

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXI, 43

SECTIO D

1966

---

Katedra i Zakład Higieny Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr Jan Brzozowski

Jan BRZOZOWSKI, Zofia KOŁATAJ,  
Hanna ZIÓŁKOWSKA-SŁUPCZYŃSKA,  
Ewa PACHUCKA

**Zachowanie się odczynu Middlebrooka-Dubosa pod wpływem  
ostrego zatrucia ołowiem u szczurów**

*Manière d'agir du titre Middlebrook-Dubos sous l'influence de l'intoxication  
aiguë par l'acétate de plomb chez les rats*

Wpływ zatruc chemicznych na odczyn serologiczne u ludzi sygnalizowany jest w literaturze i potwierdzają go obserwacje własne (7, 14). Przedmiotem obecnej pracy było prześledzenie jak zachowuje się odczyn Middlebrooka—Dubosa u szczurów pod wpływem wprowadzonych dużych toksycznych dawek ołowiu.

ORGANIZACJA I METODYKA BADAN

Dla uzyskania odpowiedzi na postawione pytanie należało stworzyć warunki, w których zwierzęta o określonych mianach Middlebrooka poddawane byłyby zatruciu ołowiem, a następnie obserwowano zachowanie się tych mian.

1. Rozporządzając wyłącznie hodowlą białego szczura laboratoryjnego o bliżej nieokreślonych cechach fenotypowych należało przeprowadzić szereg obserwacji wstępnych uwzględniając jednocześnie, że małe wymiary tego zwierzęcia pozwalają na pobieranie, bez wywołania zmian w obrazie krwi, jedynie 0,5 ml krwi w odstępie 5—7 dni. Z tego względu w toku wykonywanych badań zwierzęta dzielone były na małe grupy (4 eksperymentalne i 1 kontrolne), co pozwalało na bardzo dokładne uwzględnianie podanych wyżej warunków. W całości badań użyto 80 białych szczurów laboratoryjnych, które stanowiły drugie pokolenie własnego chowu. Zwierzęta otrzymywały stale paszę granulowaną (20 g dziennie), mleko (10 ml dziennie), wodę w dowolnych ilościach oraz okresowo marchew. Badane szczury, płci obojga, były w wieku 5—9 miesięcy (58% 5-miesięcznych), o wadze 150—350 g (40% — 270 g). Badania wykonane były w okresie od marca do lipca 1966 r.

2. Zwierzęta zatrutowano 10% roztworem octanu ołowiu, podawanego jednorazowo w ilości 150 mg/kg wagi ciała, drogą dootrzewnową. Wg Spectora (18), po zastosowaniu takiej dawki połowa zwierząt powinna paść po upływie 3—4 dni, niezależnie od płci szczura. Dla skontrolowania reakcji zwierząt na czynnik to-

ksyczny poddano zatruciu 32 szczury, dodatkowych 8 przyjęto za kontrolne. U wszystkich zwierząt obserwowano: czas padania, wagę ciała, poziom hemoglobiny, liczbę czerwonych ciałek krwi i występowanie porfiryn w moczu. (Hemoglobinę oznaczano fotoelektrycznym hemoglobinomierzem typu Haemotest przy użyciu amoniaku w stężeniu 0,04%, przyjmując za normę 80—100% hemoglobiny (1), czerwone ciała krwi obliczano w komorze Thoma—Zeissa i za normę przyjęto 7—9 milionów w  $\text{mm}^3$  (1), porfiryny w moczu oznaczano wg metody de Langen'a i Ten Berg'a (2) — (mocz zbierano w klatkach metabolicznych w warunkach zabezpieczających przed działaniem promieni ultrafioletowych). Otrzymane wyniki wykazały zgodność reakcji naszej hodowli z obserwacjami innych autorów (18, 19) w odniesieniu do  $\text{DL}_{50}$  oraz typowe odchylenia dla zatrucia ołowiem. Ilość zwierząt padłych w okresie 3—4 doby utrzymywała się w normie (50%). Średni spadek wagi ciała wynosił 13,7% (kontrolne wykazały wzrost wagi o 0,9%), spadek hemoglobiny 10,56% (kontrola — wzrost poziomu hemoglobiny o 2,03%), liczba czerwonych ciałek krwi spadła średnio o 12,64% (u zwierząt kontrolnych wzrost liczby czerwonych ciałek krwi o 0,17%). W moczu wszystkich zatrutych zwierząt pojawiły się porfiryny w wartościach od ++ do +++, (u żadnego ze zwierząt kontrolnych porfiryny nie wystąpiły).

3. Dla oznaczenia poziomu ciał przeciwgruźliczych zastosowano odczyn Middlebrooka-Dubosa (4, 5, 10, 11), który wykonywano używając jako antygenu krwinek ludzkich grupy 0 uczulonych starą tuberkuliną Kocha i trzykrotnie przemytych 1,2% roztworem NaCl. Surowice rozcieńczano od 1 : 4 do 1 : 1024 i pozostawiano w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytywano po upływie 18 i 24 godz.

Ponieważ w warunkach naturalnych u szczurów nie występuje odczyn Middlebrooka, co jest zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów (12, 13, 22) i badaniami własnymi, zwierzęta poddano szczepieniu szczepionką BCG typu brazylijskiego. Wykonano próbne szczepienie 4 siedmiomiesięcznych szczurów wybranych losowo, podając dootrzewnowo każdemu inną, od 0,1 do 0,4 dawkę szczepionki BCG. U wszystkich tych szczurów obserwowano w 6 tygodniu po szczepieniu pojawienie się dodatnich odczynów Middlebrooka, odpowiednio kolejno: 1 : 32, 1 : 128, 1 : 16, 1 : 64. Wykonane kontrole metodyczne wykazały możliwość przeprowadzenia eksperymentu celem odpowiedzi na postawione we wstępie pytanie.

#### WYKONANIE I WYNIKI BADAŃ

Grupę 30 zwierząt w wieku trzech miesięcy i wadze 105—220 g zaszczepiono dootrzewnowo 0,2 ml BCG i okresowo kontrolowano narastanie miana Middlebrooka (tab. 1, część I). Zwierzęta uznano za przygotowane do wprowadzenia ołowiu w czasie, gdy dwa kolejne oznaczenia odczynu Middlebrooka wykazywały spadek lub brak narastania miana. Odpowiadało to 7—9 tygodniowi od chwili wprowadzenia szczepionki. W tym okresie zwierzęta były już dojrzałe i miały wiek 5 miesięcy i wagę 150—280 g (270 g — 43,3%). Z grupy tej 24 szczurom podano 10% roztwór octanu ołowiawego, a 6 sztuk przyjęto za kontrolę. Następnie wykonano testy diagnostyczne. Otrzymano wyniki: 50% zwierząt padło do okresu między 3—4 dobą, spadek wagi 4,5%, spadek hemoglobiny 9,26%, spadek liczby erytrocytów 7,92% oraz u wszystkich zwierząt zatrutych stwierdzono obecność porfiryn w moczu od ++ do +++. Jednocześnie u 6 zwierząt kontrolnych obserwowano: utrzymywanie się

Tab. 1. Zachowanie się odczynu Middlebrooka-Dubosa w przebiegu ostrego zatrucia ołowiem u szczurów  
 Variabilité de réaction Middlebrook-Dubos chez les rats, au cours de l'intoxication saturnine aiguë

Nr szczu- ra No du rat	Miano odczynu M-D po wstrzyknięciu 0,2 ml szcze- pionki BCG Titre de réaction M-D en conséquence de l'injection de 0,2 ml de Vaccin BCG					Miano odczynu M-D po zatruciu zwie- rząt 10% roztworem Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Titre de réaction résultant de l'intoxica- tion des rats par la solution 10% de Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>						
	Poszczególne tygodnie: Semaines particulières:					Poszczególne doby w tygodniu Jours particuliers de la semaine						
	IV	VI	VII	VIII	IX	1	2	XI 3	4	5	7	XII 14
1	1:8	1:128		1:32	1:16	1:8			1:16+			
2		1:64		1:64	1:8	1:8			1:16			1:16
3	1:8	1:64		1:64	1:16	1:4			1:8			1:8
4	1:32	1:64		1:64	1:16	+						
5	1:16	1:16		1:16	1:16		1:8			+		
6	1:16	1:32		1:32	1:16		1:8			1:16 + doba VI		
7	1:16	1:64		1:16	1:16		+					
8	1:16	1:64		1:16	1:8		+					
9				1:16	1:8		1:16			1:16 + doba VIII		
10		1:32		1:8	1:8	+						
11	1:8	1:8		1:8	1:8		1:8+					
12	1:8	1:64		1:16	1:8		1:16+					
13	1:16	1:64	1:8	1:4		+						
14	1:8	1:32	1:16	1:8				1:8	+			
15	1:8	1:64	1:16	1:8				1:16			1:16 + doba XII	
16	1:16	1:32	1:8	1:4				1:8	+			
17	1:4	1:8	1:8	1:8		1:8				1:16 + doba VI		
18	1:16	1:32	1:32	1:4				1:4			1:8	1:8
19	1:16		1:16	1:4		+						
20	1:8	1:32	1:8	1:8				1:16			1:16	1:16
21	1:16	1:64	1:32	1:4		+						
22	1:8	1:64	1:32	1:8		+						
23	1:16	1:64	1:32	1:8		+						
24	1:32	1:32	1:16	1:4				1:8 + doba III				
	K o n t r o l a											
25	1:8	1:64	1:16	1:8						1:8		
26	1:16	1:16	1:16	1:8				1:8				1:4
27	1:32	1:64	1:16	1:8							1:8	1:8
28	1:8	1:8		1:8	1:8	1:8						
29	1:32	1:64		1:16	1:16			1:8				
30	1:16			1:16	1:16			1:16				

+ — zwierzę padło

+ — date de crevaison des rats

wagi ciała na stałym poziomie, wzrost poziomu hemoglobiny średnio o 0,5%, wzrost ilości czerwonych ciałek krwi o 0,7%. Porfiryn w moczu nie stwierdzono.

W tab. 1 (cz. II) zestawione są dane serologiczne i czas padania zwierząt. Wynika z nich, że na 24 szczury, którym wprowadzono octan ołowiu, w wyznaczonym terminie można było wykonać badania jedynie u 15 zwierząt.

Biorąc pod uwagę zachowanie się odczynu Middlebrooka u każdego szczura w całym okresie obserwacyjnym można zauważyć:

1. U 9 szczurów w przebiegu obserwacji wystąpiła zwyżka miana Middlebrooka w stosunku do najniższej wartości przed zatruciem (szczury nr 2, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 20 i 24), przy czym u szczura nr 17 wartość miana po zatruciu przekroczyła najwyższy poziom uzyskany po szczepieniu.

2. U czterech szczurów (nr: 1, 6, 11, 14) poziom miana nie przekroczył poziomu przed zatruciem. Szczur nr 1 w pierwszej dobie miał obniżone miano 1 : 8 (wobec stanu przed zatruciem 1 : 16). Miano 1 : 16 obserwowano w 4 dniu. Padł w czwartej dobie. Szczur nr 6 w drugiej dobie miał miano obniżone (1 : 8), które poziom przed zatruciem osiągnęło w piątej dobie (1 : 16). Padł w szóstej dobie. Miana u szczurów 11 i 14 badane w drugiej i trzeciej dobie odpowiadały wartościom przed zatruciem. Szczury te padły w drugiej i czwartej dobie.

3. U dwóch szczurów (nr 3 i 5) wystąpił spadek miana przy czym u szczura nr 3 w pierwszej dobie miano wynosiło 1 : 4, w czwartej 1 : 8 i podobnie w czternastej dobie, przy najniższej wartości przed zatruciem 1 : 16. Szczur nr 5 był raz badany w drugiej dobie. Padł w piątej dobie.

W badanym materiale u zwierząt reagujących zmianą miana u 82% (9 na 11) wystąpiła zwyżka, a tylko u 18% spadek. Wobec tego wzrost miana występuje w istotny sposób częściej niż spadek.

$$X^2 \text{ (Chi-kwadrat) } = 4,455 \quad p < 0,05$$

Poza tym biorąc pod uwagę czas upływający od momentu zatrucia i porównując rejestrowane poziomy miana z najniższymi wynikami przed zatruciem, można powiedzieć, że:

— w pierwszej i drugiej dobie na 9 szczurów badanych 2 wykazały wzrost, 4 spadek a 3 zachowanie się odczynu na tym samym poziomie;

— w trzeciej dobie na 6 szczurów badanych 4 wykazały wzrost, 2 zachowanie poprzedniego poziomu. Spadku miana nie notowano.

— w okresie od czwartej do czternastej doby włącznie obserwowano 9 zwierząt. 6 wykazało wzrost miana, 2 utrzymywanie się na tym samym poziomie i spadek u jednego szczura. W tym czasie u zwierząt kontrolnych ilość ciał przeciwgruźliczych utrzymywała się na niskim poziomie. Wzrostu miana nie obserwowano w żadnym przypadku.

## O m ó w i e n i e

Ilość przeciwciał po szczepieniu BCG stopniowo narasta osiągając swój szczyt około szóstego tygodnia, po czym powoli opada. Własne kontrole wykazują regularność spadku ilości ciał przeciwgruźliczych krążących we krwi, przy czym niższe miana odczynu Middlebrooka utrzymują się dłużej niż wysokie (5). Na naszym materiale zwykłego białego szczura laboratoryjnego dootrzewnowe wstrzykiwanie 10% octanu ołowianego w jednorazowej dawce 150 mg/kg okazało się bodźcem wywołującym zwiększenie ilości ciał przeciwgruźliczych rejestrowanych metodą Middlebrooka. Poza tym zebrane obserwacje zdają się wskazywać na znaczenie czasu, jaki upłynął od wprowadzenia octanu ołowianego do wystąpienia wzrostu miana Middlebrooka, jako czynnika niezbędnego do wywołania tego zjawiska. Z danych, jakie uzyskano na 12 szczurach obserwowanych od trzeciej do czternastej doby włącznie wynika, że 8 zwierząt zareagowało wzrostem miana, 3 — brakiem wpływu zastosowanego bodźca a jeden spadkiem miana. Różnice te (częściej występujący wzrost niż spadek) są statystycznie istotne ( $X^2 > 5$ ,  $p < 0,04$ ). Bliższa analiza przemawia za wystąpieniem reakcji na bodziec również u 2 z 3 szczurów, które nie wykazały wzrostu miana (nr 1, 6 i 14). Szczur nr 1 w pierwszej dobie miał spadek (1 : 8) i dopiero w czwartej dobie wystąpił wzrost do 1 : 16 (stan jak przed zatruciem). Podobnie szczur nr 6 — spadek w drugiej dobie (1 : 8), wzrost w piątej (1 : 16), — stan jak przed zatruciem. Szczura nr 3 zaliczono do zwierząt ze spadkiem miana. U niego również obserwuje się wystąpienie w czwartej dobie zwyżki miana, które nie osiągnęło jednak stanu przed zatruciem (przed zatruciem 1 : 16, w pierwszej dobie 1 : 4, w czwartej 1 : 8, w czternastej 1 : 8). Szczur nr 18 w trzeciej dobie miał miano równe stanowi przed zatruciem, to jest 1 : 4, a zwyżka miana wystąpiła dopiero w siódmej i czternastej dobie — 1 : 8. Podobnie szczury nr 2 i 17. Spostrzeżenia te mogą przemawiać za opóźnieniem reakcji immunologicznej na naszym materiale o około 4 dni.

## W n i o s k i

1. Wykazano znamienność wzrostu miana odczynu Middlebrooka po jednorazowym wstrzyknięciu dootrzewnowo 10% octanu ołowianego ( $DL_{50}$ ) u białych szczurów laboratoryjnych poddanych uprzednio szczepieniu BCG.

2. Zachowanie się odczynu Middlebrooka w pierwszych trzech dobach jest nietypowe. Wzrost miana występuje wyraźniej od trzeciej doby, co może przemawiać za opóźnieniem reakcji immunologicznej u szczura.

## PIŚMIENICTWO

1. Barański S., Czerski P. i wsp.: Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych, PWN, Warszawa 1962.
2. Brzozowski J.: *Medycyna Pracy* **1**, 23, 1950.
3. Dynier E., Okolska W.: *Gruźlica* **25**, 12, 1957.
4. Hencner Z., Sidor-Smaga M.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **3**, 253, 1958.
5. Janowiec M.: *Gruźlica* **24**, 1103—1111, 1956.
6. Janowiec M.: *Gruźlica* **27**, 1, 1956.
7. Kotlińska E., Brzeski Z., Strycharz L.: *Pol. Tyg. Lek.* **21**, 246—248, 1966.
8. Kulejewska M.: *Gruźlica* **27**, 387—395, 1959.
9. Kuźniecowa K., Sitek K.: *Gruźlica* **24**, 925—932, 1956.
10. Middlebrook G., Dubos R.: *Jour. Exp. Med.* **88**, 512, 1948.
11. Middlebrook G., Dubos R.: *Amer. Rev. Tuberc.* **58**, 700, 1948.
12. Milgrom F., Świerczyńska Z.: *Arch. Immun. i Terap. Dośw.* **2**, 71, 1954.
13. Milgrom F., Świerczyńska Z.: *Med. Dośw. i Mikrobiol.* **8**, 264, 1950.
14. Murzakajew F.: *Gig. truda i proff. zabol.* **11**, 50—53, 1956.
15. Paluch E.: *Toksykologia przemysłowa*, PWT, Warszawa 1954.
16. Pierce C., Dubos R., Schaeffer W.: *Jour. Exp. Med.* **97**, 189, 1953.
17. Rudzki E.: *Post. Hig. i Med. Dośw.* **11**, 43, 1957.
18. Spector W.: *Handbook of Toxicology*. 1956.
19. Sroczyński J.: *Post. Hig. i Med. Dośw.* **13**, 741, 1959.
20. Sroczyński J.: *Post. Hig. i Med. Dośw.* **17**, 585, 1963.
21. Sroczyński J.: *Pol. Tyg. Lek.* **19**, 541, 1964.
22. Świerczyńska Z., Chtiej R.: *Med. Dośw. i Mikrobiol.* **12**, 1, 1960.
23. Tempka T.: *Choroby układu krwiotwórczego*, Warszawa 1954.
24. Tulczyński M.: *Metody laboratoryjnej diagnostyki klinicznej*, PZWL, Warszawa 1962.

Otrzymano 2 XII 1966.

### Реакция Мидлбрука-Дибоса при остром отравлении свинцом у крыс

#### Резюме

При помощи диагностических тестов для сатурнизма была проведена типичность реакции белых лабораторных крыс на ацетат свинца, введенный внутрибрюшинно. Второй группе экспериментальных животных была привита БЦЖ бразильского типа. В то время, как две последующие реакции Мидлбрука подтвердили снижение титра или отсутствие его роста, вновь было введен внутрибрюшинно 10%-ный  $Pb(CH_3COO)_2$ . Установлено, что повышение титра Мидлбрука является характерной реакцией, чего не обнаружено ни у одной из крыс контрольной группы. Из данных таблицы, приведенной в ра-

боте, следует, что для реакции Мидлбрука характерен рост титра после введения ацетата свинца, по сравнению с самым низким титром перед отравлением. В то же время у всех контрольных животных снижение титра по достижению вакцинного максимума было равномерное, а в периоде XI—XII недель после вакцинации — низкое.

Табл. 1. Реакция Мидлбрука-Дибоса при остром отравлении свинцом у крыс.

### **Manière d'agir du titre Middlebrook-Dubos sous l'influence de l'intoxication aiguë par l'acétate de plomb chez les rats**

#### **Résumé**

En employant les tests diagnostics concernant le saturnisme, on a contrôlé le genre typique de réaction à  $DL_{50}$  d'acétate de plomb, injecté par voie intra-péritonéale, comme particulier pour l'élevage des rats blancs de laboratoire. On a exécuté la vaccination de BCG, type brésilique, au second groupe des animaux du même élevage. Pendant que les deux réactions Middlebrook, faites successivement, présentaient l'abaissement du titre, ou même l'absence de son augmentation, on a injecté l'acétate de plomb de 10%. On a constaté l'augmentation du titre de la réaction Middlebrook comme réaction caractéristique et c'était justement cela qu'on n'a observé chez aucun animal du groupe de contrôle.

La table insérée dans le texte précise la manière d'agir du titre Middlebrook après la vaccination de BCG depuis la 4-ème semaine et ensuite dans les jours particuliers après l'intoxication par l'acétate de plomb 10% injecté intra-péritonéalement. De cette confrontation résulte l'augmentation significative du titre après l'introduction de l'acétate de plomb. On l'observe clairement en comparaison avec le titre le plus bas d'avant l'intoxication. Simultanément, la baisse du titre chez tous les rats du groupe de contrôle, après avoir obtenu le maximum post-vaccinal, n'était qu'également proportionnée et, depuis la 11-ème jusqu'à la 12-ème semaine après la vaccination, le titre restait bas.

