

ZDZISŁAW STARONIEWICZ

Badania immunofluorescencyjne immunoglobulin IgG, IgM, IgA w surowicach królików zakażonych doświadczalnie per os *Listeria monocytogenes*

Zakład Mikrobiologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Norwida 31, 50-373 Wrocław

Laboratoryjne rozpoznawanie listeriozy, mimo znacznego postępu, jest nadal zagadnieniem złożonym i trudnym. Szczególną rolę w badaniach laboratoryjnych odgrywają odczyny serologiczne, które niezależnie od różnych zaprzątań na ich wartość i swoistość stanowią nieraz zasadniczy wskaźnik dla klinicysty w rozpoznawaniu i leczeniu listeriozy (9).

W chwili obecnej badania zmierzają w kierunku określenia fizyko-chemicznej natury przeciwciał anty-*Listeria monocytogenes* wykrywanych różnymi odczynami serologicznymi. Najczęściej stosowaną metodą (1, 8) różnicowania jest serologiczna procedura, polegająca na eliminowaniu przeciwciał IgM aktywnych w odczynie aglutynacji przez 2-merkaptioetanol, podczas gdy przeciwciała IgG pozostają w dużym stopniu nie zmienione. Aalund i wsp., Osebold i wsp., Ivanow i wsp. (1, 2, 8) uważają, że różnicowanie immunoglobulin może mieć do pewnego stopnia wartość w serologicznej diagnostyce listeriozy. Osebold i Aalund (8) wykazali w większości surowic pobranych od ludzi i zwierząt z potwierdzoną bakteriologicznie listeriozą przeciwciała IgG w znacznym procencie. Natomiast w surowicach pochodzących od zdrowych zwierząt (owce, bydło) Aalund i wsp. (1) stwierdzili przeciwciała IgM dla *L. monocytogenes*, a brak przeciwciał IgG, które ukazywały się regularnie w doświadczalnych zakażeniach. Staroniewicz i wsp. (12) stosując odczyn immunofluorescencji pośredniej wykazali, że w surowicach ludzi z przewlekłą listeriozą dominują głównie przeciwciała IgG. Odmienne wyniki uzyskali Larsen i wsp. (4, 5). Stwierdzili, że przez cały okres zakażenia pałeczkami *L. monocytogenes* u ludzi dominują głównie przeciwciała IgM. Uważają, że obecność IgM lub brak IgG dla *L. monocytogenes* nie jest wskazówką stanu zakażenia, jak to ma miejsce przy innych chorobach zakaźnych.

W chwili obecnej trudno dać definitywną odpowiedź na pytanie, jakie immunoglobuliny wrażliwe czy odporne na 2-merkaptioetanol występują w zakażeniu listeriozowym. Z uwagi na to, celowe wydało się prześledzenie zachowania się immunoglobulin IgG, IgM, IgA w surowicach królików sztucznie zakażonych pałeczkami *Listeria monocytogenes*, stosując do oznaczania klas immunoglobulin odczyn immunofluorescencji pośredniej.

Materiał i metody

Do badań użyto 5 królików rasy belgijskiej w wieku około 1 roku. Zwierzęta zakażano doustnie 48 godz. hodowlą bulionową zjadliwych pałeczek *L. monocytogenes*, typ serologiczny 1, w ilości 2 ml/kg. Jeden mililitr zawierał 10^8 pałeczek. Krew do badań pobierano 2-krotnie w odstępie tygodnia przed zakażeniem i 4 dnia oraz 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 16, 22, 28 tygodnia po zakażeniu.

Izolację immunoglobulin z badanych surowic królików przeprowadzono za pomocą etanolu w niskiej temperaturze (13). W metodzie tej otrzymywano czystą frakcję IgG i frakcję wspólną IgM z IgA. Frakcję IgM i IgA różnicowano stosując test 2-merkaptioetanolowy według metody według Osebolda (8).

Poziom przeciwciał anty-*Listeria monocytogenes*, należących do poszczególnych klas immunoglobulin, oznaczano odczynem immunofluorescencji pośredniej (IF), używając znakowanych surowic produkcji Difco. Oznaczono również miano przeciwciał IgG anty-*E. coli* i *Staph. aureus*.

Odczyn IF wykonano według ogólnie przyjętych metod (3) z antygenem somatycznym *L. monocytogenes* serotyp 1, *E. coli* (PCM 1144) i *Staph. aureus* (PCM 1115).

Wyniki i omówienie

Zachowanie się immunoglobulin IgG, IgM, IgA w surowicach królików zakażonych *L. monocytogenes* przedstawia ryc. 1.

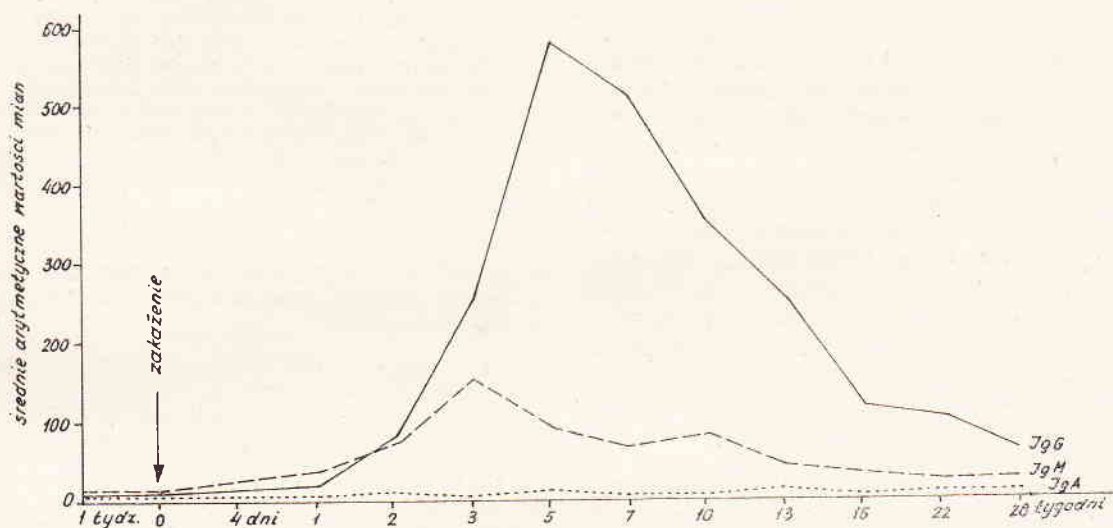
Przeciwciała IgM anty-*L. monocytogenes* były wykrywane w niskich mianach (1:10—1:40) u wszystkich królików już 4 dnia po zakażeniu. Najwyższe miana (1:160) stwierdzono między 3 a 5 tygodniem. Od 5 tyg. wystąpił powolny spadek poziomu przeciwciał IgM, który pod koniec doświadczenia (28 tyg.) utrzymywał się już w niskich mianach (1:10—1:20).

Przeciwciała IgM anty-*L. monocytogenes* były wykrywane w niskich mianach (1:10—1:40) u wszystkich królików już 4 dnia po zakażeniu. osiągnęło najwyższe wartości (1:640) między 3 a 7 tygodniem. Przeciwciała IgG utrzymywały się u wszystkich zwierząt do końca obserwacji na wyższym poziomie (1:40—1:320) niż IgM. Natomiast przeciwciała IgA anty-*L. monocytogenes* nie występowały lub tylko w niskich mianach.

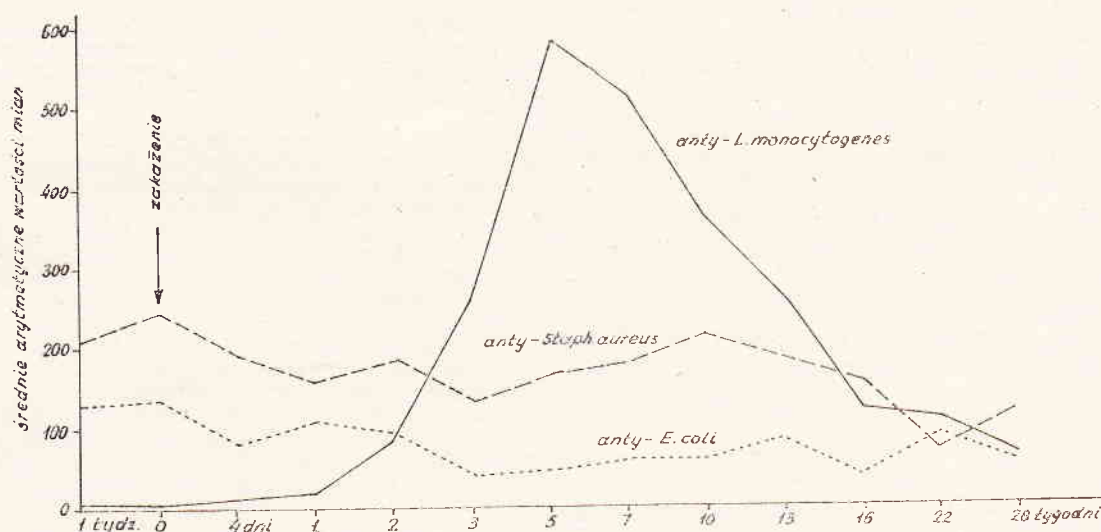
Porównując zachowanie się przeciwciał IgM i IgG anty-*L. monocytogenes* w odczynie immunofluorescencji daje się zauważyć, że we wczesnym okresie zakażenia poziom przeciwciał IgM jest nieznacznie wyższy niż IgG. Natomiast od 2 tyg. po zakażeniu, aż do końca

doświadczenia przeciwciała IgG utrzymywały się w mianach wyższych niż IgM. Zbliżone wyniki uzyskali Ivanow i wsp. (2) w doświadczalnej listeriozie owiec. Stosując odczyn hemaglutynacji biernej wykazali, że we wczesnym okresie zakażenia (2–4 dni po zakażeniu) zwierzęta reagowały tylko produkcją przeciwciał IgM, a dopiero 7 dnia również produkcją przeciwciał IgG, które utrzymywały się przez dłuższy okres czasu równoległe z IgM. Jednak poziom przeciwciał IgM utrzymywał się przez całe doświadczenie na wyższym poziomie niż przeciwciała IgG. Natomiast Larsen i wsp. (4) stwierdzili u ludzi odczynem aglutynacji przez cały okres trwania zakażenia wyłącznie przeciwciała IgM.

Wydaje się, że rozbieżności w wynikach badań różnych autorów wypływają ze stosowania do oznaczenia poziomu immunoglobulin różnych odczynów serologicznych. Według Ptaka (10) zdolność do reakcji *in vitro* przeciwciał różnych klas jest uzależniona od typu reakcji serologicznej. I tak np. w aglutynacji biorą udział głównie przeciwciała IgM (+++), a w mniejszym stopniu IgG (+). Podobnie jest i w hemaglutynacji. Natomiast w wiązaniu dopełniacza dominują IgG (+++), w mniejszym stopniu IgM (+). Autor nie podaje udziału różnych klas immunoglobulin jeżeli chodzi o odczyn immunofluorescencji. Na podstawie wyników niniejszej pracy należy przypuszczać, że w odczynie immunofluorescencji pośredniej



Ryc. 1. Zachowanie się immunoglobulin IgG, IgM i IgA w surowicach królików zakażonych *L. monocytogenes*



Ryc. 2. Zachowanie się przeciwciał IgG anty- *L. monocytogenes*, anty- *Staph. aureus* i anty- *E. coli* w surowicach królików zakażonych per os *L. monocytogenes*

z antygenami listeriozowymi biorą udział głównie przeciwciała IgG.

W serologicznej diagnostyce listeriozy napotyka się trudności z powodu wspólnych grup determinujących antygenów *L. monocytogenes* i innych szeroko rozpowszechnionych mikroorganizmów (1, 8, 11). Aalund i Osebold (1, 8) sugerują, że krzyżowe reakcje, które pojawiają się u zwierząt, wiążą się głównie z przeciwciałami IgM. Dlatego redukcja IgM 2-merkaptotoetanolem mogłaby w pewnym stopniu rozwiązać problem krzyżowych reakcji.

Z przedstawionych badań własnych wynika, że w surowicach królików zakażonych *L. monocytogenes* dominowały głównie przeciwciała IgG, a więc odporne na 2-merkaptotoetanol. Stwierdzono również, że krzyżowe reakcje raczej nie są związane z przeciwciałami IgG. Bowiem zakażenie *L. monocytogenes* nie miało wpływu na poziom przeciwciał IgG anty-*Staph. aureus* i anty-*E. coli* (ryc. 2). Za swoistością odczynu IF przemawiają również wyniki uzyskane przez Lewandowską i wsp. (6, 7). Wykazano, że podawanie Biotropiny (szczepionka wielobakteryjna zawierająca anakultury różnych szczepów bakteryjnych: pałeczek okrężnicy, gronkowców, włoskowców różycy, *Salmonella*, *Pasteurella*) zwierzętom, jak również Neoflaminy (szczepionka o podobnym składzie jak Biotropina) ludziom nie wpływa na poziom przeciwciał anty-*L. monocytogenes* wykrywanych odczynem immunofluorescencji.

Reasumując uzyskane wyniki badań należy stwierdzić, że odczyn IF nadaje się do oznaczania swoistych mian immunoglobulin anty-*L. monocytogenes*, co stwarza większe możliwości diagnozowania i interpretacji wyników w listeriozie.

Wnioski

1. U królików zakażonych doświadczalnie per os *L. monocytogenes* dominują głównie przeciwciała IgG anty-*Listeria*, w mniejszym stopniu IgM, a w niskich mianach lub nie występują przeciwciała IgA.

2. We wczesnym okresie zakażenia obserwuje się nieznacznie wyższy poziom przeciwciał IgM, niż IgG.

3. Istotną rolę w rozpoznawaniu serologicznym listeriozy spełnia określenie dynamiki przeciwciał IgG i IgM.

4. Odczyn immunofluorescencji pośredniej okazał się przydatny do oznaczania swoistych mian różnych klas immunoglobulin anty-*L. monocytogenes*.

Piśmiennictwo

1. Aalund O., Osebold J. W., Di Capua R. A.: J. Immunol. 97, 150, 1966.
2. Ivanov I., Massalaky N.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 19, 433, 1972.
3. Kubica J. F.: Immunofluorescencja. PZWL, 1967.
4. Larsen S. A., Feeley J. C., Jones W. L.: Appl. Microbiol. 27, 1005, 1974.
5. Larsen S. A., Jones W. L.: Appl. Microbiol. 24, 101, 1972.

6. Lewandowska S., Staroniewicz Z., Wachnik S.: Zesz. Dolnośląskiego Zespołu ds. Zoonoz. 2, 49, 1979.
7. Lewandowska S., Nowacki J., Staroniewicz Z., Wachnik Z.: Medycyna Wet. 36, 710, 1980.
8. Osebold J. W., Aalund O.: J. Infect. Dis. 118, 139, 1968.
9. Podgórnjak F.: Mat. Nauk. V Ogólnopolskiego Symp. Neonat. Zakażenia płodu i noworodka. Wrocław, 121, 1970.
10. Ptak W.: Podstawy immunologii. PZWL, 1976.
11. Seeliger H. P. R.: Listeriosis. S. Karger, Basel—New York 1961.
12. Staroniewicz Z., Wachnik S.: Zesz. Dolnośląskiego Zespołu ds. Zoonoz. 2, 27, 1979.
13. Williams C. A., Chase M. W.: Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press, New York 1967.

Adres autora: dr Zdzisław Staroniewicz, ul. Sopocka 21/6, 50-344 Wrocław.

Староневич З. — Иммунофлуоресцентные исследования иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA в сыворотках кроликов, зараженных перорально экспериментально *Listeria monocytogenes*.

Реакцией косвенной иммунофлуоресценции исследовали иммуноглобулины IgG, IgM, IgA в сыворотках кроликов, зараженных экспериментально *L. monocytogenes*. В течение всего опыта (28 недель) доминировали главным образом противотела IgG анти-*L. monocytogenes*, в меньшей степени IgM, а не появлялись или в низких титрах IgA. Лишь в ранний период инфекции наблюдался незначительно выше уровень противотел IgM чем IgG. Реакция IF оказалась пригодной для определения специфических титров разного класса иммуноглобулинов анти-*L. monocytogenes*.

Staroniewicz Z. — Examinations of IgG, IgM and IgA in rabbits infected experimentally with *Listeria monocytogenes*.

Examinations of IgG, IgM and IgA in sera of rabbits infected orally with *L. monocytogenes* were carried out by means of direct IF test. During the observations lasting 28 weeks specific antibodies of IgG predominated; IgM were found to a less degree, and no IgA or only in low titers were noticed. Only in early period of infection a higher level of IgM compared with IgG was stated. IF test proved to be useful to determine the titer of various immunoglobulin classes against *L. monocytogenes*.

LITROP R. M.: Prostaglandyna F₂ i progesteron w doświadczalnej hypogalaktacji u macier. (Prostaglandin F₂ and progesterone in experimental hypogalactia in sows). Res. vet. Sci. 29, 240—247, 1980 (2).

Syndrom MMA występuje po porodzie u 6—12% macier. W celu wyświetlenia roli, jaką odgrywa macica w rozwoju hypogalaktacji, określono zachowanie się poziomu estrogenów, kortykosterydów i prostaglandyny F_{2α} u macier w okresie laktacji, u których uszkodzono śluzówkę macicy przez iniekcje płynu Lugola, oraz u macier, którym podano indometacynę (inhibitor syntetazy prostaglandyny). U macier poziom estrogenu wzrastał pod koniec ciąży i osiągał maksymalną wartość tuż przed porodem, następnie obniżał się w okresie 2 dni przed porodem. U macier z grupy kontrolnej po porodzie utrzymywał się on na niskim poziomie w okresie laktacji. Natomiast u zwierząt z grupy doświadczalnej stężenie progesteronu w płazmie wynosiło 1—4 ng/ml. Po iniekcji prostaglandyny F_{2α} 4 dnia po porodzie poziom progesteronu obniżał się z 1—4 ng/ml do 150—300 pg/ml. Płyn Lugola oraz indometacyna hamowały produkcję prostaglandyny F_{2α} przez macicę po porodzie, co zapobiegało luteolizie i obniżeniu poziomu progesteronu.

G