

О ЗАЩИТНОМ ДЕЙСТВИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ТРИХОМОНИАЗОМ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА НА БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ВНУТРИБРЮШИННО ИНФИЦИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАМИ *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Ю. ТЕРАС,

кандидат медицинских наук

Наряду с исследованиями антигенных свойств *Trichomonas vaginalis*, в последние годы были сделаны попытки выяснить иммунологическое значение антител, вырабатываемых организмом в ответ на инфекцию *T. vaginalis*. Эти работы основываются почти без исключения на данных, полученных в эксперименте на животных [5, 6]. В доступной нам литературе не удалось найти данных об иммунологической роли антител при заболевании трихомониазом у людей. Поэтому мы поставили задачу — для выяснения действия антител, вырабатываемых организмом больного трихомониазом урогенитального тракта, и изучения иммунологии этой инфекции исследовать защитное действие сыворотки крови больных трихомониазом людей на белых мышей при экспериментальном их заражении *T. vaginalis*.

Методика

Результаты предыдущих работ [1, 3, 4] дают полное основание считать белую мышь достаточно хорошо изученным тест-объектом в отношении *T. vaginalis*. Поэтому серопротекцию изучали на белых мышах, зараженных внутрибрюшинно. Так как в литературе не удалось найти соответствующих работ по трихомониазу, наши опыты носят до некоторой степени ориентировочный характер и для серопротекции были использованы только цельные сыворотки. Всего было исследовано защитное действие сывороток, полученных от 19-ти больных трихомониазом урогенитального тракта. В опыт были взяты белые мыши почти одинакового веса (18—20 г). Защитное действие каждой сыворотки исследовалось на 8—10 мышах путем внутрибрюшинного введения им по 0,5 мл сыворотки. Контрольным мышам вводили по 0,5 мл физиологического раствора поваренной соли. Через 30 минут после введения сыворотки или 0,85%-ного раствора NaCl мышей заражали внутрибрюшинно чистыми культурами *T. vaginalis*. Заражение производилось штаммом, изолированным у больной острой трихомональным кольпитом. Для культивирования штамма и получения чистых культур использовали среду «TV-1», являющуюся модификацией ранее описанной питательной среды «TV» [2].

Для изготовления среды «TV-1» к 250 мл печеночного бульона добавляют 650 мл рингеровского раствора. Далее добавляют (в порядке перечисления): 1,5 г солянокислого α -цистеина, 20 г пептона, 1,0 г отмытого агар-агара и 9,0 мл 4%-ного раствора NaOH. Печеночный бульон изготовлялся по методике приготовления его для среды «TV» [2]. Смесь стерилизовали в течение 20 минут при

120°C. После выпадения осадка смесь фильтровали через двойную фильтровальную бумагу и устанавливали при помощи 4%-ного раствора NaOH или HCl pH смеси на 5,7—5,8. Затем смесь подвергали повторной стерилизации в автоклаве в течение 20 минут при 120°C, после чего к ней добавляли 5 г мальтозы. После полного растворения добавленного сахара и тщательного встряхивания смесь разливали в колбы по 180 мл, стерилизовали в течение 20 минут при 105°C и давали остыть. Непосредственно перед разливанием смеси в пробирки к среде добавляли 20 мл инактивированной человеческой сыворотки или стерильной инактивированной асцитной жидкости и устанавливали (стерильным 4%-ным раствором NaOH или HCl) pH среды на 6,0—6,3. Для культивирования *T. vaginalis* и получения чистых культур была использована ранее описанная методика [1, 2].

Согласно литературным данным, при определении защитного действия сывороток в случаях различных инфекций используют 50% летальной дозы возбудителей (DL — 50%). В предварительных опытах было найдено количество трихомонад, приблизительно соответствующее половине DL. Учитывая отсутствие в доступной нам литературе методики определения летальной дозы *T. vaginalis*, за основу определения была принята методика, примененная при оценке патогенности трихомонад, и учтены полученные при этом результаты [1, 3, 4].

Поскольку использованный нами штамм (штамм Д) *T. vaginalis* обладал выраженной патогенностью, вызывая при интраперитонеальном введении 4 миллионов особей смерть белых мышей в течение 7—10 дней, в дальнейшей работе использовали 50% этой дозы, т. е. 2 млн. простейших. Инфицирование производилось 2—3-дневными культурами активно движущихся трихомонад. После определения плотности культур изготовляли взвесь трихомонад в физиологическом растворе, содержащую в 1 мл 4 млн. простейших. Каждой мышке вводили по 0,5 мл взвеси, т. е. 2 млн. простейших. Инфицированных мышей, как и контрольных, после 20-дневного наблюдения умерщвляли эфирным наркозом. Погибших и умерщвленных мышей сразу же вскрывали.

Для облегчения оценки и анализа результатов работы тяжесть патолого-анатомических изменений, обнаруженных у подопытных животных, была вырана в индексах по схеме, описанной в работе [3]. При вычислении индекса принимались во внимание: интенсивность возникших патологических изменений, наличие трихомонад в органах и серозном или фибринозно-гнойном экссудате, а также было ли животное умерщвлено или погибло от инфекции. Индексы означают мышей: 0 — погибших от инфекции; 1—3 — с относительно тяжелыми изменениями; 4—6 — с изменениями средней тяжести; 7—9 — с минимальными патологическими изменениями и 10 — совершенно здоровых.

Полученные данные были подвергнуты вариационно-статистической обработке. Для оценки достоверности защитного действия сывороток, т. е. среднего индекса возникших у подопытных животных патологических изменений, был использован *t*-тест Стьюдента [7].

Результаты исследования

Для получения лучшего представления о результатах опытов патологические изменения, отмеченные у мышей, приведены в виде индексов в табл. 1, где отмечены также средний индекс (\bar{X}) защитного действия каждой сыворотки и достоверность этого индекса по таблице *t*-теста (*P*%).

Из таблицы следует, что в исследованном нами защитном действии сывороток наблюдаются довольно большие различия. Для того чтобы дать оценку, в какой мере патологические изменения у мышей, подвергшихся защитному действию сыворотки, отличались от изменений у кон-

трольных животных, был использован рекомендованный Броссом [6] «ридит-тест» (ridit-test — relative to an identified distribution). Цель ридит-анализа — дать каждой категории патологических изменений такую достоверную оценку тяжести патологии (ридит— Z), которая позволила бы легко сравнивать защитное действие отдельных сывороток.

Таблица 1

Защитное действие сывороток и средние индексы контрольной группы

№ сыворотки	Номера мышей										\bar{X}	t	Р%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
153	2	10	10	10	10	10	10	10	10	7	8,9	10,6	<0,1
154	9	8	3	2	3	10	10	10	10	—	7,2	6,0	<0,1
157	3	6	3	10	10	10	10	10	—	—	7,8	6,8	<0,1
158	7	7	7	2	7	10	10	10	10	10	8,0	9,8	<0,1
163	3	1	7	8	10	10	10	10	—	—	7,4	5,8	<0,1
164	0	7	2	6	2	10	10	10	10	10	6,7	5,3	<0,1
165	10	10	10	10	10	10	—	—	—	—	10,0	10,0	<0,1
166	7	10	10	7	2	7	10	10	10	—	8,1	10,0	<0,1
178	10	10	10	10	10	8	1	—	—	—	8,4	7,7	<0,1
179	0	0	0	5	7	8	10	10	10	10	6,0	4,0	<1
181	0	10	10	10	10	3	2	6	—	—	6,4	4,6	<1
182	0	5	7	8	10	10	10	10	—	—	7,5	6,0	<0,1
183	10	6	10	10	10	10	6	4	—	—	8,3	9,3	<0,1
184	8	10	10	8	10	10	10	10	—	—	9,5	29,0	<0,1
185	10	10	10	10	9	10	10	4	10	10	9,3	15,5	<0,1
186	10	4	6	3	10	10	10	10	10	5	7,8	8,4	<0,1
187	0	10	4	2	6	5	10	7	4	8	5,6	5,6	<0,1
189	10	5	4	8	10	10	9	9	—	—	8,1	9,8	<0,1
190	10	10	6	10	10	10	7	9	—	—	9,0	16,0	<0,1
Контрольная	0	0	0	5	9	2	6	3	5	4	3,4	3,6	<1

Принимая во внимание, что в отечественной литературе не удалось найти работ, в которых при вариационно-статистической обработке экспериментальных данных был бы использован ридит-тест, ниже приводится описание этого метода.

В качестве основы для базового распределения ридит-анализа, с которым сравнивалось действие сывороток, использовались патологические изменения, возникшие у мышей контрольной (базовой) группы. При этом патологические изменения, установленные у этих животных, были разбиты, согласно приведенным выше индексам, на следующие категории:

Категория патологических изменений	Индекс	Условное обозначение
Без изменений	10	Б
Минимальные изменения	7—9	М
Изменения средней тяжести	4—6	С
Тяжелые изменения	1—3	Т
Погибли вследствие инфекции	0	Л

Ридит базового распределения был вычислен согласно данной Броссом [6] схеме:

В графе 1 отмечали количество контрольных животных (n) по каждой категории патологических изменений.

В графе 2 отмечали половину (50%) количества контрольных животных по каждой категории патологических изменений ($\frac{n}{2}$).

В графу 3 против каждого ряда категории патологических изменений вписывали сумму подопытных животных по всем предыдущим категориям с более легкими патологическими изменениями (например, соответствующее число для категории «тяжелые патологические изменения» — $n_B + n_M + n_C$).

В графу 4 вписывали сумму чисел из граф 2 и 3 [например, для категории «тяжелые патологические изменения» — $\frac{n_T}{2} + (n_B + n_M + n_C)$].

В графе 5 получали ридит каждой категории патологических изменений (Z_B), деля число в графе 4 на общее количество животных (N) контрольной группы.

Средний ридит базовой группы (\bar{Z}_B) в пределах точности вычисления всегда равен 0,5. Описанным способом получали следующие ридиты (Z_B) категорий патологических изменений базовой группы:

Категория патологических изменений	Условное обозначение	1	2	3	4	5
		n	$\frac{n}{2}$		(2)+(3)	$Z_B = \frac{(4)}{N}$
Без изменений	Б	0	0	0	0	0
Минимальные изменения	М	1	0,5	0	0,5	0,05
Изменения средней тяжести	С	4	2	1	3	0,3
Тяжелые изменения	Т	2	1	5	6	0,6
Погибли вследствие инфекции	Л	3	1,5	7	8,5	0,85

На основе ридитов категорий патологических изменений базовой группы вычисляют средний ридит (Z_x) защитного действия каждой сыворотки.

Из данных табл. 2 видно, что разность средних ридитов (Z_x) всех сывороток и среднего ридита контрольной группы (Z_B) превышала 0,18, т. е. средняя граница пределов достоверности контрольной группы была больше чем $\left(\frac{1}{\sqrt{3N}}\right)$. На основании этого можно сказать, что все исследованные нами сыворотки оказывали защитное действие при экспериментальном заражении штаммом *T. vaginalis*, причем действие это было неодинаково. По средним ридитам можно было подразделить сыворотки на две группы. Первую группу составляют 11 сывороток с выработанными защитными свойствами (сыворотки № 153, 158, 165, 178, 183, 184, 185, 186, 189 и 190), средние ридиты которых (0—0,113) значительно отличались от среднего ридита (0,5) контрольной группы. При рассмотрении характера патологических изменений у подопытных животных, которым вводили сыворотки первой группы, выясняется, что у 62 из 94 мышей экспериментальное заражение *T. vaginalis* не вызвало никаких патологических изменений, тогда как у 20 мышей было установлено наличие минимальных, у 8 мышей средних и только у 4 мышей тяжелых изменений. Гибели мышей, которым вводили сыворотки первой группы, в течение проведения опытов не наблюдали.

Вторую группу составляют 8 сывороток с относительно менее выраженными защитными свойствами (сыворотки № 154, 157, 163, 164, 179, 181, 182 и 187), средние ридиты которых (0,156—0,295), хотя и были больше средних ридитов сывороток первой группы, но все же были значительно меньше средних ридитов контрольной группы.

Таблица 2

Средние ридиты защитного действия
сывороток

№ сыворотки	Количество мышей (N)	Количество мышей по категориям патологических изменений					Общий ридит (Z_x)	Средний ридит $\bar{Z}_x = \frac{Z_x}{N}$
		Б	М	С	Т	Л		
153	10	8	1	—	1	—	0,65	0,065
154	9	4	2	—	3	—	1,9	0,211
157	8	5	—	1	2	—	1,5	0,188
158	10	5	4	—	1	—	0,8	0,08
163	8	4	2	—	2	—	1,3	0,162
164	10	5	1	1	2	1	2,4	0,24
165	6	6	—	—	—	—	0	0
166	9	5	3	—	1	—	0,75	0,083
178	7	5	1	—	1	—	0,65	0,093
179	10	4	2	1	—	3	2,95	0,295
181	8	4	—	1	2	1	2,35	0,294
182	8	4	2	1	—	1	1,25	0,156
183	8	5	—	3	—	—	0,9	0,113
184	8	6	2	—	—	—	0,1	0,013
185	10	8	1	1	—	—	0,35	0,035
186	10	6	3	1	—	—	0,45	0,045
187	10	2	2	4	1	1	2,75	0,275
189	8	3	3	2	—	—	0,75	0,094
190	8	5	2	1	—	—	0,4	0,05
Контрольная	10	—	1	4	2	3	5,0	0,5

Из 71 подопытного животного, которым вводили сыворотки этой группы, 32 мыши остались здоровы, у 11 возникли минимальные изменения, у 9 — изменения средней тяжести и у 12 — тяжелые патологические изменения. Погибло вследствие инфекции всего 7 мышей.

Для выяснения возможной связи результатов теста серопротекции и реакции связывания комплемента с изученными сыворотками, была поставлена реакция связывания комплемента. Необходимый для этого антиген был изготовлен из того же штамма *T. vaginalis*, который был использован для заражения животных. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Из таблицы видно, что между результатами защитного действия сывороток и реакцией связывания комплемента связи нет. Защитное действие проявлялось даже у сывороток, дававших с использованным антигеном отрицательную реакцию связывания комплемента.

Связи между выраженностью защитного действия исследованных сывороток и клинической формой трихомоноза, а также продолжительностью инфекции и возрастом пациентов установлено не было.

Несмотря на то, что причин различий в силе действия сывороток установить не удалось, результаты, полученные с помощью серопротекции, служат еще одним убедительным доказательством возникновения специфических антител при трихомониазе уrogenитального тракта.

Таблица 3

Результаты теста серопротекции и реакции связывания комплемента (РСК)

№ сыворотки	Возраст больных (в годах)	Клиническая форма кольпита	Результаты РСК	Средний ридит защитного действия сыворотки	Группа сыворотки
153	48	Хронический	++++	0,065	I
154	31	„	+++	0,211	II
157	53	„	++	0,188	II
158	33	„	++++	0,08	I
163	32	Подострый	++++	0,162	II
164	25	„	++++	0,24	II
165	33	Хронический	++++	0	I
166	29	„	++++	0,083	I
178	20	„	+++	0,093	I
179	38	„	++	0,295	II
181	28	Подострый	++++	0,294	II
182	54	Хронический	+++	0,156	II
183	39	„	++++	0,113	I
184	32	„	++	0,013	I
185	54	„	++++	0,035	I
186	50	„	+++	0,045	I
187	25	„	(—)	0,275	II
189	59	„	(—)	0,094	I
190	27	„	(—)	0,05	I

В будущем необходимо наряду с изучением других иммунобиологических реакций исследовать зависимость защитного действия сывороток от течения трихомониаза. Несомненный интерес представляет также изучение при помощи теста серопротекции вопросов, связанных с инфективностью и эпидемиологией трихомониаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Терас Ю. Х., Экспериментальное исследование патогенности *Trichomonas vaginalis*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Тарту, 1954.
2. Терас Ю. Х., О выращивании *Trichomonas vaginalis* в чистых культурах. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1955, 8, 64—66.
3. Терас Ю. Х., О действии некоторых лекарственных веществ на вагинальную трихомонаду. Сообщение II. О действии осарсола, саназина и комбинации их *in vivo*. Изв. АН ЭССР, сер. биол., 1958, 1, 3—9.
4. Терас Ю. Х., О действии саназина на *Trichomonas vaginalis in vitro* и *in vivo*. Антибиотики, 1959, 2, 66—69.
5. Baba, H., Studies on *Trichomonas*. II. Morphological Studies on *T. gallinae*, *T. foetus* and *T. vaginalis* Growing *in vitro* and *in vivo*. Japan J. Med. Progr., 1957, 44, 11, 609—621.

6. Bross, D. J., How to Use Redit Analysis, Biometrics, 1958, 14, 1, 18—38.
7. Fisher, R. A., Statistical Methods for Research Workers, 12th Ed. London, 1954.
8. Kelly, D., Schumacher, A., Schnitzer, R., Experimental Studies in Trichomoniasis. III, Influence of the Site of the Immunity of Mice to Homologous Reinfection by Different Routes. J. Immunol., 1954, 73, 1, 40—43.

Институт экспериментальной и клинической медицины Поступила в редакцию
Академии наук Эстонской ССР 13. IX 1960

UROGENITAALTRAKTI TRIHHOMONIAASI PÕDEVATE HAIGETE VERE- SEERUMI KAITSETOIMEST *TRICHOMONAS VAGINALIS*'E KULTUURIDEGA INTRAPERITONEAALSELT INFITSEERITUD VALGETEL HIIRTEL

J. Teras,
meditsiinikandidaat

Resüme

Urogenitaaltrakti trihhomoniaasi korral organismis tekkivate antikehade trihhomonatsiidse toime ja selle infektsiooni immunoloogia lähemaks selgitamiseks uuriti urogenitaaltrakti trihhomoniaasi põdevalt 19 haigelt saadud vereseerumi kaitsetoimet valgetel hiirtel *T. vaginalis*'e eksperimendaalse nakkuse puhul.

Iga uuritava seerumi kaitsetoime määramiseks süstiti 8—10 hiirele intraperitoneaalselt 0,5 ml seerumit. 30 minutit pärast seerumi süstimist infitseeriti hiired intraperitoneaalselt «TV-1» söötmes kultiveeritud *T. vaginalis*'e puhaskultuuridega. Infitseerimiseks kasutati tüve, mis oli isoleeritud akuutset trihhomonaalset kolpiiti põdevalt haigelt. Igale hiirele süstiti 0,5 ml kultuuri, mis sisaldas 1 ml-s 4 miljonit alglooma, s. o. 2 miljonit alglooma. Katseloomi jälgiti 20 päeva ja pärast seda surmati ellujäänud hiired eeternarkoosiga. Sedasama tehti kontrollhiirtega.

Töö tulemustest selgus, et kõik uuritud seerumid avaldasid *T. vaginalis*'e eksperimendaalse nakkuse puhul kaitsetoimet. Kasutades tulemuste analüüsimisel variatsioonstatistilisi meetodeid ilmnes, et seerumite kaitsetoime tugevus polnud kaugelki ühesugune. Seerumite kaitsetoime erinevusi hinnati Bross'i [6] ridit-testi alusel, kusjuures selgus, et uuritud seerumid jagunesid kahte rühma. Esimese rühma moodustasid üksteist tugeva kaitsetoimega seerumid (keskmised riditid 0—0,113). Katseloomadel, kellele neid süstiti, ei põhjustanud *T. vaginalis* enamikel juhtudel patoloogilisi muutusi üldse või need olid minimaalsed. Teise rühma kaheksa seerumi kaitsetoimed (keskmised riditid 0,156—0,295) olid küll märksa nõrgemad, kuid võrreldes kontrollrühma katseloomadega (keskmine ridit 0,5) olid patoloogilised muutused ka neil protekteeritud hiirtel tunduvalt väiksemad. Mingit seost seerumite kaitsetoime ja komplemendi sidumisreaktsiooni tulemuste vahel ei esinenud. Samuti ei olnud seost uuritud seerumite kaitsetoime tugevuse, trihhomoniaasi kliinilise vormi, infektsiooni kestuse ja patsientide vanuse vahel.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
13. IX 1960

ON THE PROTECTIVE EFFECT OF THE BLOOD SERA OF PATIENTS WITH
TRICHOMONIASIS OF THE GENITO-URINARY TRACT ON WHITE MICE
INFECTED INTRAPERITONEALLY WITH CULTURES
OF *TRICHOMONAS VAGINALIS*

J. Teras

Summary

In order to investigate the trichomonocidal effect of antibodies which have arisen in the organism during the trichomoniasis of the genito-urinary tract and to elucidate closer the immunology of this infection, the protective effect of the blood sera taken from 19 patients with trichomoniasis has been studied on white mice infected experimentally with *T. vaginalis*.

To check the protective effect of each serum 0.5 ml of it was injected to 8-10 mice intraperitoneally. 30 minutes after the injection the mice were inoculated intraperitoneally with bacteriophage-free cultures of *T. vaginalis* cultivated in "TV-1" culture media. For the inoculation a strain isolated from a patient with an acute trichomonas colpitis was used. Each mouse was inoculated with 0.5 ml of culture containing 4 million flagellates per 1 ml. The test animals remained under observation for 20 days, after which period both the protected animals and the controls were killed and dissected.

As the result of the test it appeared that all the checked sera had a certain protective effect in the experimental infection by *T. vaginalis*. Using variational statistic methods, it was possible to determine that the protective effect of the investigated sera was far from being equal. On the basis of Bross' rident test [6] it was found that the sera could be divided into two groups. The first comprised 11 sera with a high protective effect (average ridents 0 to 0.113). In the animals injected with the sera of that group, *T. vaginalis* did not usually cause any pathologic changes at all, or they were very slight. The protective effect of the eight sera belonging to the second group (average ridents 0.156 to 0.295) was much weaker than that of the first group, but compared with the controls (average rident 0.5), the pathologic changes in the protected mice were slighter. There was no link between the protective effect of the investigated sera and the results of the complement fixation. Neither was there any connection between the degree of the protective power and the clinical form of trichomoniasis, the duration of the infection or the age of the patients.

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,
Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
Sept. 13th, 1960