

## EKSPERIMENTIŠKAI *TOXOPLASMA GONDII* PARAZIT AIS UŽKRĖSTŲ TRIUŠIŲ KRAUJO SUDĖTIES IR LEUKOCITŲ FORMULĖS POKYČIAI

Artūras Stimbirys

Lietuvos veterinarijos akademija, Zoohigienos ir maisto produktų sanitarijos katedra,  
Tilžės g. 18, LT-3022, Kaunas; tel.: 36 26 95

**Santrauka.** Toksoplazmozė – tai plačiai paplitusi žmonių ir gyvulių liga. Šio darbo tikslas – nustatyti toksoplazmų įtaką triušių kraujo rodikliams. Eksperimentas atliktas su aštuoniais triušiais, kurie buvo suskirstyti į dvi grupes (kontrolinę ir bandomąją) po keturis kiekvienoje. Bandomiesiems triušiams į poodį suleista *Toxoplasma gondii* parazitais užsikrėtusių pelių galvos smegenų suspensijos, atskiestos santykiu 1:3. Abiejų grupių triušių kraujo rodikliai vertinti prieš triušių užkrėtimą ir praėjus 30 dienų po jo. Eksperimentiškai toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje komplekto sujungimo reakcija aptikta toksoplazmų antikūnų. Toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje, palyginti su kontroline grupe, 13,19 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) sumažėjo eritrocitų ir 31,37 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) padaugėjo leukocitų. Be to, bandomosios grupės triušių kraujyje, palyginti su kontroline grupe, 3,95% ( $p > 0,05$ ) buvo mažiau eritrocitų ir 8,27 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) daugiau leukocitų. Įvertinus abiejų grupių triušių leukocitų formulę, paaiškėjo, kad toksoplazmomis užkrėstiems triušiams buvo eozinopenija, jų kraujyje buvo jaunų neutrofilų ir 31,43 % mažiau ( $0,01 < p < 0,05$ ) neutrofilų segmentuotais branduoliais.

**Raktažodžiai:** toksoplazmozė, triušiai, kraujo tyrimas, kraujo sudėtis, leukocitų formulė.

## EFFECT OF *TOXOPLASMA GONDII* ON HAEMATOLOGICAL VALUE AND LEUCOCYTIC FORMULA OF EXPERIMENTALLY INFECTED RABBITS

**Summary.** Toxoplasmosis – is the world-wide human and animal disease. The specific aim of our work was to determine the effect of *Toxoplasma gondii* on haematological values. Eight rabbits were divided into two groups. Four rabbits subcutaneously were inoculated with mice brain 1:3 suspension prepared from *Toxoplasma gondii* infected mice. Four noninfected rabbits were used as a control. The haematological value of rabbits from both groups were determined in the beginning of the experiment and 30 days after inoculation. Antibodies against *Toxoplasma gondii* were found in the blood experimentally infected rabbits using Complement Fixation Test.

Lower values of erythrocytes [13,19 % ( $0,01 < P < 0,05$ )] and higher values of leukocytes [(31,37 % ( $0,01 < P < 0,05$ ))] were determined in peripheral blood of *Toxoplasma gondii* infected rabbits in comparison to the corresponding values of the same rabbits in the beginning of the experiment prior to *Toxoplasma gondii* inoculation. Lower values of erythrocytes [3,95 % ( $P > 0,05$ )] and higher values of leukocytes [8,27 % ( $0,01 < P < 0,05$ )] were determined in peripheral blood of *Toxoplasma gondii* infected rabbits in comparison to the corresponding values of control rabbits.

Appearance of young forms neutrophils, lower values of segmented neutrophils [31,43 % ( $0,01 < P < 0,05$ )] and also eosinopenia were determined in peripheral blood of *Toxoplasma gondii* infected rabbits blood in comparison to corresponding values of control rabbits group.

**Keywords:** toxoplasmosis, rabbits, haematological test, haematological value, leukocytic formula.

**Įvadas.** Toksoplazmoze dažnai serga daugelis šiltakraujų gyvūnų, kartu ir žmogus [1]. Šiai ligai diagnozuoti daugeliu atveju gana svarbūs yra kraujo tyrimai. Įvairiomis serologinėmis reakcijomis toksoplazmomis užsikrėtusiųjų kraujyje aptinkama specifinių antikūnų.

Tačiau kiti kraujo tyrimai dažnai padeda ne tik nustatyti ligos diagnozę, bet ir atskleisti slaptus patologinius procesus gyvulio organizme, diferencijuoti panašiais klinikiniais simptomais pasireiškiančias ligas, stebėti ligos eigą ir gydymo veiksmingumą, nustatyti prognozę, vertinti atskirų organų būklę [3]. Kraujo tyrimai tinkami ir gyvulių toksoplazmozei diagnozuoti [2, 6].

**Darbo tikslas** – nustatyti, kaip pasikeičia eksperimentiškai *Toxoplasma gondii* cistomis, gautomis iš laboratorinių pelių smegenų, užkrėstų triušių morfologinė kraujo sudėtis ir leukocitų formulė.

**Tyrimo metodai ir sąlygos.** Bandyti atrinkti 8 serologiškai neigiamai į toksoplazmozės antigeną reagavę neveisliniai, 2,5–3 kg sveriantys triušiai. Analogų principu (pagal veislę, lytį, amžių, šėrimo ir laikymo sąlygas) atrinkti triušiai suskirstyti į dvi grupes (kontrolinę ir bandomąją) po keturis kiekvienoje. Visų triušių išmatos iširtos Fiuleborno metodu. Keturių triušių išmatose buvo pavienių kokcidijų, todėl 5 dienas iš eilės visiems triušiams su geriamuoju vandeniu duota *Kokzidionol N* preparato. Praėjus 5 dienoms po paskutinės duotos preparato dozės, išmatos dar kartą parazitologiškai iširtos. Nė viename mėginyje kokcidijų neaptikta.

Po to keturi bandomieji triušiai buvo užkrėsti toksoplazmomis. Užkratui naudota *Toxoplasma gondii*

užsikrėtusių pelių galvos smegenų suspensija, santykiu 1:3 atskiesta steriliu fiziologiniu tirpalu, į kurį pridėta po 1 mg streptomicino ir 100000 VV (veikimo vienetų) penicilino 1 ml suspensijos. Triušiams į poodį ties mentėmis iš abiejų šonų suleista po 2,5 ml suspensijos. Kontrolinės grupės triušiams viskas atlikta analogiškai, tik suleista neužkrėstų pelių galvos smegenų suspensijos. Kad būtų įsitikinta, ar triušių kraujyje nėra toksoplazmų antikūnų, jų kraujas ištirtas komplekto sujungimo reakcija (KSR). *Toxoplasma gondii* cistų ieškota pelių smegenų natyvinis tepinėlius tiriant mikroskopu, matomą vaizdą padidinus 100 ir 400 kartų.

Triušių kraujo sudėties pokyčiams įvertinti jų kraujas tirtas prieš užkrėtimą ir praėjus 30 dienų po jo. Hemoglobino (Hb) kiekis kraujyje tirtas Salio būdu, eritrocitai ir leukocitai skaičiuoti Gorajjevo kamera. Tepinėlių nudažius Romanovskio-Gimzos būdu, įvertintas atskirų leukocitų grupių santykis (leukograma). Gauti rezultatai apdoroti variacinės statistikos metodais kompiuterine *Graph Pad PRISM* programa, pritaikyta mokslinių duomenų analizei. Apskaičiuoti bandomųjų ir kontrolinių grupių duomenų vidurkiai ( $\bar{X}$ ), vidurkių paklaidos ( $\pm S_x$ ) ir vidurkių skirtumo patikimumo koeficientas ( $t_d$ ). Pagal tai nustatytas vidurkių skirtumo grupėse ir tarp grupių patikimumo tikimybės laipsnis ( $p$ ). Patikimi vidurkių tikimybės laipsniai yra  $0,01 < p < 0,05$ ;  $0,01 < p < 0,001$  ir  $p < 0,001$ .

1 lentelė. Triušių kraujo rodikliai prieš užkrėtimą toksoplazmomis

Kraujo rodiklių kiekiai						
bandomosios grupės				kontrolinės grupės		
Triušiai	Hemoglobino (g/l)	Eritrocitų (mkl/ $10^{12}/l$ )	Leukocitų ( $\mu l, 10^9/l$ )	Hemoglobino (g/l)	Eritrocitų (mkl, $10^{12}/l$ )	Leukocitų ( $\mu l, 10^9/l$ )
1	164	3,39	8,0	114	3,8	5,0
2	170	3,88	7,9	120	3,08	6,0
3	158	3,82	7,5	136	2,79	10,3
4	156	3,50	12,1	170	3,51	9,1
$XV \pm S_x$	162,0 $\pm$ 3,16	3,65 $\pm$ 0,12	8,87 $\pm$ 1,08	135,0 $\pm$ 12,56	3,29 $\pm$ 0,22	6,60 $\pm$ 0,88

2 lentelė. Triušių kraujo rodikliai praėjus 30 d po užkrėtimo toksoplazmomis

Kraujo rodiklių kiekiai						
bandomosios grupės				kontrolinės grupės		
Triušiai	Hemoglobino (g/l)	Eritrocitų (mkl/ $10^{12}/l$ )	Leukocitų ( $\mu l, 10^9/l$ )	Hemoglobino (g/l)	Eritrocitų (mkl, $10^{12}/l$ )	Leukocitų ( $\mu l, 10^9/l$ )
1	140	3,0	8,6	154	3,32	5,3
2	168	3,15	11,1	120	2,71	6,6
3	146	3,3	10,6	174	2,65	6,3
4	184	3,2	8,4	188	3,85	8,4
$XV \pm S_x$	159,5 $\pm$ 10,14	3,16 $\pm$ 0,06	9,69 $\pm$ 0,7	159,0 $\pm$ 14,75	3,13 $\pm$ 0,28	7,65 $\pm$ 1,09

Atskirų grupių triušių kraujyje eritrocitų skaičius beveik nesiskyrė. Bandomosios grupės triušių kraujyje eritrocitų buvo  $3,13 \pm 0,06 \mu l / 10^{12} / l$ , o kontrolinės –  $3,13 \pm 0,28 \mu l / 10^{12} / l$  ( $p > 0,05$ ). Palyginti su pradiniais duomenimis, bandomosios grupės triušių kraujyje eritrocitų skaičius sumažėjo 13,19 % ( $0,01 < p < 0,05$ ), o kontrolinės grupės triušių kraujyje – 3,95% ( $p > 0,05$ ).

**Tyrimo rezultatai.** Prieš eksperimentą visų triušių kraujo serumą ištyrus komplekto sujungimo šaltyje (KSR) reakcija, specifinių toksoplazmų antikūnų neaptikta. Po užkrėtimo praėjus 30 dienų, visų bandomosios grupės triušių kraujyje atsirado šių antikūnų. Jų titrai įvairavo nuo 1:160 iki 1: 640 (dvių triušių titrai buvo 1:320, o kitų – 1:160 ir 1:640). Kontrolinės grupės triušių kraujyje KSR metodu toksoplazmų antikūnų neaptikta.

Palyginti su leidžiamomis didžiausiomis fiziologinės normos ribomis [3,9], prieš eksperimentą bandomosios ir kontrolinės grupės triušių kraujyje buvo padidėjęs hemoglobino kiekis ir sumažėjęs eritrocitų skaičius.

Bandomosios grupės triušių kraujyje hemoglobino buvo  $162,0 \pm 3,16$  g/l, kontrolinės grupės –  $135,0 \pm 12,56$  g/l, o eritrocitų skaičius – atitinkamai  $3,65 \pm 0,12 \mu l / 10^{12} / l$  ir  $3,29 \pm 0,22 \mu l / 10^{12} / l$  (1 lentelė).

Po užkrėtimo praėjus 30 parų, hemoglobino kiekis bandomosios grupės triušių kraujyje buvo 0,3 % didesnis negu kontrolinės grupės triušių kraujyje (2 lentelė). Palyginti su pradiniais duomenimis, užkrėstų triušių kraujyje hemoglobino kiekis sumažėjo 1,54 % (kiekvienos grupės ir tarpgrupiniai rezultatai nepatikimi –  $p > 0,05$ ).

Palyginti su kontroline grupe, bandomosios grupės triušių kraujyje leukocitų padaugėjo 31,37 %, o palyginti su pradiniais duomenimis, – 8,27 % (tarpgrupinių rezultatų patikimumas –  $0,01 < p < 0,05$ , o kiekvienos grupės rezultatų –  $0,01 < p < 0,05$ ). Kontrolinės grupės triušių šis rodiklis beveik nepakitė.

3 lentelė. Triušių kraujo leukocitų formulė prieš užkrėtimą toksoplazmomis

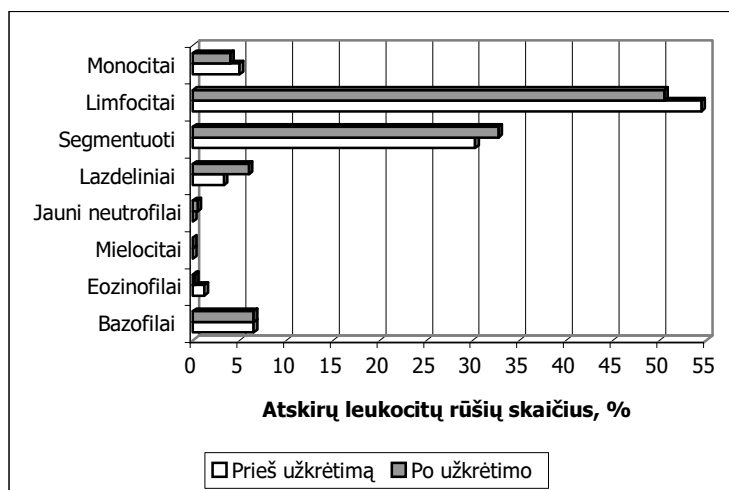
Triušiai	Kraujo leukocitų formulė																
	bandomoji grupė								kontrolinė grupė								
	B	E	Neutrofilai				Li	Mo	B	E	Neutrofilai				Li	Mo	
			M	J	L*	S*					M	J	L*	S*			
1.	14	1	-	-	4	20	55	6	5	2	-	1	1	13	72	6	
2.	3	4	-	-	4	21	67	1	2	3	-	-	3	27	62	3	
3.	3	-	-	-	-	50	40	7	8	1	-	-	3	21	65	2	
4.	6	-	-	-	2	30	56	6	6	1	-	-	3	50	29	11	
Vidurkis:	6,50±2,59	1,25±0,95	-	-	3,33±0,67	30,25±6,96	54,50±5,54	5,00±1,35	5,25±1,25	1,75±0,48	-	-	0,25±0,25	2,50±0,50	27,27±7,95	57,00±9,57	3,50±0,87

Pastaba.\*Pseudoezinoofilai (specialieji granulocitai)

4 lentelė. Triušių leukocitinė formulė, praėjus 30 parų po užkrėtimo toksoplazmomis

Triušiai	Kraujo leukocitų formulė																
	bandomoji grupė								kontrolinė grupė								
	B	E	Neutrofilai				Li	Mo	B	E	Neutrofilai				Li	Mo	
			M	J	L*	S*					M	J	L*	S*			
1	13	1	-	-	9	30	44	3	3	1	-	-	7	46	40	3	
2	4	-	-	2	10	44	38	2	2	1	-	-	14	55	20	8	
3	2	-	-	-	1	40	54	3	5	-	-	-	8	53	31	3	
4	7	-	-	-	4	17	66	6	6	3	-	-	6	44	39	2	
Vidurkis:	6,50±2,40	0,25±0,25	-	-	0,50±0,50	6,00±2,21	32,75±6,02	50,50±6,13	4,00±1,35	4,00±0,91	1,67±0,67	-	-	8,75±1,80	49,50±2,66	32,50±4,63	4,00±1,35

Pastaba.\*Pseudoezinoofilai (specialieji granulocitai)



1 pav. Užkrėstų toksoplazmomis triušių kraujo leukocitų formulės pokyčiai

Analizuojant atskirų leukocitų grupių santykį, nustatyta, kad, palyginti su fiziologine norma [3,9], prieš eksperimentą kontrolinių ir bandomųjų grupių triušių kraujyje buvo daugiau bazofilų ir monocitų, mažiau lazdelinių ir segmentuotųjų neutrofilų. Abiejų grupių triušių šie rodikliai buvo panašūs (3 lentelė).

Po 30 parų užkrėstų triušių kraujyje bazofilų buvo 38,46 % daugiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje (4 lentelė). Tačiau palyginti su pirminiais duomenimis, jis nesiskyrė, nors kontrolinės grupės triušių kraujyje bazofilų sumažėjo 20 % (1 pav.). Kiekvienos grupės ir tarpgrupinių rezultatų skirtumai nepatikimi -  $p > 0,05$ .

Užkrėstų triušių kraujyje, palyginti su kontroline grupe, eozinofilų buvo 85,03 % mažiau, o palyginti su pradiniais duomenimis, 60 % mažiau ( $p > 0,05$ ). Kontrolinės grupės triušių kraujyje eksperimento laikotarpiu eozinofilų skaičius nepakito. Trims bandomosios grupės triušiams ir vienam kontrolinės grupės triušiui nustatyta eozinopenija. Mielocitų tiek bandomosios, tiek kontrolinės grupės triušių kraujyje neaptikta. Eksperimentiškai užkrėstų triušių kraujyje buvo jaunų neutrofilų, nors prieš eksperimentą nė vienos grupės triušių kraujyje jų neaptikta. Šių leukocitų kontrolinės grupės triušių kraujyje neatsirado ir po 30 dienų. Bandomosios grupės triušių kraujyje, neutrofilų segmentuotais branduoliais buvo 31,43 % mažiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje ir 7,63 % daugiau negu prieš eksperimentą (tarpgrupinių rezultatų patikimumas -  $0,01 < p < 0,05$ , kiekvienos grupės rezultatų -  $p > 0,05$ ).

Limfocitų bandomosios grupės triušių kraujyje buvo 35,64 % daugiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje ir 7,34 % mažiau negu prieš eksperimentą (kiekvienos grupės rezultatų patikimumas -  $p > 0,05$ , tarpgrupinių rezultatų patikimumas -  $p > 0,05$ ).

Monocitų skaičius abiejų grupių triušių kraujyje, praėjus 30 dienų po užkrėtimo, buvo vienodas. Užkrėstų triušių kraujyje jų buvo 20 % daugiau negu prieš eksperimentą, nors kontrolinės grupės triušių kraujyje eksperimento laikotarpiu jis beveik nepakito (kiekvienos grupės ir tarpgrupinių rezultatų skirtumai nepatikimi -  $p > 0,05$ ).

**Rezultatų aptarimas ir išvados.** Daugelį ligų diagnozuoti padeda kraujo cheminiai, morfologinės sudėties ir atskirų leukocitų grupių santykio, išreikšto procentais (leukocitų formulės) tyrimai. Dėl anemijos, sukeltos įvairių infekcinių ir invazinių ligų, gyvulių kraujyje sumažėja hemaglobino ir eritrocitų [3]. Tai būdinga ir toksoplazmozėi [6].

Literatūros [5] duomenimis, toksoplazmozė dažnai sukelia eritrocitų hemolizę. Tai patvirtino ir mūsų atlikto eksperimento rezultatai.

Leukocitų funkcija yra saugoti organizmą nuo į jį patekusių pašalinių medžiagų ir antigenų [7]. Patekus šių medžiagų į organizmą, kraujyje padaugėja leukocitų, nes stimuliuojama mielopoiezė ir leukocitai greičiau patenka į kraują [9].

Svarbus rodiklis yra atskirų leukocitų grupių santykio, išreikšto procentais, pokyčiai leukocitų formulėje.

Vertinant atskirų leukocitų grupių santykį, pastebėta, kad nors eksperimentiškai toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje bazofilų buvo daugiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje, bet, palyginti su pradiniais duomenimis, jis nepakito. Tačiau kiti autoriai teigia [4], kad toksoplazmomis užkrėstiems triušiams nustatoma bazofilija.

Eksperimentiškai toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje eozinofilų buvo mažiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje, ir jiems nustatyta eozinopenija. Matyt, ši eozinopenija yra susijusi su eozinofilų migracija į audinius, kur vyksta imuninės reakcijos, kuriose jie dalyvauja (šalinant antigeno-antikūno kompleksą). Eksperimentiškai užkrėstų triušių kraujyje atsirado jaunų neutrofilų (vadinasi, kaulų čiulpai labiau dirginami) ir padaugėjo neutrofilų lazdeliniais branduoliais. Tačiau bandomųjų triušių kraujyje, palyginti su kontroliniais, sumažėjo neutrofilų segmentuotais ir lazdeliniais branduoliais. Leukocitų formulėje nustatytas branduolio nukrypimas į kairę.

Pastebėta, kad toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje sumažėjo limfocitų ir monocitų. Tai galima paaiškinti tuo, kad limfocitai ir monocitai yra makrofagai, kurie aktyviai dalyvauja antigeno (toksoplazmų) fagocitozės procesuose ir sąlygoja imuniteto susidarymą. Šį faktą patvirtina ir teigiama triušių KSR reakcija, kuria triušių kraujyje aptikta toksoplazmų antikūnų. Tačiau mūsų gauti duomenys, galbūt dėl per mažo gyvulių skaičiaus grupėse, buvo nepatikimi. Panašius toksoplazmomis užkrėstų gyvulių kraujo tyrimo rezultatus gavo ir kiti autoriai [8, 10]. Mes, kitaip negu V.N. Skibo [10], nenustatėme, kad eksperimentiškai toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje padaugėtų mielocitų. Mūsų gauti rezultatai tokie, matyt, gauti todėl, kad eksperimentui naudoto kamieno toksoplazmos nelabai virulentiškos. Tuo tarpu V.N. Skibo naudojo labai virulentiškų toksoplazmų RH kamieną.

**Išvados.** Eksperimentiškai toksoplazmomis užkrėstų triušių kraujyje po 30 dienų buvo:

- 1) toksoplazmų antikūnų (KSR reakcija);
- 2) 13,19 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) mažiau eritrocitų negu prieš eksperimentą ir 3,95 % ( $p > 0,05$ ) mažiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje;
- 3) 31,37 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) daugiau leukocitų negu prieš eksperimentą ir 8,27 % ( $0,01 < p < 0,05$ ) mažiau negu kontrolinės grupės triušių kraujyje;
- 4) eozinopenija, jaunų neutrofilų ir 31,43 % mažiau ( $0,01 < p < 0,05$ ) neutrofilų segmentuotais branduoliais.

#### Literatūra

1. Dubey J.P. Zoonosis – update. *Toxoplasmosis // Journal of American Veterinary Association.* 1994. Vol. 205(11) P. 1593–1598.
2. Dubey J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans // *Veterinary parasitology.* 1996. Vol. 64(2). P. 66–72.
3. Gabrielavičius V. Kraujas. Gyvulių vidaus ligų klinikinė diagnostika. V.: Mokslas, 1991. P. 231–277.
4. Malakauskas M., Januškevičienė G., Mlečkienė M. Eksperimentiškai sukelta triušių toksoplazmozė // *Žemės ūkio mokslai.* 1998. Nr. 1.P. 67–73.

5. Michelson A. D. and Lammi A. T. Haemolytic anemia associated with aquired toxoplasmosis // Austr. Paediatr. 1984. Vol. 20. 333 p.

2001 02 05

6. Lappin M.R. Feline toxoplasmosis // Waltham focus. 1994.Vol. 4(4) P. 5.

7. Stiene-Martin A., Latspeitch-Steininger C., Koepke J.A. Clinical haematology. Principles, procedures, corelations / Eddited by Anne Stiene Martin PhD Mt. (ASCP). Second edition Lippincott. Philadelphia. New York, 1998.

8. Vidotto O., Costa A.J., Balarin M.R.S et al. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observacoes clinicas e hematologicas // Arquivo Brasileiro-de Medicina-Veterinaria-e-Zootecnia. 1987.Vol.39(4). P.623-639.

9. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Минск: Урожай, 1986. 183 с.

10. Скибо В.Н. Ветеринарно-санитарная оценка мяса, полученного от свиней, больных токсоплазмозом / Авт. дисс. на соиск. уч. степ. канд. вет. наук. Минск, 1969. С.1-17.