

Ocena eozynofilii, stężenia immunoglobuliny E i eozynofilowego białka kationowego podczas leczenia toksokarozy

Estimation of eosinophilia, immunoglobulin E and eosinophilic cationic protein concentration during the treatment of toxocariasis

Małgorzata Niedworok¹, Beata Sordyl¹, Anna Borecka², Jakub Gawor², Ewa Małecka-Panas^{1,3}

¹Klinika Gastroenterologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

²Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

³Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź

Adres do korespondencji: Małgorzata Niedworok, Klinika Gastroenterologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź; E-mail: duszkan64@onet.eu

ABSTRACT. *Toxocara canis* and *Toxocara cati* do not transform in human organism into a mature form and they circulate reaching various organs and tissues causing characteristic symptoms. Activated eosinophils, which play a significant role in parasitic invasion, contain in their granules eosinophilic cationic protein (ECP) of strong pro-inflammatory activity. The aim of the study was to estimate the concentration of immunoglobulin E, peripheral blood eosinophilia and serum concentration of eosinophilic cationic protein in children treated for toxocariasis and the analysis of their value as the markers of active invasion and the therapy efficacy. The study included 45 children, aged from 3 to 18 years with *Toxocara canis* infection diagnosed for the first time. The children were diagnosed and treated at the Department of Gastroenterology, in the Outpatient Gastrointestinal and Allergologic Clinic, Institute Polish Mother Health Centre. *T. canis* larva infection was diagnosed based on serological investigation using immunoenzymatic ELISA test (Bordier Affinity Products, Switzerland). The tests (percentage of eosinophilia in peripheral blood, ECP, IgE) were performed after diagnosis and every 3 months since the beginning of the therapy. In children with toxocariasis its covert form was diagnosed and mebendazole was administered. Among the children with toxocariasis eosinophilia was found in 14 (31.1%) before therapy. Mean percentage of peripheral blood eosinophils was 5.58% in children with toxocariasis. The concentration of IgE was elevated in these children and was significantly higher than in the control group ($p=0.002$). Mean IgE concentration after 3- and 6-month therapy decreased IgE_I vs IgE_{III} ($p=0.01$), but it was still higher than normal value. In children with toxocariasis the ECP concentration was 30.19 $\mu\text{g/l}$ before the therapy and was significantly higher than in the control group ($p<0.05$); after 6 months of the therapy it decreased significantly ($p<0.05$). Eosinophilic cationic protein and eosinophilia can be the markers of *Toxocara canis* infection activity. The determination of immunoglobulin E and eosinophilic cationic protein concentration may be useful for toxocariasis therapy monitoring.

Key words: toxocariasis, eosinophilia, eosinophilic cationic protein, immunoglobulin E

Wstęp

Larwy glisty psiej i kociej (*Toxocara canis* et *cati*) w organizmie człowieka nie mają zdolności transformacji w postać dojrzałą i krążą w ustroju i docie-

rają do różnych narządów i tkanek człowieka wywołując mało charakterystyczne objawy. Mogą one zażyć od ilości spożytych larw, miejsca ulokowania się w organizmie, czasu trwania, stanu układu odpornościowego żywiciela i częstości reinfekcji [1].

Zarażenia pasożytnicze charakteryzują się przebiegiem i udziałem nieco innych mechanizmów obrony niż obserwowane w przypadku zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Szczególną rolę w zakażeniach pasożytniczych odgrywają eozynofile. Aktywowane komórki kwasochłonne posiadają w swoich ziarnistościach cztery podstawowe białka o silnym działaniu prozapalnym, wśród nich eozynofilowe białko kationowe (ECP) [2].

ECP było po raz pierwszy uzyskane z ludzkich komórek szpiku w 1971 roku i zidentyfikowane jako białko ziarnistości eozynofila w 1975 roku. ECP jest heterogennym białkiem o masie cząsteczkowej 16–24 kDa o silnym odczynie zasadowym (pH 10.8) [3]. Określanie stężenia ECP w surowicy jest bardzo przydatne w diagnostyce alergologicznej, szczególnie w monitorowaniu astmy [4–6] i efektów immunoterapii swoistej (sIT) [5]. Oznaczanie eozynofilowego białka kationowego ma również znaczenie w chorobach nieatopowych; wysokie stężenie ECP stwierdzano w początkowej fazie zawału serca z eozynopenią. W zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa surowicze ECP jest traktowane jako marker zapalenia [5]. Stwierdzano także obecność ECP w popłuczynach jelit w chorobie Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [5].

W diagnostyce toksokarozy poszukuje się metody, która pozwalałaby odróżnić sytuacje kliniczne, gdy wykrywane przeciwciała przeciw *Toxocara canis* oznaczają aktywne zarażenie od wykrywania przeciwciał pozostałych po zarażeniu i będących skutkiem poliklonalnej stymulacji limfocytów B. Ponadto brak jest skutecznej metody monitorowania leczenia toksokarozy.

Celem pracy była ocena stężenia immunoglobuliny E, eozynofilii krwi obwodowej i stężenia eozynofilowego białka kationowego w surowicy u dzieci leczonych z powodu toksokarozy i analiza ich wartości jako markera skutecznej terapii.

Material i metody

Badaniami objęto 45 dzieci w wieku od 3 do 18 lat z po raz pierwszy rozpoznaniem zarażeniem *Toxocara canis* (14 dziewczynek, 31 chłopców), a grupę porównawczą stanowiło 41 dzieci nieatopowych, wolnych od chorób pasożytniczych, w wieku od 2 do 18 lat, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciwko nicieniom (23 dziewczynki, 18 chłopców). Dzieci były diagnozowane i leczone w Klinice Gastroenterologii, w Poradni Gastroenterologicz-

nej i Alergologicznej ICZMP.

U dzieci, oprócz wywiadu podmiotowego i przedmiotowego, wykonano badania dodatkowe: morfologię krwi obwodowej, czynniki ostrej fazy (CRP i OB), badania biochemiczne (stężenie bilirubiny całkowitej, aminotransferaz alaninowej i asparaginianowej), stężenie immunoglobuliny E oraz stężenie eozynofilowego białka kationowego. Badania wykonano po wykryciu zarażenia oraz co 3 miesiące od rozpoczęcia leczenia. W leczeniu zastosowano leki w dawkach zalecanych przez producentów przy innych zakażeniach narządowych obłędami [7]. U dzieci z toksokarozą zastosowano mebendazol (Vermox, Richter Gedeon, H), podawany w dawce 15 mg/kg przez 7 dni w dawkach podzielonych podczas posiłków. Leczenie powtarzano po 3 miesiącach, u tych dzieci, u których utrzymało się dodatnie miano przeciwciał.

Zarażenie larwą glisty psiej ustalono na podstawie badania serologicznego, do którego zastosowano test immunoenzymatyczny (ELISA) firmy Bordier Affinity Products (Szwajcaria). W badaniu serologicznym oznaczano stężenie przeciwciał przeciwko antygenowi ekskrecyjno-sekrecyjnemu TESAg larwy *Toxocara canis* w klasie IgG.

Pomiaru absorbancji dokonywano przy użyciu spektrofotometru PR 2100 Sanofi firmy Pasteur przy długości fali 405 nm. Wyniki pomiarów są negatywne jeśli absorbancja analizowanej surowicy jest niższa niż kontroli słabo pozytywnej. Wyniki pomiarów są pozytywne, gdy absorbancja badanej surowicy jest wyższa niż kontroli słabo pozytywnej. Dla uproszczenia wyniki badań podane są w procentach. Wartości od 0 do 28% odpowiadają absorbancji kontroli negatywnej, od 28 do 32 % słabo pozytywnej, a od 32 do 100% kontroli pozytywnej. Za wynik potwierdzający zarażenie *Toxocara canis* uznaje się wartości od 32 do 100%.

Stężenie ECP oznaczono za pomocą testu ImmunoCAP ECP firmy Pharmacia Diagnostics przy użyciu aparatu UniCAP 100. W badaniu przeciwciała anty-ECP związane z powierzchnią ImmunoCapów wiążą się z białkiem ECP z surowicy pacjentów. Po przemyciu, dodawane są mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko ECP. W badaniu metodą fluorescencji oznaczane jest stężenie kompleksów enzym-przeciwciała przeciw ECP-ECP. Z pomocą krzywej kalibracyjnej wartości fluorescencji odczytywane są w postaci stężeń. Wartości podano w $\mu\text{g/l}$ (wartości prawidłowe 0–13,3 $\mu\text{g/l}$) [8, 9]. Stężenie immunoglobuliny E również oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu aparatu Uni-

CAP 100. Wartości prawidłowe IgE uzależnione są od wieku i wynoszą: do 3 roku życia – 5,5–17 IU/ml, do 7 lat – do 45 IU/ml, 10–14 lat – do 100 IU/ml. Wszystkie pomiary przeprowadzono w terminie 0, 3, 6 oraz 9 miesięcy od rozpoczęcia leczenia.

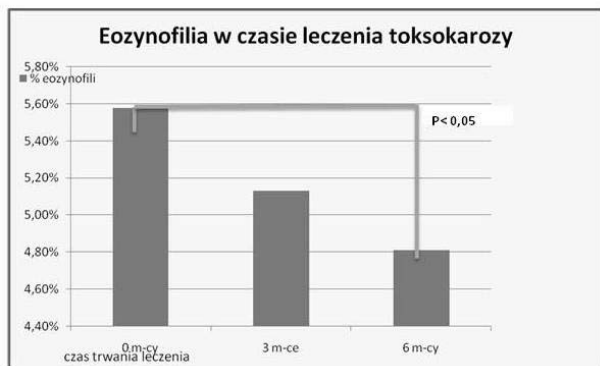
W analizie statystycznej zastosowano test kolejności par Wilcozona oraz test U- Manna-Whitneya.

Wyniki

W grupie dzieci z rozpoznaną po raz pierwszy toksokarozą było istotnie mniej – 14 (31,1%) dziewczynek niż chłopców – 31 (68,9%) ($p < 0,05$). U dzieci rozpoznano postać ukrytą toksokarozy [1]. U 35 dzieci (77,7%) obserwowano bóle brzucha. Wszystkie dzieci poddano badaniu okulistycznemu i u żadnego z nich nie stwierdzono postaci ocznej toksokarozy. W grupie dzieci zarażonych średnie miano przeciwciał przeciwko *Toxocara canis* przed rozpoczęciem leczenia wynosiło 68,57% (od 38% do 100%), po 3 miesiącach po leczeniu obniżyło się do 56,42%, po następnych 3 miesiącach do 39,67%. U 19 dzieci powtarzano leczenie i wówczas średnie miano przeciwciał obniżyło się do 33,05%, czyli blisko wartości prawidłowych.

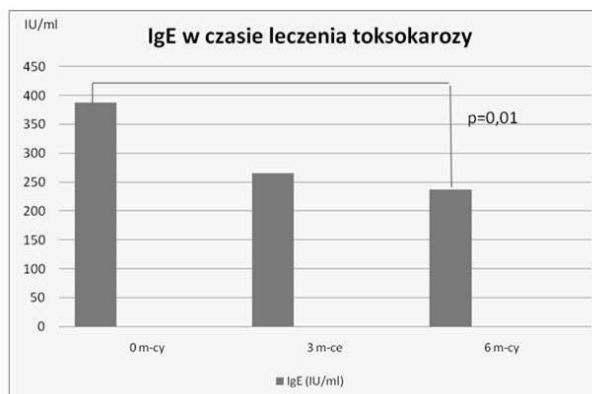
Wśród dzieci z toksokarozą przed rozpoczęciem leczenia stwierdzono eozynofilię u 14 (31,1%) dzieci. Średni odsetek eozynofili w krwi obwodowej u dzieci z toksokarozą wyniósł 5,58%. W grupie porównawczej stwierdzono eozynofilię u 4 (9,75%) dzieci, średnio eozynofilia wyniosła w grupie porównawczej 2,02% ($p < 0,05$) (Rys.1).

Średnie stężenie immunoglobuliny E (IgE) u dzieci z rozpoznaną toksokarozą przed rozpoczęciem leczenia wynosiło ($x_I=385,48$ IU/ml) i było istotnie wyższe niż w grupie porównawczej ($x=137,95$ IU/ml; $p=0,002$). Średnie stężenie IgE po



Rys. 1. Eozynofilia w czasie leczenia toksokarozy
Fig. 1 Eosinophilia during the treatment of toxocariasis

3 (IgE_{II}) i 6 (IgE_{III}) miesiącach po leczeniu zmniejszyły się odpowiednio $x_{II}=264,33$ IU/ml i $x_{III}=233,34$ IU/ml, przy czym wartość wyjściowa i po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia były istotnie różne ($p=0,01$), ale nadal znajdowało się wśród wartości wyższych niż prawidłowe (Rys. 2).



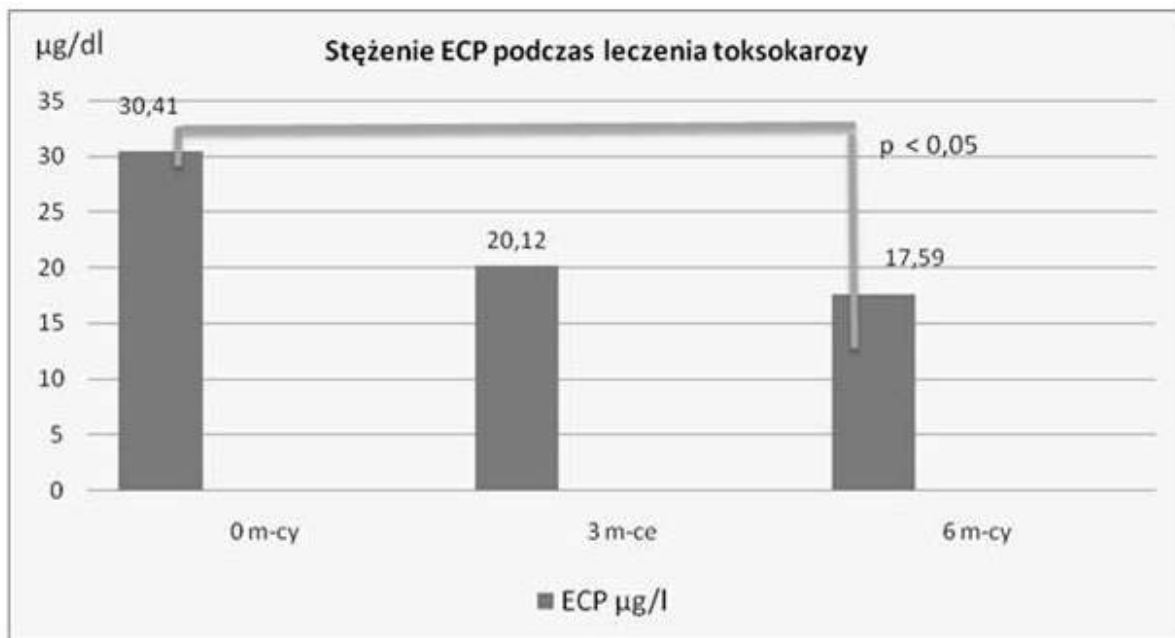
Rys. 2. IgE w czasie leczenia toksokarozy
Fig. 2. IgE during the treatment of toxocariasis

Średnie stężenie ECP u dzieci z toksokarozą przed leczeniem wyniosło 30,19 μ g/l i było istotnie wyższe niż w grupie porównawczej $p < 0,05$; po 6 miesiącach po rozpoczęciu leczenia u dzieci z toksokarozą stężenie ECP istotnie zmniejszyło się (17,59 μ g/l, $p < 0,05$) w stosunku do wartości wyjściowej (Rys. 3).

Dyskusja

Diagnostyka toksokarozy opiera się głównie na badaniu serologicznym ELISA przeciw antygenowi ES glisty psiej, co nie daje możliwości potwierdzenia aktywności zarażenia. Stąd rodzi się pytanie, kiedy obecność przeciwciał przeciw *Toxocara* wobec mało swoistych dla zarażenia objawów oznacza zarażenie czynne. Zarażenie *Toxocara* indukuje złożoną odpowiedź immunologiczną, humoralną i komórkową. Wśród najczęstszych nieswoistych zmian w badaniach laboratoryjnych stwierdzano eozynofilię [8], i podwyższone stężenie IgE [9].

W grupie pacjentów z obecnością przeciwciał w klasie IgG przeciw *Toxocara canis* oznaczono ich miano po 3 i 6, a u części po 9 miesiącach po rozpoczęciu leczenia. U 30 dzieci (66,6%) stwierdzono istotnie obniżenie średniego miana przeciwciał po tym okresie. U części dzieci (11 dzieci, 24,5%) miano przeciwciał pozostało na poziomie sprzed leczenia, a u 4 dzieci (8,8%) wzrosło w stosunku do wartości wyjściowych. Jednak miano przeciwciał



Rys. 3. Stężenie ECP podczas leczenia toksokarozy
 Fig. 3. Concentration of ECP during the treatment of toxocarosis

w klasie IgG nie wydaje się dobrym markerem wyleczenia zarażenia. Podobnie oznaczenie przeciwciał w klasie IgE i IgG4 nie wydaje się spełniać tej roli. W badaniach Magnavala i wsp. [10, 11] miano swoistych przeciwciał w klasie IgE korelowało ze stężeniem całkowitego IgE. Yahiro i wsp. [12] wykazali związek miana swoistych przeciwciał IgE z atopią i objawami alergii skórnej, co miało przemawiać za hipotezą zjawiska nadwrażliwości IgE zależnej na antygen sekrecyjno-ekskrecyjny TES-Ag. Przeciwciała w klasie IgG4 istotnie korelowały z odsetkiem eozynofili krwi obwodowej i stężenia ECP. Przeciwciała w tej klasie mają być częstsze i o wyższym mianie u tych pacjentów, którzy mają większe ryzyko zarażenia (mieszkają na wsi, gdzie jest większa szansa na powtarzające się lub/i masywniejsze zarażenie) [11].

W badaniach doświadczalnych toksokarozy u naczelnych wykazano możliwość przetrwania aktywnej larwy w tkankach ponad 10 lat mimo obniżenia się miana przeciwciał [13]. Ponadto larwa *Toxocara canis* wykazuje mechanizmy obronne przeciwko układowi immunologicznemu gospodarza pod postacią tzw. „przebierania się”, polegające na produkcji i włączaniu glikolipidów antygenów grupowych krwi człowieka w skład swojego oskórka, co powoduje zanik produkcji przeciwciał przeciw antygenowi pasożyta [14, 15]. Stąd samo obniżanie się przeciwciał przeciwko *Toxocara canis* nie może

być oznaką eliminacji larwy glisty psiej z organizmu gospodarza.

Eozynofilia jest obserwowana we krwi i tkankach zarażonych larwą glisty psiej od czasu opisanego toksokarozy w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku. Stwierdzono również, że zaledwie 5 jaj glisty psiej wymaganych jest do wywołania hypereozynofilii w doświadczalnej toksokarozy u myszy. Jednak wraz z czasem trwania zarażenia odsetek komórek kwasochłonnych zmniejsza się [16]. W grupie dzieci ze stwierdzonymi przeciwciałami przeciwko *Toxocara canis* stwierdzono istotne różnice odsetka komórek kwasochłonnych w stosunku do grupy porównawczej. Po 6 miesiącach po leczeniu obserwowano istotne obniżenie się eozynofilii w stosunku do okresu przed leczeniem, co może wskazywać na mniejszą stymulację produkcji komórek kwasochłonnych wraz z obniżaniem się miana przeciwciał przeciw *T. canis*.

Podwyższony poziom IgE stwierdza się w chorobach atopowych, a także u pacjentów z alergiczną aspergilozą płucną, w szpiczaku produkującym IgE, w niektórych niedoborach immunologicznych i chorobach pasożytniczych [17]. O ile w alergii atopowej IgE stanowi ogniwo procesu chorobowego to w zakażeniach pasożytniczych IgE pełni funkcje protekcyjne biorąc udział w zwalczaniu przez organizm pasożytów [18]. Indukowane przez obecność pasożyta podwyższone stężenie całkowitej immu-

noglobuliny E jest skutkiem poliklonalnej stymulacji limfocytów B, a w konsekwencji duża część frakcji nowo produkowanej IgE jest nieswoista dla pasożyta [18]. Jednak w grupie badanych dzieci z obecnymi przeciwciałami przeciwko *Toxocara canis* stwierdzono istotnie wyższe stężenie IgE w stosunku do grupy porównawczej. Zmniejszenie stężenia tej immunoglobuliny obserwowano po 6 miesiącach po leczeniu ($p=0,01$), co mogłoby być jednym ze wskaźników wyleczenia.

Stężenie surowiczego ECP było badane w niektórych chorobach pasożytniczych. Jego podwyższenie stwierdzono w filariozie i schistosomatozie [19], ale również u pacjentów z toksokarozą [10]. Podobne zjawisko obniżania się ECP wraz ze zmniejszaniem się liczby i aktywności eozynofiliów obserwowane jest w alergicznej reakcji zapalnej [20, 21].

W naszych badaniach stwierdzono w grupie dzieci z przeciwciałami przeciw *Toxocara canis* znamienne podwyższone stężenie ECP w stosunku do grupy porównawczej. Po 6 miesiącach po leczeniu obserwowano istotne obniżenie stężenia ECP w stosunku do okresu przed rozpoczęciem leczenia.

Eozynofilowe białko kationowe i eozynofilia mogą być markerami aktywności zarażenia *Toxocara canis*. Oznaczenie stężenia immunoglobuliny E i eozynofilowego białka kationowego może być przydatne podczas monitorowania leczenia toksokarozy.

Literatura

- [1] Pawłowski Z. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology* 75: 299–305.
- [2] Venge P., Dahl R., Fredens K., Hällgren R., Peterson C. 1983. Eosinophil cationic protein (ECP and EPX) in health and disease. In: *Immunobiology of the eosinophil*. (Eds. T. Yoshida, M. Torisu). Elsevier Biomedical, New York: 163–179.
- [3] Venge P., Byström J. 1998. Eosinophil cationic protein (ECP). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30: 433–437.
- [4] Fujisawa T., Terada A., Atsuta J., Iguchi K., Kamiya H., Sakurai M. 1998. Clinical utility of serum levels of eosinophil cationic protein (ECP) for monitoring and predicting clinical course in childhood asthma. *Clinical Experimental Allergy* 28: 19–25.
- [5] Mędrala W., Wolańczyk-Mędrala A. 1996. Diagnostyka chorób alergologicznych *in vitro*. W: *Choroby alergiczne i astma*. (Red. J. Małolepszy). Volumed, Wrocław: 483–508.
- [6] Motojima S., Tateishi K., Koseki T., Makino S., Fukuda T. 1997. Serum levels of eosinophil cationic protein and IL-5 in patients with asthma without systemic corticosteroids. *International Archives Allergy and Immunology* 114: 55–59.
- [7] Magnaval J.F. 1995. Comparative efficacy of diethylcarbamazine and mebendazole for the treatment of human toxocariasis. *Parasitology* 110: 529–533.
- [8] Beaver P.C. 1956. Larva migrans. *Experimental Parasitology* 5: 587–621.
- [9] Magnaval J.F., Baixench M.T. 1993. Toxocariasis in Region Midi-Pyrenees, France. In: *Toxocara and toxocariasis. Clinical, epidemiological, and molecular perspectives*. (Eds. J.W. Lewis, R.D. Maizels). Institute of Biology and British Society for Parasitology, London: 83–87.
- [10] Magnaval J.F., Berry A., Fabre R., Morrasin B. 2001. Eosinophil cationic protein as a possible marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy* 56: 1096–1099.
- [11] Magnaval J.F., Faufigue J.H., Morassin B., Fabre R. 2006. Eosinophil cationic protein, specific IgE and IgG4 in human toxocariasis. *Journal of Heminthology* 80: 417–423.
- [12] Yahiro S., Cain G., Butler J.E., 1998. Identification, characterization and expression of *Toxocara canis* nematode polyprotein allergen TBA-1. *Parasite Immunology* 20: 351–357.
- [13] Bass J.L., Mehta K.A., Glickman L., Blocker R., Epes B. 1987. Asymptomatic toxocariasis in children. *Clinical Pediatrics* 26: 441–446.
- [14] Maizels R.M. 1987. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Journal of Immunology* 139: 207–214.
- [15] Smith H.V., Kusel J.F., Girgwood R.W.A. 1983. The production of human A and B blood group-like substances by in vitro-maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence in the outer larva surfaces and their excretions/secretions. *Clinical Experimental Immunology* 54: 625–633.
- [16] Buijs J., Egbers M.C.W., Lokhorst W.C., Nijkamp F.P. 1994. *Toxocara canis* – induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Parasite Immunology* 16: 1.
- [17] Alshishtawy M.M., Abdella A.M., Gelber L.E., Chapman M.D. 1991. Asthma in Tanta, Egypt: serologic analysis of total and specific IgE antibody levels and their relationship to parasite infection. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 96: 348–354.
- [18] Turner K.J., Feddema L., Quinn E.H. 1979. Non-specific potentiation of IgE by parasitic infections in man. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 58: 232.
- [19] Tischendorf F.W., Brattig N.W., Burchard G.D., Kubica T., Kreuzpaintner G., Lintzel M. 1999. Eosino-

- phils, eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin in serum and urine of patients with onchocerciasis coinfecting with intestinal nematodes and in urinary schistosomiasis. *Acta Tropica* 72: 157–173.
- [20] Park Y.J., Oh E.J., Park J.W., Kim M., Han K, 2006. Plasma eosinophil cationic protein, interleukin-5, and ECP/Eo count ratio in patients with various eosinophilic diseases. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 36: 262–266.
- [21] Despommier D. 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 265–272.

Wpłynęło 7 kwietnia 2008
Zaakceptowano 7 lipca 2008