larve), sînt pozitive pînă la titrul maxim de 1:1.600, pe cînd serurile imune obținute de la cobaii inoculați cu antigen adsorbit, dau reacții de precipitare inelară pozitive pînă la titrul de 1:12.800.

I. G. Kogan (8) observă că numărul fracțiilor antigenice puse în evidență prin reacția Oakley L. — dublă difuziune — crește odată cu numărul de imunizări. Probabil că mărind numărul inoculărilor cu antigen se obțin titruri mai înalte.

Din cele constatate reiese că serurile lotului inoculat (antigen adsorbit) sînt mai active decît serurile lotului infestat per os cu larve. Considerînd comparativ, rezultatele reacțiilor alergice cutanate ale ambelor loturi în experiență, constatăm în cazul acestor reacții, că curbele de reactivitate alergică sînt aproape superpozabile în cazul reacțiilor de precipitare inelară, aceste curbe prezintă diferențe marcate. Nu am cercetat cum s-ar comporta același antigen total liofilizat administrat fără suport mineral.

Reacția de precipitare pe larve vii.

În 1940 s-a propus completarea reacției de precipitare inelară prin reacția de precipitare în jurul larvelor vii (Oliver, Gonzalis 1940, Mauss 1940, Roth 1941) (9) Leikina E. S. (10), care este foarte sensibilă și strict specifică. Intensitatea reacțiilor pozitive este maximă între a 40—50 zi de la infestare, perioadă care corespunde densității maxime a anticorpilor antilarvari.

Reacția de precipitare pe larve vii, constă în introducerea larvelor — în cazul nostru *Trichinella spiralis* — în ser imun omolog. După 6 ore de incubație la 37°C, se formează în jurul orificiilor atriale, precipitate specifice. Menținerea unei sterilități cît mai riguroasă în cursul manipulărilor este necesară deoarece dezvoltarea bacteriilor împiedică evoluția normală a reacției.

După 40 de zile de la infestare cu larve și de la prima inoculare intramusculară cu antigen, respectiv după 9 zile de la ultima inoculare, cobaii au fost sîngerati din cord, iar serul imun obținut a fost folosit în reacții de precipitare. Reacțiile de precipitare efectuate cu 11 seruri imune prelevate de la ambele loturi de cobai în experiență, toate au dat reacții pozitive după 8 ore de incubație la 37°C, în schimb cu serurile

martore s-au obținut reacții negative. Menționăm că în cazul serurilor imune de la cobai infestați cu larve, precipitatul obținut a fost mai abundent.

În concluzie, considerând comparativ rezultatele cercetărilor efectuate pe cele 2 loturi de cobai imunizate cu larve și antigen constatăm că:

1. Variațiile formulei leucocitare rămân în limite procentuale aproape normale, eozinofilia nedepășind procentul de 7%;

2. Atît valorile procentuale ale proteinelor aeriice cît și glicemia suferă modificări comparabile; se observă o scădere progresivă a proporției albuminelor, însoțită de o creștere a tuturor fracțiilor globulinice, în special a alfa-globulinelor; glicemia scade în faza finală cu 25—30%;

3. Reacțiile alergice cutanate sînt în general de tip precoce, prezentînd o reactivitate ceva mai accentuată la lotul infestat cu larve;

4. Serurile provenind de la lotul inoculat cu antigen sînt mai active în reacțiile de precipitare înelră, reacționînd la titru mai înalt, cele provenind de la loturile infestate cu larve, dau precipitate mai abundente în reacțiile de precipitare pe larve vii;

5. Dinamica anticorpilor urmărită la ambele loturi înscrie valori comparabile.

Sosit la redacție: 3 august 1960.

Bibliografie

1. ROUX, JERSIN: Ann. Inst. Pasteur, 1889, III, 293; 2. HACIG A., SOLOMON P.: Arch. Roum. Pathol. Exper. 1959, 18, 1, 107—122; 3. CLUEVA N. G., GHINTBURG E. M.: J. M. E. Y., 1946, 12, 39; 4. MC COY: Am. J. Hyg. 1931, 14, 484—494; 5. KLEINEBERGER—CARL: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere, Leipzig 1907; 6. DUMAS J.: Les animaux de laboratoire, Flammarion, Paris 1953; 7. DESCHIEENS R., POIRIER M.: Bull. Soc. Pathol. Exot. 1949, 42, 70; 8. KOGAN I.: J. Inf. Dis. 1957, 101; 9. OLIVER—GONZALES: J. Inf. Dis. 1940, 67, 292—300; 10. LEIKINA E. S.: Medicinszki j parasit, 1947, 76, 4, 25.

К ВОПРОСУ ОБ ИММУНОБИОЛОГИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРИХИНОЗА

Лупашку Г., Хатиг А., Соломон П., Чуреа К., Янку Л.

Авторы описывают изменения белой крови, уровня антител, сахара и белка сыворотки крови морских свинок, иммунизированных лиофилизированными и абсорбированными антигенами личинок *Trichinella spiralis*. Авторы следили за реакцией организма как *in vitro* (реакция преципитации с живыми личинками), так и *in vivo* (аллергической кожной пробой).

CONTRIBUTIONS A L'ETUDE DE L'IMMUNITE DANS LA TRICHINOSE EXPERIMENTALE

Gh. Lupascu, A. Hacig, P. Solomon, C. Ciurea, L. Iancu

Les auteurs ont suivi la dynamique des anticorps, les variations de la formule leucocytaire, de la glycémie et de la protéinémie, sur un groupe de cobayes infectés par voie expérimentale avec des larves de *Trichinella spiralis*, et parallèlement sur un autre groupe de cobayes inoculés avec un antigène totalement lyophilisé de *Trichinella Spiralis*, adsorbé à support minéral. La réactivité de l'organisme a été suivie „in vitro” par des réactions de précipitation annulaire et de précipitation sur des larves vivantes, tandis que „in vivo” par des réactions allergiques cutanées.