

Kształtowanie się u źrebiąt, w okresie od urodzenia do odsadzenia, poziomu swoistych przeciwciał IgM i IgG wobec wybranych bakterii środowiskowych

ANNA WŁODARCZYK-SZYDŁOWSKA, WOJCIECH NOWACKI,
MAGDALENA FLOREK,* ZDZISŁAW STARONIEWICZ*

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Katedry i Kliniki Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt,

*Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Katedry Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Włodarczyk-Szydlowska A., Nowacki W., Florek M., Staroniewicz Z.

Adaptive humoral response against selected pathogens in foals from birth to weaning

Summary

The aim of the study was to investigate the level of IgM and IgG class antibodies, specific to selected pathogens in foals at particular stages during their nursing period. The tests were conducted in a thoroughbred stable. Twelve sera from mares and 12 sera from foals were examined and total protein and gamma globulin fraction levels were estimated as well as the relative level of specific antibodies in IgM and IgG class using the ELISA test and expressed as the value of optical density (OD) against the following strains of bacteria antigens: *Staphylococcus sciuri* (1), *Staphylococcus sciuri* (2), *Staphylococcus sciuri* (3), *Staphylococcus xylosus* (4), *Staphylococcus xylosus* (5), *Staphylococcus aureus* (6), *Staphylococcus aureus* (7), *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (8), *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (9), *Enterobacter agglomerans* (10), *Rhodococcus equi* (11), *Salmonella enterica* ser Typhimurium (12). Traces of specific Ig R. equi were indicated in the foal's sera before suckling whereas the OD value increased to 0.35 in sera following the absorption of colostrum. The profile of specific humoral response against environmental pathogens in nursing foals is dependent not only on antigenic moiety of the pathogen but also on the immunological status of the individual.

Keywords: foal, humoral response

Badania nad odpornością bierną źrebiąt były tematem prac wielu autorów. Śledzenie przez nich dynamiki zmian poziomu immunoglobulin siarowych miało na celu określenie najbardziej newralgicznych momentów okresie wychowu źrebięcia. Jednak nie udało się do tej pory wyjaśnić w pełni wszystkich zagadnień związanych z zanikaniem odporności biernej i narastaniem własnej odpowiedzi immunologicznej. Najmniej poznane są zagadnienia związane z kształtowaniem się odpowiedzi swoistej.

Celem badań było określenie w wybranych momentach wychowu źrebięcia poziomu przeciwciał klasy IgM i IgG, swoistych wobec bakterii środowiskowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na terenie stadniny koni pełnej krwi angielskiej, w czterech sezonach wyźrebień. Żrebięta przebywały z matkami na terenie stajni matek do odsadzenia. Po odsadzeniu źrebięta łączone były w pary i pozostawały na terenie stajni matek aż do zakończenia sezonu odsadzeniowego (listopad). Potem parami przechodziły do stajni dla roczniaków. Od kwietnia do październi-

ka klacze ze źrebiętami korzystały z pastwiska. W okresie prowadzonych badań klacze i ich źrebięta były pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną i były klinicznie zdrowe.

Do badań pobierano krew od źrebiąt w trakcie porodu z tętniącej żyły pępownej przed napojeniem siarą (surowica „0”), z żyły szyjnej zewnętrznej od klaczy – matek i ich źrebiąt w 36.-48. godzinie od porodu oraz w 3.-4. tygodniu życia i po odsadzeniu (8.-9. miesiąc życia). W sezonie 2001 r. pobierano głębokie wymazy z lewej części nosowej gardła od źrebiąt odsadzonych. Drobnoustroje namnażano i izolowano najczęściej występujące szczepy bakteryjne. Identyfikowano je testem Api. Z wybranych szczepów przygotowano zawiesiny do dalszej analizy testem ELISA.

W przeprowadzonych badaniach własnych oznaczono poziom białka całkowitego, gamma globulin oraz poziom przeciwciał swoistych wobec 12 drobnoustrojów. Białko całkowite oznaczono metodą biuretową. Rozdziały elektroforetyczne surowic wykonano na paskach bibuły Whatmana nr 1, w buforze weronałowym o pH 8,6. Czas elektroforezy: 5 h, napięcie 200 V, natężenie 10 mA na 8 paszków. Określono procentową zawartość poszczególnych frakcji białka w badanych surowicach i wyliczono ich zawartości bezwzględne w białku całkowitym.

Do oznaczania poziomu immunoglobulin opracowano test ELISA, wzorując się na pracy Stefaniaka (15). Każdą próbkę badano w trzech powtórzeniach, na płaskodennych płytkach mikrotitracyjnych z polichlorku winylu (Nunc) jako fazy stałej. Wartość gęstości optycznej (OD – optic density) badanych prób odczytano przy długości fali 492 nm, w czytniku do mikropłytek (ImmunRead NJ-2000, InterMed). Jako antygeny kontrolnego użyto albuminy bydłowej.

W przeprowadzonych badaniach poziom przeciwciał swoistych w klasie IgM i IgG określono wobec 12 szczepów bakteryjnych. Szczepy od nr 1 do nr 10 wyizolowano z dróg oddechowych źrebiąt odsadzanych. Szczepy 11 i 12 to wybrane patogeny szczególnie chorobotwórcze w okresie okołourodzeniowym i wychowu źrebiąt pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii. Szczepom nadano numery porządkowe (podane w nawiasach): *Staphylococcus sciuri* (1), *Staphylococcus sciuri* (2), *Staphylococcus sciuri* (3), *Staphylococcus xylosus* (4), *Staphylococcus xylosus* (5), *Staphylococcus aureus* (6), *Staphylococcus aureus* (7), *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (8), *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (9), *Enterobacter agglomerans* (10), *Rhodococcus equi* (11), *Salmonella enterica* ser Typhimurium (12).

Oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec wymienionych patogenów wykonano w surowicy 12 kłacz i ich źrebiąt. Wyniki uzyskane w surowicy klinicznie zdrowych kłacz traktowano jako odwoławcze dla oceny poziomów przeciwciał swoistych w surowicy źrebiąt. Antygenem do opłaszczenia fazy stałej były bakterie o koncentracji 10^9 /ml zawieszone w PBS. Przed analizą poddawano je gwałtownemu zamrożeniu do temp -20°C , a następnie gotowano przez 2 godziny na wolnym ogniu. Uzyskana zawiesina inaktywowanych bakterii była rozcieńczana w buforze węglanowym w stosunku objętościowym 1 : 10. Uzyskaną zawiesinę roboczą nanoszono po 50 μl do basenika. Pierwsze przeciwciała zawierała surowica badana rozcieńczona 1 : 100 w PBS. Drugie przeciwciała pochodziło z koziej surowicy handlowej przeciw IgG (H+L) konia znakowanej peroksydazą chrzanową (Goat Anti-Equine IgG (H+L), Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, Southern IgG Biotechnology. Cat. No. 6040-05) w rozcieńczeniu 1 : 4000 w PBS oraz z koziej surowicy handlowej przeciw IgM konia znakowanej peroksydazą chrzanową (Goat Anti-Equine IgM, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, Serotec, Cat. No. AA I33P) w rozcieńczeniu 1 : 10 000 w PBS.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji w układzie nieortogonalnym. Istotność różnic oszacowano testem wielokrotnego rozstępu Duncana. Obliczenia wykonano przy wykorzystaniu pakietu programów statystycznych SAS.

Wyniki i omówienie

Poziom białka całkowitego w surowicy źrebiąt przed picciem siary wynosił 37,90 g/L. Nieznaczny procent tej wartości stanowiły gamma globuliny (tab. 1). Przeciwciała swoiste klasy IgM i IgG w surowicach „0” stwierdzono wobec wszystkich badanych drobnoustrojów. Wartość gęstości optycznej (OD) przeciwciał

Tab. 1. Poziom białka całkowitego w surowicy kłaczy i ich źrebiąt w 2001 r.

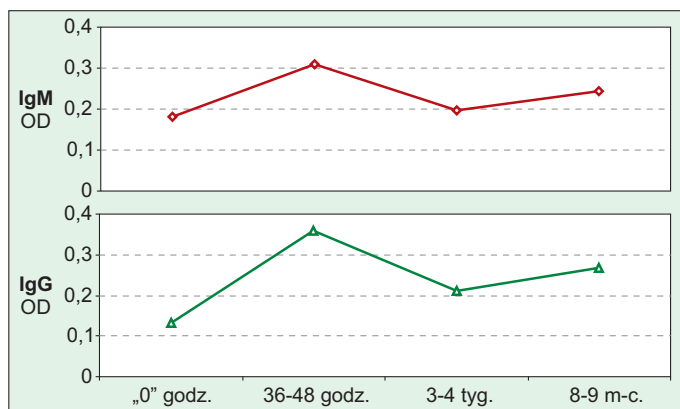
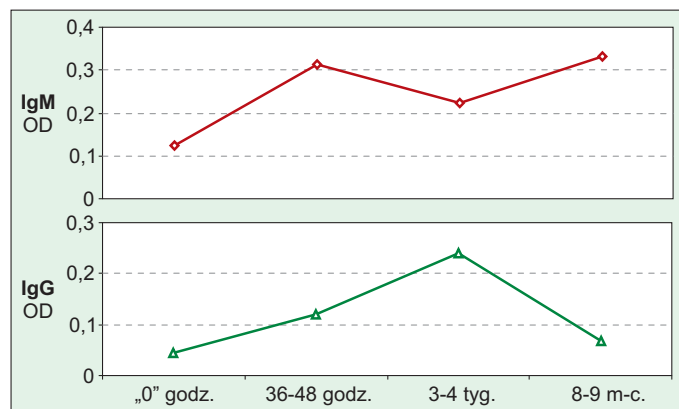
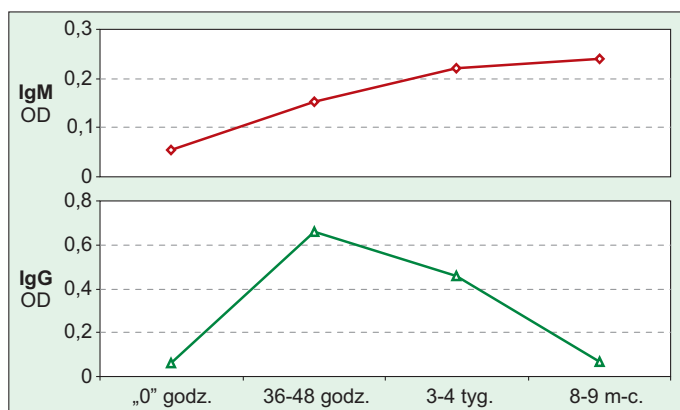
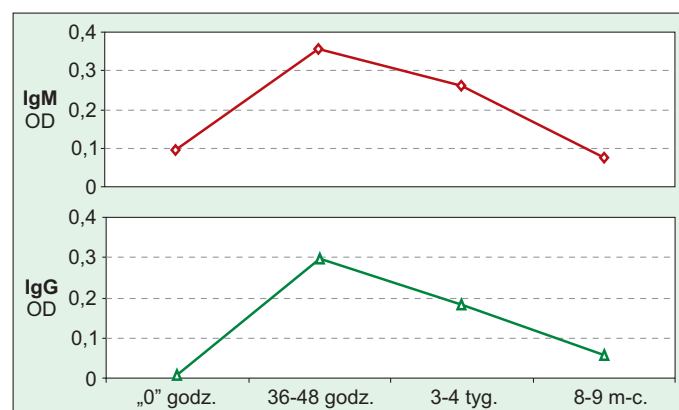
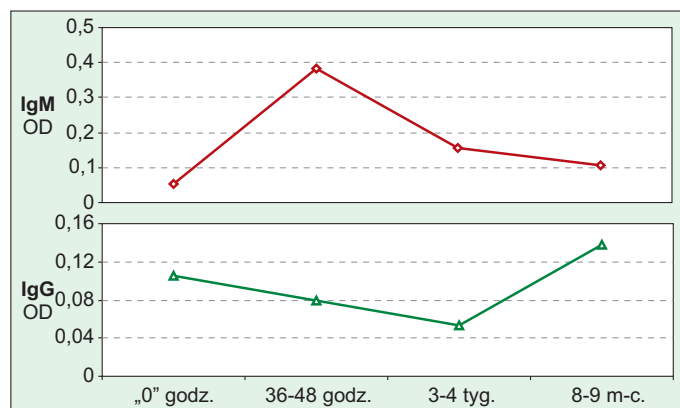
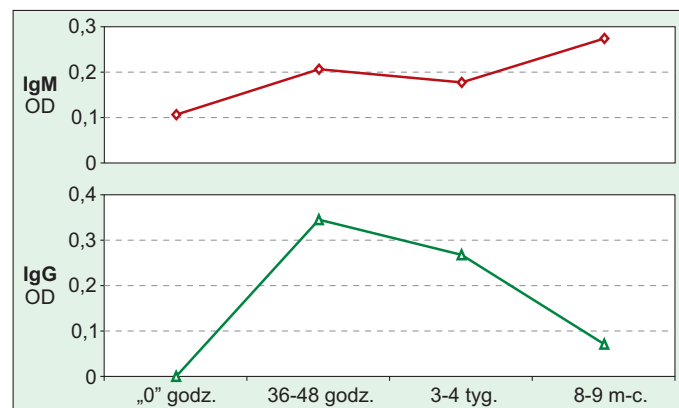
Czas badania	Białko całkowite g/L	% udział gamma globulin	Stężenie gamma globulin g/L
Surowica źrebiąt godz. „0”	37,90 $\pm$ 3,89	4,30 $\pm$ 1,74	1,65 $\pm$ 0,73
Surowica źrebiąt 36.-48. godz. życia	56,78 $\pm$ 8,82	25,57 $\pm$ 6,80	15,09 $\pm$ 5,77
Surowica źrebiąt 3.-4. tydzień życia	54,58 $\pm$ 7,14	18,10 $\pm$ 2,98	9,95 $\pm$ 2,22
Surowica źrebiąt 9. miesiąc życia	58,75 $\pm$ 2,07	16,70 $\pm$ 4,65	9,76 $\pm$ 2,73
Surowica kłaczy 36.-48. godz. od porodu	68,95 $\pm$ 2,80	20,58 $\pm$ 4,92	13,79 $\pm$ 3,43

swoistych klasy IgM była najwyższa wobec *S. aureus* (6), *S. enterica* ser Typhimurium (12), *S. aureus* (7), a najniższa wobec *E. agglomerans* (10), *S. equi* subsp. *Zooepidemicus* (8) i *S. sciuri* (1). Dla przeciwciał klasy IgG stwierdzono wysokie wartości OD wobec *S. aureus* (6) i *E. agglomerans* (10). Bardzo niskie odczyty OD, sugerujące jedynie śladową obecność przeciwciał swoistych odnotowano w przypadku *S. sciuri* (3), *R. equi* (11).

Po zakończonej absorpcji jelitowej immunoglobulin siarowych poziom białka całkowitego wynosił 56,78 g/L, a ponad 25% tej wartości stanowiły gamma globuliny (tab. 1). Prawidłowo, stężenie surowiczych immunoglobulin siarowych powinno przekroczyć 8 g/L w 24. godzinie życia źrebięcia (10, 16).

Najwyższe poabsorpcyjne OD przeciwciał klasy IgM stwierdzono wobec *S. enterica* ser Typhimurium (12), *E. agglomerans* (10), natomiast najniższe w przypadku *R. equi* (11) i *S. xylosus* (4). Wyższy niż w surowicy kłaczy poziom przeciwciał swoistych klasy IgG odnotowano u źrebiąt wobec *S. equi* subsp. *Zooepidemicus* (8) i *S. sciuri* (1), a niski poziom stwierdzono dla *E. agglomerans* (10) i *S. aureus* (7). Pozostałe wartości IgG wobec bakterii były zbliżone do odpowiednich gęstości optycznych w surowicy matek. Od około 4. dnia życia rozpoczyna się spadek siarowych białek odpornościowych (14). Poziom IgG oznaczony w 10. dniu od narodzin jest już wyraźnie niższy i utrzymuje się na względnie stałym poziomie do 32. dnia życia źrebięcia (13).

W 3.-4. tygodniu życia, w surowicy 12 badanych źrebiąt stwierdzono spadek wartości białka całkowitego oraz frakcji gamma globulinowej (tab. 1). Gęstość optyczna dla przeciwciał IgM była najwyższa wobec *S. enterica* ser Typhimurium (12), niska natomiast wobec *S. sciuri* (3), *S. sciuri* (1), *E. agglomerans* (10). Dla przeciwciał klasy IgG, wartości OD były najwyższe w przypadku *S. equi* subsp. *Zooepidemicus* (8), wyższe nawet od poziomu przeciwciał wobec tego drobnoustroju w surowicy kłaczy. Znacznie niższe od pozostałych wartości OD oznaczono wobec *E. agglomerans* (10).

Ryc. 1. Poziom przeciwciał swoistych wobec *S. aureus* – (6)Ryc. 2. Poziom przeciwciał swoistych wobec *S. aureus* – (7)Ryc. 3. Poziom przeciwciał swoistych wobec *S. equi subsp. Zooepidemicus* – (8)Ryc. 4. Poziom przeciwciał swoistych wobec *S. equi subsp. Zooepidemicus* – (9)Ryc. 5. Poziom przeciwciał swoistych wobec *E. agglomerans* – (10)Ryc. 6. Poziom przeciwciał swoistych wobec *S. equi* – (11)

Odnótowany w badaniach własnych spadek immunoglobulin w 3.-4. tygodniu jest zgodny z wynikami badań innych autorów. Już w 1974 r. stwierdzono, że poziom immunoglobulin siarowych w surowicy prawidłowo zabezpieczonych źrebiąt spada do najniższej wartości w 4. tygodniu życia (6). Niewielką ich ilość można jeszcze stwierdzić u 5-6-miesięcznych źrebiąt (8). Natomiast swoiste przeciwciała siarowe spadają stopniowo do 3. miesiąca życia, a następnie utrzymują się na stałym niskim poziomie do 5. miesiąca (7). Zaobserwowano najniższy poziom IgG w 42. dniu życia w grupie kontrolnej i w 56. dniu w grupie źrebiąt stymulowanych kłacz. Szybszy był spadek IgG(T), w tych grupach odnotowany już w 28. dniu życia (9).

U źrebiąt odsadzonych stwierdzono wzrost białka całkowitego, z jednoczesnym spadkiem procentowego udziału w nim gamma globulin. Bezwzględna wartość tej frakcji była zbliżona do oznaczonej w 3.-4. tygodniu życia (tab. 1).

U źrebiąt odsadzonych stwierdzono bardzo wysokie wartości gęstości optycznej przeciwciał klasy IgM, porównywalne z poziomami w surowicy kłacz z wyjątkiem bardzo niskiego poziomu wobec *S. equi subsp. Zooepidemicus* (9). W przypadku *S. aureus* (6) odnotowano około dwa razy wyższą wartość OD dla IgG od pozostałych. Wartość OD najniższą stwierdzono wobec *S. xylosus* (4) oraz, podobnie jak dla przeciwciał klasy IgM wobec *S. equi subsp. Zooepidemicus*

(9). W chwili obecnej wiadomo, że powyżej 50. dnia życia organizm źrebięcia chroniony jest przed infekcjami własną pulą przeciwciał (5, 11).

Infekcja źrebięcia np. rotawirusami powoduje początkowy gwałtowny spadek przeciwciał swoistych z następującym gwałtownym ich wzrostem od 28. dnia życia. Poziom IgG, przy braku kontaktu z tym antygenem, osiągnął najniższą wartość w 42. dniu życia, po czym łagodnie wzrastał. Natomiast poziom swoistych przeciwciał IgG wykazywał stały łagodny spadek od absorpcji immunoglobulin siarowych do zakończenia badań (2). Po około 14 dniach od infekcji EHV-4, u źrebiąt wzrasta poziom IgGb i IgGa. Subizotypy IgGc i IgG(T) wykazują jedynie nieznaczny wzrost stężenia (12).

Na podstawie stwierdzonych w badaniach własnych wartości OD przeciwciał swoistych klasy IgM i IgG, wykreślono krzywe obrazujące narastanie, w surowicy źrebiąt, odpowiedzi humoralnej wobec badanych 12 drobnoustrojów. Biorąc pod uwagę wyniki badań innych autorów np. Flaminio (3, 4), w których stwierdzono u źrebiąt tendencję wzrostową dla IgM od 1. do 6. miesiąca życia, a dla IgG drugi szczyt krzywej w 3. miesiącu z późniejszym spadkiem do 6. miesiąca życia, w badaniach własnych także oczekiwano określonego zachowania się obu tych krzywych. Spodziewano się mianowicie niskiego poziomu przeciwciał w klasie IgM i IgG w chwili narodzin, nieznacznego wzrostu w klasie IgM i wysokiego w klasie IgG po absorpcji immunoglobulin siarowych, spadku w obydwu klasach w badaniu kontrolnym z 3.-4. tyg. życia źrebiąt i wzrostu IgM u źrebiąt odsadzonych, przy niskim jeszcze poziomie swoistych przeciwciał w klasie IgG. Taki przebieg krzywych zaobserwowano w przypadku *S. sciuri* (1), *S. sciuri* (3), *R. equi* (11) (ryc. 6). Natomiast odbiegały od tego schematu krzywe dla *S. aureus* (7) (ryc. 2) i *S. sciurii* (2) oraz *S. Typhimurium* (12). Wykazują one wcześniejszy, bo już w 3.-4. tygodniu życia, wzrost przeciwciał swoistych w klasie IgG. Wzrost taki może świadczyć o dużym naporze antygenowym tych drobnoustrojów środowiskowych i o wcześniejszym zaangażowaniu własnych mechanizmów obronnych w ochronę zdrowia. Stałą tendencję wzrostową krzywej dla przeciwciał klasy IgM przy spadku poziomu IgG oznaczono dla *S. Zooepidemicus* (8) (ryc. 3) i *S. xylosus* (4). Narastanie odpowiedzi humoralnej w klasie IgM i IgG od 3-4 tygodnia życia obserwowano wobec *S. aureus* (6) (ryc. 1) i *S. xylosus* (5).

Natomiast w przypadku *E. agglomerans* (10) (ryc. 5) zaobserwowano najwyższe wartości OD dla przeciwciał klasy IgM po zakończonej absorpcji jelitowej z późniejszą tendencją spadkową. Najwyższe stężenie przeciwciał swoistych klasy IgG stwierdzono w surowicy „0”. W okresie wychowu źrebiąt obserwowano spadek poziomu przeciwciał IgG. Natomiast po odsadzeniu wartość OD przeciwciał swoistych klasy IgG była bardzo wysoka przy niskich wartościach

w klasie IgM. Dla szczepu *S. Zooepidemicus* (9) (ryc. 4) spadek obydwu krzywych, obrazujących poziomy przeciwciał swoistych, może sugerować brak tego drobnoustroju w środowisku lub stan tolerancji immunologicznej nabytej w okresie rozwoju płodowego, gdyż bakteria ta bytuje w układzie rozrodczym klaczy.

Warto podkreślić, że w przypadku różnych szczepów tego samego gatunku drobnoustroju stwierdzono różnice w kształtowaniu się swoistej odpowiedzi humoralnej wobec nich. Szczególnie widać to na przykładzie obydwu szczepów *S. Zooepidemicus* (ryc. 3, ryc. 4). Odmienna odpowiedź immunologiczna wobec tych szczepów może być spowodowana dużą różnorodnością antygenową tego patogenu (1). Kształtowanie się swoistej odpowiedzi humoralnej w okresie wychowu źrebiąt wobec patogenów środowiskowych, zależy w dużej mierze od właściwości antygenowych poszczególnych szczepów oraz osobniczego statusu immunologicznego.

Piśmiennictwo

1. Anzai T., Sheoran A. S., Kuwamoto Y., Kondo T., Wada R., Inoue T., Timoney J. F.: Streptococcus equi but not Streptococcus zooepidemicus produces potent mitogenic responses from equine peripheral blood mononuclear cells. Vet. Immun. Immunopathol. 1999, 67, 235-246.
2. Browning G. F., Chalmers R. M., Sale C. S. H., Fitzgerald T. A., Snodgrass D. R.: Homotypic and heterotypic serum and milk antibody to rotavirus in normal, infected and vaccinated horses. Vet. Microbiol. 1991, 27, 231-244.
3. Flaminio M. J. B. F., Rush B. R., Shuman W.: Peripheral blood lymphocyte subpopulations and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with Rhodococcus equi pneumonia. J. Vet. Intern. Med. 1999, 13, 206-212.
4. Flaminio M. J. B. F., Rush B. R., Davis E. G., Hennessy K., Shuman W., Wilkerson M. J.: Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. Vet. Immun. Immunopathol. 2000, 73, 267-285.
5. Hess-Dudan F., Vacher P. Y., Bruckmaier R. M., Weishaupt M. A., Blum J. W.: Immunoreactive insulin-like growth factor I and insulin in blood plasma and milk of mares and in blood plasma of foals. Eq. vet. J. 1994, 26, 134-139.
6. Jeffcott L. B.: Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. Eq. vet. J. 1974, 6, 109-115.
7. Jeffcott L. B.: Studies on passive immunity in the foal. J. Comp. Path. 1974, 84, 93-101.
8. Jeffcott L. B.: The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. J. Reprod. Fert. 1975, Supl 23, 727-733.
9. Krakowski L., Krzyżanowski J., Wrona Z., Siwicki A. K.: The effect of non-specific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrum, selected indices of non-specific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. Vet. Immun. Immunopathol. 1999, 68, 1-11.
10. LeBlanc M. M., Tran T., Baldwin J. L., Pritchard E. L.: Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. JAVMA 1992, 200, 179-183.
11. McGuire T. C., Poppie M. J., Banks K. L.: Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. JAVMA 1975, 166, 71-75.
12. Mizukoshi F., Maeda K., Hamano M., Iwata H., Matsumura T., Kondo T., Sugiura T.: IgG antibody subclass response against equine herpesvirus type 4 in horses. Vet. Immun. Immunopathol. 2002, 88, 97-101.
13. Saikku A., Koskinen E., Sandholm M.: Detection of hypogammaglobulinemia in neonatal foals using the glutaraldehyde coagulation test. J. Vet. Med. B 1989, 36, 168-174.
14. Saikku A., Koskinen E., Sandholm M.: Sequential changes of IgG and antitrypsin in different compartments during the colostral – intestinal transfusion of immunity to the newborn foal. J. Vet. Med. B 1989, 36, 391-396.
15. Stefaniak T.: Humoralna odpowiedź immunologiczna bydła na wybrane antygeny Haemophilus somnus. Zesz. Nauk. AR Wrocław 1999, 351, 37-42 (rozpr. habil. CLIX).
16. Wells P. W., McBeath D. G.: Equine immunology: An introductory review. Equine vet. J. 1981, 13, 218-222.

Adres autora: dr Anna Włodarczyk-Szydlowska, ul. Więckowskiego 23/16, 50-431 Wrocław; e-mail: aws@poczta.fm