

Zygmunt HENCNER i Maria TUSZKIEWICZ

Odczyn Middlebrooka i Dubosa w diagnostyce twardzieli

Реакция Мидльбруна и Дюбоса в диагностике склеромы

The Middlebrook-Dubos Test in the Diagnosis of Rhinoscleroma

Middlebrook i Dubos ogłosili w r. 1948 (1) pracę, w której, wykorzystując zdolność adsorpcji różnych substancji na krwinkach czerwonych, podali technikę nowego odczynu serologicznego. Polega on na aglutynacji przeciwciał w surowicy chorego ze swoistym antygenem adsorbowanym na krwinkach. Odczyn ten znalazł, mimo kilku krytycznych prac, szerokie zastosowanie w rozpoznawaniu gruźlicy (2, 3, 4, 5).

Ponieważ technika tego odczynu jest bardzo prosta, próbowano ją zastosować w całym szeregu chorób, obok innych badań dodatkowych, ułatwiających rozpoznanie kliniczne w durze brzuszonym (8), w durze plamistym (6), w czerwonce (7) w paradurach (8), w brucelozie (9).

Podjęliśmy próbę zastosowania odczynu Middlebrooka i Dubosa (M. D.) w diagnostyce twardzieli. W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy dotąd żadnych danych o tego rodzaju doświadczeniach.

Rozpoznanie twardzieli opiera się:

- 1) na rozpoznaniu klinicznym,
- 2) na wyhodowaniu szczepu z materiału pobranego z nosa lub gardzieli,
- 3) na odczynie wiązania dopełniacza z surowicą chorego,
- 4) na odczynie aglutynacyjnym z zawiesinami pałeczek twardzieli pozbawionymi otoczek.

Otrzymanie form bezotoczkowych jest metodą żmudną i kłopotliwą, tak że w większości pracowni stosuje się odczyn wiązania dopełniacza jako jedyną metodę serologicznego rozpoznania twardzieli (10).

Odczyn wiązania dopełniacza jest odczynem swoistym, występującym już w początkowych okresach choroby, nawet przed wystąpieniem objawów klinicznych i zmian anatomicznych. Oddaje on duże usługi, gdy chodzi o wykrycie początkowych postaci utajonych wśród osób z otoczenia chorego. Jest dodatni według Zarickiego (cyt. wg Kuryłowicza (10)) w 94% przypadkach nieleczonych, a w 28% przypadkach leczonych.

Celem naszej pracy było przebadanie czy odczyn Middlebrooka i Dubosa (MD) pozwoli w większym odsetku przypadków twardzieli potwierdzić rozpoznanie kliniczne, szczególnie w przypadkach leczonych.

MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał nasz pochodził z Kliniki Otolaryngologicznej Akademii Medycznej w Lublinie i z ekspedycji zorganizowanych przez Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi* na terenie powiatów Biała Podlaska i Lubartów, woj. lubelskiego.

Metodyka pracy

Odczyn wiązania dopełniacza (OWD) wykonywano według obowiązującej instrukcji PZH.

Odczyn hemaglutynacji — sporządzanie antygeny do odczynu M.D. (11). Na płytkę agarową kładziono wilgotny celofan wyjałowiony przez gotowanie. Posiewano gęsto bakterie na powierzchni celofanu i wstawiano płytki na 48 godz. do ciepłarki o temperaturze 37°C. Następnie usuwano celofan i przemywano każdy w 5 ml roztworu fizjologicznego soli. Zawiesinę umieszczano na 2 godziny w łaźni wodnej o temperaturze 100°C, potem wirowano przy 4000 obrotów na minutę. Dodawano 3 części 95% etanolu do płynu znad osadu i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 24 godz. Po odwirowaniu suszono osad w 80°C otrzymując białawy proszek. Przechowywano go przez kilka tygodni w temperaturze pokojowej. 0,5 g suchego proszku w miarę potrzeby rozpuszczano w 5 ml roztworu fizjologicznego soli. Odwirowywano części nierozpuszczone, następnie płyn miareczkowano, opłaszczając krwinki ludzkie grupy „0” wzrastającymi rozcieńczeniami płynu.

Zawiesinę krwinek opłaszczonych sprawdzano z dodatnią w OWD surowicą chorego. W ten sam sposób sporządzano antygeny z pałeczek *Klebsiella Friedländeri* i *Staphylococcus aureus haemolyticus*, które służyły do sprawdzenia swoistości odczynu.

Opłaszczanie: jedną część przemytych, zapakowanych krwinek ludzkich grupy „0” dodawano do 20 części zawiesiny antygenowej bakterii (wg miana). Zostawiano przez 1 godzinę w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie krwinki odwirowywano i dwukrotnie przemywano roztworem fizjologicznym soli.

* Panu Prof. Dr. B. Dylewskiemu oraz Inst. Med. Pracy i Higieny Wsi uprzejmie dziękujemy za pozwolenie wykorzystania materiałów klinicznych.

Hemaglutynacja. Sporządzano w dwóch szeregach, geometryczne rozcieńczenia surowicy badanej w ilości 0,5 ml i dodawano 0,5 ml 2% zawiesiny opłaszczonych krwinek do jednego szeregu i 2% zawiesiny krwinek nieopłaszczonych do drugiego szeregu. Następnie wstawiano na 2 godziny do cieplarki o temperaturze 37°C. Pozostawiano następnie w ciągu 18 godzin w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytywano wstrząsając lekko próbkę.

WYNIKI BADAŃ

Przebadano 187 surowic, w tym 52 od chorych leżących w Klinice Otolaryngologicznej Akademii Medycznej w Lublinie, 66 surowic od osób podejrzanych o twardziel (z ekspedycji), 11 od chorych z dodatnim odczynem Wassermanna, 4 od chorych z dodatnim odczynem Widala, 9 od chorych na anginę paciorkowcową i 45 od osób klinicznie zdrowych.

Za niewątpliwe przypadki twardzieli uważano te, u których z wydzieliny nosa czy krtani wyhodowano pałeczkę twardzieli i te, u których OWD był dodatni.

Tab. 1 obejmuje zestawienie porównawcze między wynikami wiązania dopełniacza, a odczynem hemaglutynacji MD.

Tab. 2 obejmuje zestawienie wyników odczynu hemaglutynacji wykonanego z antygenem swoistym z pałeczek *Kl. scleromatis*, z antygenem z pałeczek *Kl. pneumoniae* i z antygenem sporządzonym ze *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z 52 surowic chorych z klinicznym rozpoznaniem twardzieli 22 były dodatnie w OWD *, 37 dodatnich w odczynie hemaglutynacji.

Ponieważ ilość wyhodowanych szczepów od tych samych chorych wynosiła 11 (na 29 badanych wymazów) w tym zgodnych z OWD 6, niezgodnych 5, ilość „pewnych” przypadków twardzieli wynosi 27. Wszystkie te przypadki w odczynie hemaglutynacji MD były dodatnie.

Od osób z ekspedycji w pow. Biała Podlaska i Lubartów surowice były dodatnie w odczynie wiązania dopełniacza w 34 przypadkach, wyhodowano 14 szczepów z tego materiału (na 66 badanych wymazów), zgodnych z dodatnim OWD 11.

Rozpoznanie twardzieli należało wobec tego przyjąć jako pewne w 37 przypadkach.

* Stosunkowo małą ilość dodatnich odczynów można wytłumaczyć tym, że chorzy byli leczeni streptomycyną, która obniża miana przeciwciał w surowicach (Zakrzewska 12).

Odczyn hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa

Odczyn Bordet — Bengou

Tab. 1.

Surowice badane	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Ogółem		Ogółem								
								dodatnich	ujemnych	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	dodatnich	ujemnych	Razem
I grupa	4	11	2	2	3	—	—	22	30	52	9	14	10	4	—	37	15	52
Surowice chorych z rozpoznaniem klinicznym twardzieli z Kliniki Otolaryn. A.M.																		
II grupa	1	—	—	—	—	—	—	1	10	11	1	—	—	—	—	1	10	11
Surowice chorych a) z dodatnim odczynem Wassermann w kier. kiły																		
b) z dodatnim odczynem Widala w kier. tyfusu brzuszno-go	1	—	—	—	—	—	—	1	3	4	—	—	—	—	—	—	4	4
c) na anginę paciorkowcową	2	—	—	—	—	—	—	2	7	9	—	—	—	—	—	—	9	9
III grupa	11	17	6	—	—	—	—	34	32	66	12	14	9	2	—	37	29	66
Surowice osób podejrzanych klinicznie o twardziel z eksped. w pow. B. L.																		
IV grupa	1	1	—	—	—	—	—	2	43	45	5	—	—	—	—	5	40	45
Razem	20	29	8	2	3	—	—	62	125	187	27	28	19	6	—	80	107	187

Tab. 2. Odczyn hemaglutynacji Middlebrooka i Dubosa

Surowice badane	antygen z Kl. scleromatis.					antygen z Kl. pneumoniae.					antygen z grup. antigen.					Razem				
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	dotychczas	ogółem
I grupa	9	14	10	4	—	37	15	52	3	—	—	3	49	52	—	—	—	—	52	52
Surowice chorych z rozpoznaniem klinicznym twardzieli z Kliniki Otolaryng. A. M.																				
II grupa	1	—	—	—	—	1	10	11	—	—	—	—	11	11	—	—	—	—	11	11
Surowice chorych a) z dodatnim odczynem Wassermannu w kier. kłty																				
b) z dodatnim odczynem Widala w kier. tyfus brzuszny	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	—	—	4	4	—	—	—	—	4	4
c) na anginę paciorkowca	—	—	—	—	—	—	9	9	—	—	—	—	9	9	—	—	—	—	9	9
III grupa	12	14	9	2	—	37	29	66	3	—	—	3	63	66	1	—	—	1	65	66
Surowice osób podejrzanych klinicz. o twardziel z eksped. w pow. B. L.																				
IV grupa	5	—	—	—	—	5	40	45	—	—	—	—	45	45	1	—	—	1	44	45
Surowice osób zdrowych																				
Razem	27	28	19	9	—	80	107	187	6	—	—	6	181	187	3	—	—	3	184	187

Odczyn hemaglutynacji MD był dodatni w 37 przypadkach, obejmując 34 przypadki z dodatnim OWD i 3 przypadki, w których wyhodowano pałeczkę *Kl. scleromatis* przy ujemnym OWD.

W innych chorobach (1 surowica z dodatnim odczynem Wassermanna, 1 z dodatnim odczynem Widala i 2 od chorych na anginę) surowice były dodatnie w OWD z pałeczką twardzieli, ale tylko surowica kiłowa dawała dodatni odczyn hemaglutynacji MD, 2 surowice osób zdrowych były dodatnie w OWD, 5 w odczynie hemaglutynacji MD.

Odczyn hemaglutynacji wykonany z wszystkimi surowicami z 3 antygenami (Tab. 2) potwierdza swoistość reakcji zachodzącej między antygenem sporządzonym z pałeczek twardzieli, a surowicami badanymi.

Z antygenem heterologicznym tylko 6 surowic zareagowało w niskim rozcieńczeniu (1 : 16) z antygenem z pałeczki *Kl. pneumoniae* i 3 z antygenem *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

Za kontrole dodatnie służyły surowice królików uodpornionych pałeczką *Kl. pneumoniae* i *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

WNIOSKI

Z zestawień ujętych w tab. 1 i 2 wynika:

1. Odczyn hemaglutynacji MD z zawiesiną pałeczek twardzieli jest odczynem czulszym od odczynu wiązania dopełniacza.
2. Swoistość jego jest może nieco mniejsza niż OWD.
3. Można go stosować obok OWD w bieżącej diagnostyce serologicznej twardzieli.

PIŚMIENNICTWO

- 1) Middlebrook G. i Dubos R. J.: J. of Exper. Med. 1948, 88, 521,
- 2) Hertel W., Guilbert G. D.: J. Lab. Clin. Med. 1952, 39, 426, 3) Adcock J., Haley R. R. i Danley W. N.: J. of Lab. and Clin. Med. 1951, 38, 736, 4) Lucentini L. i Boisvert H.: Ann. Inst. Pasteur 1952, 82, 55, 5) Kwapiński J.: Przegl. Lek. 1954, 4, 121, 6) Mielnikow L. A.: Woprosy Wirusol. 1957, 2, 17, 7) Chun B. i Park B.: J. Inf. Dis. 1956, 98, 82, 8) Kelman Z. N.: Ž. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol. 1949, 7, 18, 9) Sterzl J.: Časopis Lek. Českých 1952, 12, 351, 10) Kuryłowicz Wł.: Bakteriologia i Serologia twardzieli. PZWL, Warszawa 1950, 11) Milgrom F. i Świerczyńska Z.: Schweiz. Zeitsch. Allg. Pathol. Bakteriol. 1956, Separatum Vol. 19, 189, 12) Durska-Zakrzewska A.: Otolaryngologia Polska 1953, 4, 329.

РЕЗЮМЕ

Для установления, может ли реакция Мидльбрука — Дюбоса быть использована в качестве второго серологического метода при заболеваниях склеромой наряду со связыванием комплемента, было подвергнуто исследованию 187 сывороток. Несомненных случаев склеромы (положительная реакция связывания комплемента, либо выращение штамма выделенного из носоглотки) было 52, заподозренных 66, 11 с положительной реакцией WR, 4 — с положительной реакцией Видаля, 9 — со стрептококковой ангиной и 45 сывороток взятых от здоровых людей.

Для приготовления антигена авторами был применен метод, описанный Мильгромом и Сверчинской (Schw. Zeitsch. Pathol. Bakteriол. 1956, 19, 189). Таким же способом были приготовлены антигены из палочки *Klebsiella Friedländeri* и *Staph. aureus haemolyticus*, которые были авторами использованы для контроля специфичности реакции.

Таблица I представляет сравнительную сводку исследованных сывороток при помощи реакции связывания комплемента и при помощи реакции гемагглютинации.

Таблица II дает сопоставление реакции гемагглютинации, проведенной с тремя антигенами (*Klebsiella rhinoscleromae*, *Klebsiella Friedländeri* и *Staphylococcus aureus haemol.*).

Выводы: Реакция Мидльбрука — Дюбоса с антигеном склеромы, как это следует из обследованного материала, является реакцией более чувствительной (большее количество положительных реакций, чем в реакции связывания комплемента), однако несколько менее специфической (5 положительных реакций у здоровых людей).

Реакция эта может оказаться весьма полезной в качестве второго серологического метода для подтверждения клинического распознавания склеромы.

SUMMARY

To evaluate the usefulness of the Middlebrook-Dubos test as a new serological method for diagnosis of Rhinoscleroma, sera of clinically sure cases of Rhinoscleroma and of suspected persons were examined.

For preparation of the antigen the method published by F. Milgrom and Zdz. Świerczyńska was used. As controls were used antigens from *Kl. Friedländeri* and *Staph. aureus haemol.* prepared in the same way. Human erythrocytes (group 0,Rh—) were mixed with 20 parts of an antigen suspension (according to the titer) and incubated for 1 hour at 37°C, then centrifugated and twice washed in physiological saline solution. Two series of twofold dilutions of the tested serum were made and a 2% suspension of coated erythrocytes was added to one series and of non-coated erythrocytes to the second one. The time of incubation was 2 hours at 37°C and 18 hours at room temperature.

Serum of 187 persons was examined including 52 Rhinoscleroma patients of the Otolaryngological Department, 66 of Rhinoscleroma suspected persons, 11 of WR positive cases, 4 Widal positive cases, 9 patients with streptococcal angina and 45 healthy persons.

Table I shows the comparison of the results of the complement fixation test and the Middlebrook-Dubos test.

Table II contains the results of haemagglutination performed with 3 antigens (*Kl. rhinoscleromae*, *Kl. Friedländeri* and *Staph. aureus haemol.*).

Conclusions.

The haemagglutination test with Rhinoscleroma seems to be more sensitive but somewhat less specific than the complement fixation test. It can be useful in the serological diagnosis of Rhinoscleroma besides the complement fixation test.