

Z Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Józef Parnas

i z Kliniki Ftyzjatrycznej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Helena Mysakowska

Zygmunt HENCNER i Marta SIDOR-SMAGA

Badania nad odczynem wiązania dopełniacza i odczynem hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa przy gruźlicy

Исследования над реакцией связывания комплемента и над реакцией гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a при туберкулезе

Investigations on the Complement Fixation Test and the Middlebrook-Dubos Haemagglutination Reaction in Tuberculosis

Rozpoznanie gruźlicy metodami serologicznymi opiera się na odczynie wiązania dopełniacza (OWD) i hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa (MD), na co zwrócili uwagę Bordet i Gengou, Wassermann, Vızı Laszlo, Stage, Langeron i Hour, Karkadinowska, Kwapiński i współpracownicy, Rethbard i współpracownicy oraz wielu innych.

W pierwszym doniesieniu podajemy tylko część opracowanych przez nas prób. Zamierzamy doprowadzić nasze badania do dużej ilości surowic, co będzie miało znaczenie praktyczne.

MATERIAL BADAWCZY:

Surowice do badań otrzymane z Kliniki Ftyzjatrycznej Akademii Medycznej w Lublinie i Sanatorium Przeciwgruźliczego w Adampolu, oraz innych Klinik Akademii Medycznej podzielono na następujące grupy:

- 1) surowice od chorych z różnymi postaciami gruźlicy płuc i gruźlicy pozapłucnej,
- 2) surowice od chorych na inne choroby wewnętrzne,
- 3) surowice od osób zdrowych.

METODYKA PRACY:

a) odczyn wiązania dopełniacza (OWD)

W odczynie wiązania dopełniacza posługiwano się antygenem przyrządzonym według metody podanej przez Vızı Laszlo (6) z własną modyfikacją; szczep BCG brazylijski (otrzymany z Lub. Wyłw. Surowic i Szczepionek), hodowany na

płynnej pożywce, zabijano w temp. 120°C w ciągu 1 1/2 godziny. Następnie przepłukiwano wodą destylowaną, przesączając przez sączek bibułowy aż do wyjaśnienia przesączu. Osad pozostawiono do całkowitego wysuszenia, rozbijając przed tym większe grudki zlepionej masy prątków. Do 1,0 g wysuszonego proszku dodawano 10 ml alkoholu propylowego i umieszczano zawartość próbówki w łaźni wodnej o ciepłocie 96°C, mieszając przez 1,5 min. Następnie przesączano przez sączek bibułowy do zlewki, umieszczonej w łaźni wodnej o ciepłocie 37°C. 5 ml przesączu dodawano do 45 ml wody destylowanej, umieszczonej w kąpeli wodnej o ciepłocie 62°C, następnie mieszano w 150 ml wody destylowanej, podgrzanej do ciepłoty 60°C.

W czasie przeprowadzanych badań, po kilkakrotnych przygotowaniach antygeny, okazało się, że najlepszy antygen uzyskać można z 9—11 dniowej hodowli BCG. Antygen uzyskiwany z hodowli starszych okazał się mniej czuły w odczynie wiązania dopełniacza niż uzyskiwany z hodowli młodszych.

Otrzymany antygen, lekko opalizujący, o stężeniu 1:40 używano do odczynu wiązania dopełniacza po poprzednim podgrzaniu na łaźni wodnej o ciepłocie 60°C aż do wyjaśnienia płynu, w rozcieńczeniach 1:80 do 1:1280, według podanej techniki przez Vizy Laszlo (6) i J. Nawrockiego (7). Dla porównania wartości naszego antygeny odczyn wykonywaliśmy z antygenem otrzymanym od J. Nawrockiego.

Surowice inaktywowane w temperaturze 57—60°C rozlewano po 0,1 ml do każdej próbówki oraz do próbówki kontroli antygeny, dodawano antygen, według rozcieńczenia i dopełniacz uprzednio wymiaremczkowany po 0,5 ml.

Próbówki po wstrząśnięciu umieszczano w łaźni wodnej o ciepłocie 37—40°C. Po 20 min. do każdej próbówki dodawano systemu hemolitycznego: 0,5 ml amboceptora i 0,5 ml 4% krwinek barana, trzykrotnie przemytych roztworem fizjologicznej soli o oznaczonej hemoglobinie.

Po 20 minutach odczytano wynik oznaczając: brak hemolizy w pierwszej próbówce +, w drugiej ++, +++ , itd. zupełną hemolizę jako — (minus).

b) odczyn hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa:

Odczyn wykonywano w ten sposób, że inaktywowano surowicę w łaźni wodnej o ciepłocie 56°C i przygotowano szereg rozcieńczeń w roztworze fizjologicznym soli od 1:8 do 1:512. Do każdego rozcieńczenia badanej surowicy w objętości 0,4 ml dodano po 0,4 ml zawiesiny 0,5% uczulonych krwinek i po uprzednim wstrząśnięciu wstawiano do łaźni wodnej o ciepłocie 37°C na dwie godziny. W przeprowadzonych badaniach posługiwano się krwinkami ludzkimi grupy „0”. Krwinki po trzykrotnym przemyciu solą fizjologiczną o pH 7,2 uczulono tuberkuliną PZH dializowaną metodą Flecka: 5 ml skoncentrowanej tuberkuliny PZH umieszczono w worku celofanowym z dodatkiem mertiolatu w stosunku 1:10 i dializowano w wodzie bieżącej przez 48 godzin. Następnie tuberkulinę dializowano w wodzie destylowanej w ciągu 24 godzin. Dializowaną tuberkulinę doprowadzano do roztworu izotonicznego przez dodanie soli kuchennej.

Do 0,15 ml trzykrotnie przemytych fizjologicznym roztworem soli krwinek grupy „0” dodawano 1,0 ml przygotowanego roztworu tuberkuliny. Krwinki uczulano w łaźni wodnej o temp. 37°C przez dwie godziny, wstrząsając co 10—15 min. Następnie zawiesinę uczulonych krwinek odwirowywano, osad przemywano trzykrotnie roztworem fizjologicznym soli i sporządzono 0,5% zawiesinę.

Kontrolę odczynu stanowiły:

1. Krwinki grupy „0” uczulone, do których dodano roztworu fizjologicznego soli zamiast surowicy.

2. Krwinki grupy „0” nie uczulone, do których dodano surowicę badaną.
3. Kontrola surowicy dodatniej.
4. Kontrola surowicy ujemnej.

Wyniki odczynu hemaglutynacyjnego odczytywano po raz pierwszy po dwu godzinach, następnie po wstrząśnięciu pozostawiano statyw w temperaturze pokojowej do następnego dnia i odczytywano aglutynację krwinek w poszczególnych próbkach po raz drugi. Każdą próbkę lekko trącano palcem: w razie wyniku dodatniego, po wstrząśnięciu próbki palcem, unosił się z dna osad i w bezbarwnym lub lekko różowym płynie zawieszały się grudki zlepionych krwinek. W razie wyniku ujemnego, krwinki leżące na dnie próbki w postaci guziczka, po wstrząśnięciu rozbiły się, tworząc w płynie jednolitą zawiesinę.

Dla ułatwienia odczytywania aglutynacji krwinek posługiwano się aglutynoskopem.

WYNIKI BADAŃ

Badania surowic pobranych od chorych na gruźlicę

Wśród 90 surowic omawianych chorych odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 71 chorych (78,9%), ujemnie u 19 chorych (21,1%). Odczyn hemaglutynacji MD u tych chorych wypadł dodatnio u 69 chorych (76,7%), ujemnie u 21 chorych (23,3%).

Tabela 1 przedstawia wyniki odczynu wiązania dopełniacza i hemaglutynacji MD surowic pobranych od chorych z gruźlicą płucną i gruźlicą pozapłucną. Wiek chorych, OB, obecność prątków gruźlicy oraz stosunek wysokości miana OWD i hemaglutynacji MD do OB i obecności prątków.

Ze względu na postać gruźlicy chorych podzielono na 3 grupy:

- I grupa: gruźlica płuc naciekowa — 47 chorych,
- II grupa: gruźlica płuc włóknisto-jamista — 31 chorych,
- III grupa: inne postacie gruźlicy płuc i gruźlica węzłów chłonnych — 12 chorych (zaliczono tu: marskość gruźliczą, gruźlicę włóknisto-guzkową ograniczoną, gruźlicę podostrą przewlekłą oraz gruźlicę węzłów chłonnych obwodowych).

Odczyn wiązania dopełniacza i hemaglutynacji MD w wyżej wymienionych 3 grupach przedstawia się następująco:

W pierwszej grupie odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 43 chorych (91,5%), ujemnie u 4 chorych (8,5%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 43 chorych (91,5%), ujemnie u 4 chorych (8,5%).

W grupie II odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 23 chorych (74,2%), ujemnie u 8 chorych (25,8%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 19 chorych (61,3%), ujemnie u 12 chorych (38,7%).

Tabela 1.

Grupa	Ilość przypadków	Wiek	O. B.	Prątki		Odczyn wiązania dopełniacza								Odczyn hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa									
				+	-	ujemny	1:80	1:160	1:240	1:320	1:480	1:640	1:960	ujemny	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256			
I	47	17-50	w granicach fizjologicznych	16	8	8	2	-	-	1	6	5	2	-	-	-	1	2	5	5	3	-	
			przyspieszony	18	4	14	1	-	-	5	5	2	-	-	-	-	4	-	1	5	4	4	-
			znacznie przyspieszony	13	6	7	2	-	1	2	4	2	-	-	-	-	-	1	3	5	1	2	1
II	31	15-60	w granicach fizjologicznych	8	1	7	2	-	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	1	2	1	-
			przyspieszony	15	10	5	5	1	1	3	2	1	2	-	-	-	8	-	2	3	1	1	-
			znacznie przyspieszony	8	8	-	-	-	1	1	-	4	1	1	-	-	-	1	5	1	-	1	-
III	12	20-67	w granicach fizjologicznych	2	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
			przyspieszony	6	2	4	5	-	1	-	-	-	-	-	-	5	-	1	-	-	-	-	-
			znacznie przyspieszony	4	4	-	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	2	1	-

W grupie III odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 6 chorych (50,0%), ujemnie u 6 chorych (50,0%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 7 chorych (58,4%), ujemnie u 5 chorych (41,6%).

Uwzględniając fazę rozwojową zmiany gruźliczej, podzielono chorych na dwie zasadnicze grupy:

I grupa obejmuje 3 fazy niekorzystne dla ustroju, a więc fazę nacieku, rozpadu i wysiewu. W grupie tej było 65 chorych.

II grupa obejmuje 3 fazy korzystne dla ustroju, a więc fazę wchłaniania, włóknienia i wapnienia. W grupie tej było 25 chorych.

Odczyn wiązania dopełniacza i hemaglutynacji MD w wyżej wymienionych 2 grupach przedstawia się następująco:

W grupie I odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 51 chorych (78,5%), ujemnie u 14 chorych (21,5%). Odczyn hemaglutynacji wypadł dodatnio u 54 chorych (83,1%), ujemnie u 11 chorych (16,9%).

W grupie II odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 21 chorych (84,0%), ujemnie u 4 chorych (16,0%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 17 chorych (68,0%), ujemnie u 8 chorych (32,0%).

Ze względu na stan ogólny, chorzy podzieleni zostali na trzy grupy: A, B, C.

A. Chorzy ze stanem ogólnym wyrównanym, trwającym najkrócej przez 1 rok, z ciepłotą w granicach prawidłowych, z niskim OB, bez prątków gruźlicy w plwocinie. W grupie tej było 11 chorych. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 8 chorych (72,7%) ujemnie u 3 chorych (27,3%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 7 chorych (63,6%), ujemnie u 4 chorych (36,4%).

B. Chorzy ze stanem ogólnym chwiejnym, ze stanami podgorączkowymi, podwyższonym OB, odkształcający mierne ilości plwociny, w której wykrywano prątki gruźlicy. W grupie tej było 68 chorych. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 57 chorych (83,8%), ujemnie u 11 chorych (16,2%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł u 51 chorych dodatnio (75,0%), ujemnie u 17 chorych (25,0%).

C. Chorzy ze stanem ogólnym niewyrównanym, z wysokim OB, z wysoką gorączką, odkształcający duże ilości plwociny, w której wykrywano prątki gruźlicy metodą bezpośrednią. W grupie tej było 11 chorych. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 8 chorych (72,7%), ujemnie u 3 chorych (27,3%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 10 chorych (90,9%), ujemnie u 1 chorego (9,1%).

Badania surowic pobranych od chorych na inne choroby wewnętrzne

Przebadano 44 surowic pobranych od chorych, u których ustalono rozpoznanie: białaczka 4 chorych, bruceloza 8, cukrzyca 4, dychawica oskrzelowa 6, nowotwór płuca 4, ropień płuca 5, twardziel 7 i ziarnica

złośliwa 6. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio u 9 chorych (20,5%), ujemnie u 35 chorych (79,5%). Odczyn hemaglutynacji MD wypadł dodatnio u 7 chorych (15,9%), ujemnie u 37 chorych (84,1%).

Wysoki procent wyników można tłumaczyć nieswoistością odczynów albo tym, że u niektórych chorych proces chorobowy, toczący się w węzłach chłonnych, przebiegał równocześnie z procesem gruźliczym, np. u chorego K. Z. u którego w czasie przebiegu ziarnicy złośliwej wyhodowano prątki kwasooporne. U chorych tych proces gruźliczy mógł być nieczynny, w postaci ogniska pierwotnego.

Badania surowic pobranych od osób zdrowych klinicznie

Przebadano 120 surowic pobranych od osób klinicznie zdrowych. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio w stosunkowo niskich mianach u 7 osób (5,8%), ujemnie u 113 osób (94,2%). Odczyn hemaglutynacji MD natomiast wypadł dodatnio podobnie jak OWD w niskich mianach u 10 osób (8,3%), ujemnie u 110 osób (91,7%).

Wyniki otrzymane w naszych badaniach są zgodne z wynikami innych autorów.

Wykonując odczyn wiązania dopełniacza przy gruźlicy Stage*) otrzymał 98,0% wyników dodatnich, Vizy Laszlo 83,0%. Inni autorzy od 58,4% do 86,0% wyników dodatnich. Wykonując zaś odczyn hemaglutynacji MD w diagnostyce gruźlicy Rothbard**) i współautorzy otrzymali 88,2% do 100,0% wyników dodatnich, Kwapiński i współautorzy 93,0% Mommik**) 76,7%.

OMÓWIENIE KONCOWE

Przebadano 90 surowic pobranych od chorych z różnymi postaciami gruźlicy. Odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio w 78,9%, a odczyn hemaglutynacji MD w 76,7%.

Odczyn wiązania dopełniacza przewyższył w naszych badaniach odczyn hemaglutynacji MD przy gruźlicy włóknisto-jamistej o 12,9%.

Odczyn hemaglutynacji wypadł dodatnio o 8,4% w większej ilości przypadków w innych postaciach gruźlicy. W gruźlicy naciekowej obydwa odczyny wypadają dodatnio w tej samej ilości surowic.

Odczyn wiązania dopełniacza w 120 przebadanych surowicach pobranych od osób zdrowych, wypadł dodatnio w 5,8%, a odczyn hemaglutynacji MD w 8,3%.

*) cyt. wg Laszlo V.

**) cyt. wg Słopka S.

Na 44 przebadanych surowic, pobranych od osób z innymi chorobami wewnętrznymi odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio w 20,5%, a odczyn hemaglutynacji MD w 15,9%.

Streszczając powyższe badania, możemy wyciągnąć wniosek, że odczyn: wiązania dopełniacza i hemaglutynacji MD mogą oddać usługi jako uzupełniające badania w rozpoznawaniu schorzeń gruźliczych.

PIŚMIENNICTWO

1. Fleck L. i Borecka D.: Gruźlica. T. XXI, 2, 97, 1953. 2. Karkadinowska A.: Weterinaria 3, 36, 1953. 3. Kwapiński J.: Przegl. Lek. 4, 121, 1954. 4. Kwapiński J., Pietraszkiewiczowa H.: Gruźlica 8, 579, 1953. 5. Langeron L. Hour H.: Rev. de la Tuberc. 5, 695, 1929. 6. Laszlo V.: A. Magyar Allatorvosok Lapja 1951 (maszynopis), 7. Nawrocki J.: Med. Wet. 7, 395, 1955. 8. Smith D., Scott N.: Am. Rev. Tuberc. 62, 121, 1950. 9. Slopek S. i współ., Janowiec M., Kamińska J.: XI Zjazd Przeciwwzrostliczy, 1953. Dodatek do Gruźlicy 9, 3, 1953.

Р Е З Ю М Е

При применении серологических методов, а именно: реакции связывания комплемента и реакции гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a авторами было обследовано:

1. 90 сывороток, взятых от больных разными формами туберкулеза легких, а также внелегочного туберкулеза. Реакция связывания комплемента оказалась положительной у 71 больных (78,9%), а реакция гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a у 69 больных (76,7%).
2. 44 сыворотки, взятые от больных разными другими внутренними болезнями. Положительный результат реакции связывания комплемента был получен у 9 больных (20,5%), а реакции гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a у 7 больных (15,9%).
3. 120 сывороток, взятых от лиц клинически здоровых. Реакция связывания комплемента была положительна при сравнительно низких титрах у 7 лиц (5,8%), а реакция гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a у 10 лиц (8,3%).

Реакция связывания комплемента применялась с антигеном, приготовленным по методу, представленному Ляшло V. (1951), с собственной модификацией авторов из штамма BCG бразильского.

Реакция гемагглютинации Middlebrook'a и Dubos'a применялась с антигеном, приготовленным по методу опубликованному Флеком Л. (1953).

SUMMARY

Samples of blood serum taken from 90 patients with various forms of tuberculosis of lungs and other organs were investigated by means of serological methods of complement fixation and Middlebrook-Dubos haemagglutination. The complement fixation test was positive in 71 (78.9 per cent) patients, and the Middlebrook-Dubos haemagglutination reaction in 69 (76.7 per cent).

44 sera were taken from patients suffering from other internal diseases. The complement fixation test was positive in 9 patients (20.5 per cent), and the haemagglutination reaction in 7 patients (15.9 per cent).

120 sera were taken from clinically healthy persons. The complement fixation test was positive in relatively low titers in 7 persons (5.8 per cent), and the haemagglutination reaction in 10 persons (8.3 per cent).

The complement fixation test was performed with an antigen prepared from the BCG Brazil strain according to V. L a s z l o (1951) in the authors' own modification.

The Middlebrook-Dubos haemagglutination reaction was performed with an antigen prepared according to L. F l e c k (1953).