

# CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

JERZY NOWACKI, STANISŁAWA LEWANDOWSKA, ZENON WACHNIK,  
MICHAŁ KONOPA, JACEK PRZYMUS, JOANNA BROMIRSKA

## Ocena immunogenności szczepów *Listeria monocytogenes*

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, pl. Grunwaldzki 45,  
50-366 Wrocław  
Instytut Pediatrii AM, ul. M. Skłodowskiej-Curie 50, 50-369 Wrocław

Szerzenie się listeriozy w Polsce i wywołane tym straty w hodowli, zwłaszcza owiec, jak również zagrożenie zdrowia ludzi skłania do szukania metod profilaktycznych. Jak dotychczas brak danych, które dokładnie określiłyby metody profilaktyki swoistej. Dlatego też celem badań było znalezienie immunogennych szczepów listerii, które mogłyby być użyte do uodporniania zwierząt.

### Materiał i metody

Do badań użyto 72 szczepy listerii izolowanych od chorych zwierząt i ludzi. Badania wykonano na 1520 myszach Balb C i 30 królikach mieszańcach.

Przed przystąpieniem do badań sprawdzono zjadliwość szczepów listerii dla myszy, zakażając je podskórnie po 0,5 ml 48 godzinnej hodowli bulionowej. Następnie określono zdolność uodporniającą szczepów niejadliwych dla myszy. Do uodporniania myszy i królików użyto 2 szczepów żywych: 6/37 — serotyp 1 i 10/73 — serotyp 4b, hodowanych 48 godz. na agarze tryptozowym w temperaturze 37°C. Hodowlę splełkiwano płynem fizjologicznym uzyskując zawiesinę o gęstości 3 wg skali Mc Farlanda i podawano podskórnie myszom 0,1 do 0,3 ml, a królikom 3 ml.

Króliki badano klinicznie, hematologicznie i serologicznie przed uodpornieniem i następnie 3-krotnie w odstępach tygodniowych po uodpornieniu i podobnie po zakażeniu. Przyżyciowo określano poziom aglutynin (5), odsetek monocytów oraz limfocytów T i B w krwi na podstawie obecności w limfocytach esterazy (6). Po złagodzeniu oznaczano odsetek limfocytów T i B w węzłach chłonnych (6). Ponadto limfocyty T identyfikowano przy użyciu testu rozetowego E (9, 11), a limfocyty B — testu rozetowego EAC w modyfikacji własnej z zastosowaniem świeżego komplementu myszy. W celu wykrycia powierzchniowych immunoglobulin zastosowano odczyn immunofluorescencji (2, 8). Zastosowano także test na aktywność fagocytarną poprzez pochłanianie czerwieni obojętnej przez komórki żarne w modyfikacji własnej z użyciem 0,05%

czerwieni obojętnej inkubowanej 15 min. w temp. 37°C z zawiesiną komórek ( $1 \times 10^6$ /ml) z dodatkiem inaktywowanej cielęcej surowicy płodowej.

### Wyniki i omówienie

Z 72 szczepów listerii 6 było niejadliwych dla myszy, a w dalszych badaniach okazało się, że tylko 2 szczepy: 6/73 i 10/73 wykazały właściwości immunogenne. Szczepy te podane myszom chroniły je przed zachorowaniem. Ponieważ szczepy te należą do oddzielnych serotypów (1 i 4b) sprawdzono ich krzyżową zdolność uodporniającą. Myszy po 1, 2, 3 i 12 tygodniach od uodpornienia zakażano listeriami zjadliwymi (szczep 22/78 — serotyp 1 i szczep 2470 (Gray) — serotyp 4b). Myszom podawano 0,1, 0,2 i 0,3 ml szczepionki, a następnie zakażano je po 1, 2, 3 i 12 tygodniach, podając im dawki, które powodowały śmierć 7—8 nie uodpornionych myszy na 10 zakażonych. Z danych zawartych w tab. 1 wynika, że szczepionka w dawce 0,1 ml okazała się niewystarczająca, natomiast dawki 0,2 i 0,3 ml zapobiegały padnięciom myszy w 70 do 100% jeszcze po 12 tyg. od uodpornienia.

W badaniach na królikach określano zdolność uodporniającą obu szczepów na podstawie badań krwi. Jak wynika z danych tab. 2 odsetek monocytów oraz limfocytów T i B jak również średnie miana odczynu aglutynacji u królików uodpornianych oboma szczepami są do siebie wyraźnie zbliżone. Wyniki te, jak również wyniki badań biologicznych na myszach świadczą o podobnej zdolności uodporniającej obu szczepów. Określenie odsetka monocytów oraz limfocytów T i B zarówno we krwi jak i w węz-

Tab. 1. Odsetek myszy uodpornionych, które przeżyły po zakażeniu krzyżowym zjadliwymi szczepami listerii serotyp 1 i 4b

Uodpornienie		Wyniki po zakażeniu szczepami <i>L. monocytogenes</i>							
Szczepem (serotyp)	Dawki w ml	po 1 tyg.		2 tyg.		3 tyg.		12 tyg.	
		22/78 (1)	2470 (4b)	22/78 (1)	2470 (4b)	22/78 (1)	2470 (4b)	22/78 (1)	2470 (4b)
6/73 (1)	0,1	100	100	90	30	60	20	50	40
	0,2	100	80	90	70	80	60	70	70
	0,3	100	80	90	80	70	70	80	80
10/73 (4b)	0,1	90	100	90	90	10	10	20	40
	0,2	100	100	90	90	90	100	70	100
	0,3	90	90	100	100	80	90	80	80

Tab. 2. Średnie wartości odsetka monocytów, limfocytów T i B oraz mian aglutynin u królików uodpornionych szczepami 6/73 (1) i 10/73 (4b)

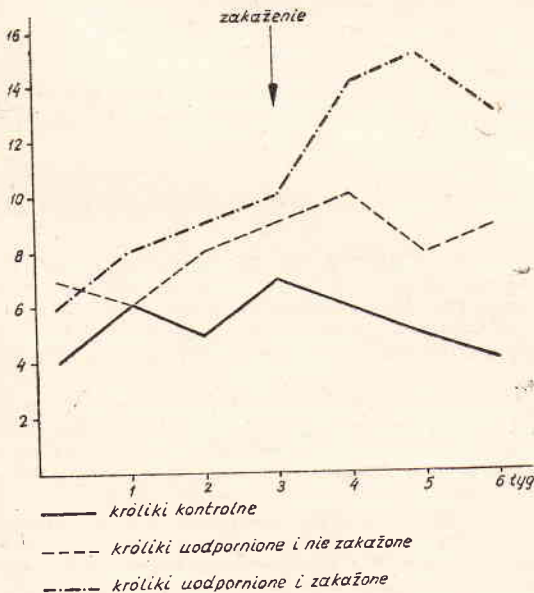
Szczep		Wartości	
		przed uodpornieniem	1, 2 i 3 tyg. po uodpornieniu
6/73 serotyp 1	monocyty	6,3	8,4
	limfocyty T	10,6	20,7
	limfocyty B	89,4	79,3
	miana O	2,0	42,2
	miana H	28,0	35,2
10/73 serotyp 4b	monocyty	7,0	7,0
	limfocyty T	10,0	20,0
	limfocyty B	90,0	80,0
	miana O	0	45,4
	miana H	44,0	55,1

łach chłonnych oraz śledzenie pozwoliło na śledzenie zmian świadczących o rozwoju odporności przeciw listeriozie. Odsetek monocytów wyraźnie wzrastał we krwi królików uodpornionych dopiero po zakażeniu i utrzymywał się mniej więcej na tym samym poziomie (ryc. 1). Uzyskane wyniki potwierdzają więc znane opinie, że króliki po zakażeniu zjadliwymi szczepami reagują wzrostem ilości monocytów, co jest również wyrazem narastania odporności komórkowej. U królików uodpornionych już w pierwszym badaniu, wykonanym po tygodniu od podania szczepionki, nastąpił wyraźny wzrost odsetka limfocytów T (ryc. 2) i wzrost ten utrzymywał się przez cały okres badań, to jest do 6 tygodnia. U królików uodpornionych,

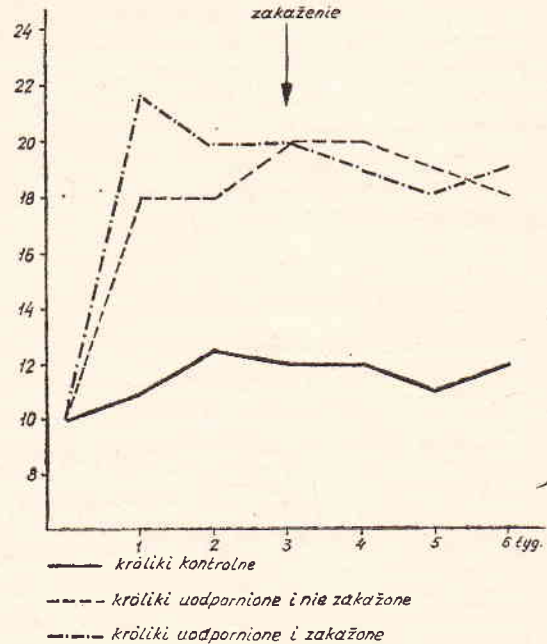
a następnie zakażonych nie dochodziło do wyraźnych zmian w ilości limfocytów T. Zjawisko takie obserwowali także inni autorzy (1, 3, 4, 7, 10). Zachowanie się limfocytów T i B w węzłach chłonnych i śledzenie królików, które otrzymały antygen listeriowy jest również charakterystyczne. Stwierdzono u nich w stosunku do królików kontrolnych (nie uodpornionych jak i nie zakażonych) wyraźny wzrost ilości limfocytów B (tab. 3), ale tylko w węzłach chłonnych. W węzłach chłonnych wzrosła także wyraźnie aktywność fagocytarna (tab. 3), czego nie stwierdzono w śledzienie. Wyniki tych badań wskazują więc na istotną rolę węzłów chłonnych w kształtowaniu odporności przeciw listeriozie. Wyniki badań krwi (ryc. 2) wskazują, że podanie antygen listeriowy powoduje w pierwszych tygodniach wzrost liczby limfocytów T, odpowiedzialnych za odporność komórkową.

Wyniki badań węzłów chłonnych wykonane po 6 tyg. od uodpornienia i 3 tyg. od zakażenia wskazują na wzrost ilości limfocytów B odpowiedzialnych za odporność humoralną. Wyniki te są zgodne z wynikami badań wcześniejszych wykonanych na owcach uodpornionych autoszczepionką (10).

Króliki nie uodpornione, a zakażone listeriami podskórnie reagowały nasilonymi objawami (gorączka, brak apetytu, osowienie, porażenia), jeden królik padł po 5 dniach, a pozostałe wyzdrowiały po 10—14 dniach. Natomiast króliki zakażone dospojówkowo wykazywały podwyższenie temperatury i zapalenie spojówek z silnym łzawieniem. Ilość limfocytów T i B oraz zdolność fagocytarna węzłów chłonnych i śledziona, jako wynik podania antygen listeriowy była podobna u obu grup królików.



Ryc. 1. Odsetek monocytów w krwi królików uodpornionych przeciw listeriozie i następnie zakażonych zjadliwymi szczepami *L. monocytogenes*



Ryc. 2. Odsetek limfocytów T w krwi królików uodpornionych przeciw listeriozie i następnie zakażonych zjadliwym szczepami *L. monocytogenes*

Tab. 3. Limfocyty T i B oraz aktywność fagocytarna w węzłach chłonnych i śledzionie królików uodpornionych i zakażonych (w % komórek)

Króliki		Test rozetowy				IF		Aktywność fagocytarna		Limfocyty	
		E (limfocyty T)		EAC (limfocyty B)		Limfocyty B				T	B
		w	ś	w	ś	w	ś	w	ś	w węzłach chłonnych	
Nie uodpornione	nie zakażone	12	3	28	18	10	17	2	0	20	80
Uodpornione		15,5	6,5	44,5	11,5	15,5	17,5	17,5	3	19	81
Nie uodpornione	zakażone	17,0	3	43,5	10	13	15	17	5	26	74
Uodpornione		13,0	5	36,2	9	11,5	10	8,2	1,3	15	85

Objaśnienia: w — węzły chłonne, ś — śledziona.

W celu wykazania odporności zastosowano test dospójkowy. Królikom uodpornionym wkraplano do worka spojówkowego 0,2 ml zawiesiny zjadliwego szczepu listerii. Króliki te w przeciwnieństwie do królików kontrolnych nie reagowały zapaleniem spojówek. Świadczy to o możliwości zastosowania tego testu w rozpoznawaniu odporności u zwierząt.

### Wnioski

1. Niezjadliwe żywe szczepy *L. monocytogenes* 6/73 — serotyp 1 i 10/73 — serotyp 4b podane podskórnie wykazywały krzyżowo właściwości uodporniające.
2. Wysoki stopień odporności (70—100%) u myszy stwierdzono jeszcze po 12 tyg. od uodpornienia.
3. Właściwości ochronne żywej szczepionki potwierdzono również na królikach.
4. U królików w pierwszych tygodniach po uodpornieniu wzrasta ilość limfocytów T i monocytów, co świadczy o szybkim narastaniu odporności komórkowej.
5. U królików uodpornionych jak i zakażonych węzły chłonne wykazują wyższą zdolność fagocytarną niż śledziona.

### Piśmiennictwo

1. Armstrong A. S., Sword C. P.: J. infect. Dis. 3, 258, 1964.
2. Calkins C. E., Carboni J. M., Waksman B. H.: J. Immun. 115, 1339, 1975.
3. Kostiala A. J., Mc Gregor D. D.: J. exp. Med. 141, 1249, 1975.
4. Lane F. C., Unanue E. R.: J. exp. Med. 135, 1104, 1972.
5. Lewandowska S., Nowacki J., Staroniewicz Z., Wachnik Z.: Medycyna Wet. 36, 710, 1980.
6. Mueller J., del Re G. B., Buerki H., Keller H. U., Hess M. W., Cottier H.: Eur. J. Immunol. 5, 270, 1975.
7. North R. J.: J. exp. Med. 138, 342, 1973.
8. Pernis B., Chiappino G., Kelus A. S., Gelle P. G. H.: J. exp. Med. 122, 853, 1965.
9. Siegel J., Sherman W. B.: J. Allergy Clin. Immunol. 50, 65, 1972.
10. Wachnik Z., Przymus J., Kromolowski W.: Medycyna Wet. 37, 224, 1981.
11. Wilson A. B., Gurner B. W., Coombs R. R. A.: Int. Arch. Allergy 48, 383, 1975.

Adres autora: dr Jerzy Nowacki, ul. Mikołaja Reja 42 m. 14, 50-338 Wrocław.

Новацкий Е., Левандовская С., Вахник З., Конопа М., Пшимус Я., Бромирская И. — Оценка иммуногенности штаммов *Listeria monocytogenes*.

Среди 72 штаммов *L. monocytogenes* 2 6/73-серотип 1 и 10/73-серотип 4b оказались неvirulentными и одновременно иммуногенными. У мышей, иммунизированных этими штаммами, показали еще по истечении 12 недель высокую степень иммуногенности (70—100%). Кролики, зараженные через 3 недели после вакцинации, не показывали никаких болезненных симптомов. Моноцитоз получили лишь у кроликов, зараженных virulentными штаммами. О быстром росте клеточной иммуногенности. У иммунизированных как и зараженных кроликов рос процент лимфоцитов Т, что свидетельствовало

Nowacki J., Lewandowska S., Wachnik Z., Konopa M., Przymus J., Bromirska J. — Assay of immunogenicity of *Listeria monocytogenes* strains.

Out of 72 strains of *Listeria monocytogenes* two of them, i.e. serotype 1 6/73 and serotype 4b 10/73 appeared to be apathogenic but with preserved immunogenic properties. In mice immunized with those strains a high degree of immunity was found still after 12 weeks since vaccination (70—100%). Rabbits infected after 3 weeks were also resistant. Monocytosis was noticed only in rabbits infected with virulent strains. In rabbits immunized or infected an increase of T lymphocytes was found, which could evidence for the appearance of cell-mediated immunity.

WRAY C., CORBEL M. J.: Obserwacje nad działaniem wyciągów z łożyska krów na wzrost salmoneli in vitro i in vivo. (Observations on the effect of extracts of bovine placenta on the growth of *Salmonella* in vitro and in vivo). Br. vet. J. 136, 39—44, 1980 (1).

W badaniach stosowano wodne wyciągi ze świeżych łożysk przygotowane wg metody Corbel i Eades. Preparat po dializie zawierał głównie węglowodany i aminokwasy. Wyciągi nie stymulowały in vitro (metoda dyfuzji) wzrostu *Salmonella dublin* i *S. typhimurium*. Badania przeprowadzone na myszkach SPF którym wyciągi podawano przez okres trzech dni przed i trzech dni po dootrzewnowym zakażeniu 24 godziną hodowlą badanych szczepów salmoneli wykazały, że wyciągi z łożyska istotnie statystycznie zwiększyły wrażliwość myszek na zakażenie *S. typhimurium*.