

SLEDOVÁNÍ PROTILÁTKOVÉ ODPOVĚDI PROTI *FRANCISELLA TULARENSIS* POMOCÍ METODY ELISA

¹Oto PAVLIŠ, ^{1,2}Miroslav POHANKA

¹Ústřední vojenský zdravotní ústav, Centrum biologické ochrany, Těchonín

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

Souhrn

Mikroorganismus *Francisella tularensis* vyvolává závažné onemocnění lidí a zvířat známé pod označením tularémie. Sledování protilátkové odpovědi na infekci způsobenou tímto mikroorganismem, resp. kmenem s označením LVS (live vaccine strain) bylo provedeno sérologickým vyšetřením vzorků krve získaných od imunizovaných myší inbredního kmene BALB/c v intervalu 1 až 21 dní. Pomocí metody ELISA byly stanoveny a vyhodnoceny titry celkových protilátek a dále izotypových tříd IgM a IgG. V práci se diskutuje o možnosti použití metody ELISA pro diagnostiku tularémie v ranných fázích.

Klíčová slova: *Francisella tularensis*; Tularémie; ELISA; BALB/c.

Monitoring of Antibodies Reaction against *Francisella Tularensis* Using the ELISA Method

Summary

Microorganism *Francisella tularensis* is the etiological agent of tularemia, a serious disease of humans and animals. Serological diagnosis of antibodies titer in mice models was performed by the indirect ELISA. Inbred mice BALB/c were divided into ten intervals and all of them (without a control group) were inoculated with *Francisella tularensis* LVS. Obtained blood samples or more precisely sera were collected from 1 to 21 days. Antibodies titers of total immunoglobulins and isotypes IgG and IgM were assessed and finally the progress of antibodies against *F. tularensis* LVS was characterized. Applicability of ELISA for tularemia diagnosis is discussed.

Key words: *Francisella tularensis*; Tularemia; ELISA; BALB/c.

Úvod

Mikroorganismus *Francisella tularensis* vyvolává závažné onemocnění lidí a zvířat známé pod označením tularémie. *F. tularensis* je vysoce patogenní pro hlodavce, kteří jsou vedle členovců (klíšťata) a bodavého hmyzu přirozeným rezervoárem ve volné přírodě. Z laboratorních zvířat je vysoce vnímavá bílá myš a syrský křeček, méně vnímavé je morče a králík.

Původce onemocnění, které se podobalo moru malých hlodavců, byl poprvé popsán v roce 1911 v údolí Tulare v Kalifornii (8) a izolován byl o rok později (9). Byly popsány dva rozdílné typy *F. tularensis*, které se liší ve virulenci, geografickém výskytu a vektory, kterými jsou přenášeny. *F. tularensis tularensis* (typ A) reprezentuje vysoce virulentní formu s mortalitou asi 10 %. Ve volné přírodě se vyskytuje v Severní Americe, ačkoli v roce 1998 byla *F. tularensis tularensis* poprvé identifikována také na evropském kontinentě (5). K pře-

nosu tohoto typu *F. tularensis* dochází díky severo-americkým králíkům (*Sylvilagus spp.*). Tento subtyp byl základem, ze kterého byl v padesátých letech 20. století vyvinut vakcinační kmen LVS (3), který byl použit v našem experimentu. Druhý typ *F. tularensis paleartica* (typ B) se vyskytuje v Evropě, Asii, ale také v Severní Americe. Je méně virulentní než typ A, mortalita je menší než 1 % u neléčených pacientů. Jako vektory slouží převážně králíci a další drobní hlodavci a jejich ektoparazitě (6).

Tularémie je přenosná na člověka. Podle místa vstupu infekce rozlišujeme 4 hlavní formy onemocnění člověka: (ulcero)glandulární, okuloglandulární, anginózní (tonziloglandulární) a tyfoidní. Pro glandulární formu onemocnění je charakteristická ulcerativní léze v místě průniku kůží a zvětšení spádových lymfatických uzlin. Při okuloglandulární formě původce nákazy proniká konjunktivou a při anginózní formě přes tonzily. Tyfoidní forma je provázána krvácením a vředovými změnami v zažívacím traktu (4).

Morfologicky je *F. tularensis* drobná, nepohyblivá, nesporeující, opouzdřená, gramnegativní tyčinka o rozměrech 0,4 až 0,6 μm na šířku a 0,8 až 1 μm na délku.

Je fakultativním intracelulárním patogenem se schopností proliferovat uvnitř fagocytujících buněk (makrofágy, hepatocyty). To je jedna z vlastností, pro kterou se tento bakteriální kmen používá jako modelový organismus pro studium interakcí mezi infekčním agens a hostitelem.

Prezentovaná práce si klade za cíl odhadnout analytické limity metody ELISA pro diagnózu tularémie, a to především v jejích časných fázích. Pro tyto účely byly záměrně zvoleny inbrední myši jako hostitelský organismus a 96jamkový titrační panel rutinně používaný v klinických laboratořích pro metodu ELISA.

Metodika

Experiment byl proveden na inbredních myších kmene BALB/c (samice staré 8–10 týdnů; BioTest, Konárovice). Myši byly umístěny za bariérou za standardních podmínek odpovídajících požadavkům zoohygieny laboratorních zvířat.

F. tularensis LVS byla kultivována 24 hodin na McLeod krevním agaru při 37 °C. Dvacet sedm myší bylo imunizováno dávkou 1×10^2 živých buněk *F. tularensis* LVS s. c. v suspenzi ředěné fyziologickým roztokem. Eutanázie a vykrvení zvířat bylo provedeno po 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 a 21 dnech od podání suspenze, vzorky krve byly zpracovány na sérum (označeno IMS – infekční myší sérum). Do kontrolní skupiny byly zařazeny 3 myši, které byly vykrveny 1. den od podání fyziologického roztoku, a získané sérum bylo použito jako kontrolní vzorek (označeno NMS – normální myší sérum).

Uspořádání metody ELISA bylo zvoleno ve shodě s citací (10, 11): komerční antigen *F. tularensis* (Sevapharma, a. s., Praha, ČR) – vyšetřované sérum – značená antimyší protilátka SwAM-Px (Sevapharma, a. s., Praha, ČR) pro stanovení celkového imunoglobulinu nebo anti IgG a IgM protilátky značené peroxidázou (Serotec, Oxford, UK) pro stanovení izotypů. Sérum bylo ředěno dvojkovou řadou od 1:10 až do 1:1280. Vizualizace reakce byla provedena pomocí o-fenyldiaminu. Optická denzita byla měřena při 490 nm pomocí zařízení MRX (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) a pro každý

vzorek bylo měření 3krát opakováno.

Výsledky a diskuse

Experiment byl realizován v souladu s projektem pokusu schváleném resortní komisí MO pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. Po celou dobu probíhajícího onemocnění tularémií u laboratorních zvířat byla prováděna pozorování fyzického stavu (barevná příl. s. IV, obr. 1). Jako nejmarkantnější symptomy lze uvést naježení srsti, třes a zákal očí. Přítomnost těchto symptomů sloužila zároveň jako kontrola zdařilé s. c. inokulace. V průběhu experimentu bylo jako nespecifická kontrola rovněž sledováno zvětšení slezin laboratorních zvířat. Velikost slezin vypovídala o stavu organismu a o reakci imunitního systému na probíhající infekci. U myší infikovaných tularémií byly sleziny zvětšeny zhruba až na dvojnásobek původní velikosti (tj. z 1,5 na 2 až 3 cm).

Čtvrtý den po infekci vyvolané podáním suspenze *F. tularensis* byl zjištěn titr 1:20 v případě celkového imunoglobulinu (Ig) a titr 1:10 v případě IgM třídy. Vzestup titru IgG třídy protilátek byl zaznamenán až šestý den od vyvolání infekce (1:10), kdy titr protilátek u celkového Ig a IgM byl 1:40. Mezi 7. a 10. dnem došlo k markantnímu vzestupu hladiny protilátek v případě celkového Ig způsobeného izotypem IgM. Obdobný vzestup, tentokrát způsobený izotypem IgG, následoval mezi 14. a 21. dnem. Nejvyšší hodnota titru protilátek byla detekována v případě celkového Ig (1:640), v případě izotypů IgM a IgG se jednalo o hodnotu 1:320.

Získaná data odpovídají výsledkům, které popisují chování imunitního systému a jeho reakce na infekci způsobenou *F. tularensis* u dosud intaktních myší nebo jiných živočišných druhů (1, 2, 7, 10).

Ačkoli první signifikantní nárůst titru protilátek byl pozorován již 4. den od provedení imunizace, nedá se očekávat příliš velká selektivita takového nálezu. Mnohem lepší je diagnostika založená na sledování izotypu IgG. V tomto případě dochází k signifikantnímu nárůstu titru až 6. den od prvotní imunizace, markantní zvýšení titru v 10. dnu lze pak považovat za interval prokazatelný i na vyšších hladinách významnosti.

Titry protilátek izotypu IgM dobře korelují se symptomy pozorovanými na infikovaných myších. Při pozorování je pravděpodobně možné označit za

Tabulka 1

Titry protilátek proti *F. tularensis* zjištěné ve vzorcích vyšetřovaných myších sér v intervalu 1 až 21 dní od podání mikrobiální suspenze

den	1.	3.	4.	5.	6.	7.	10.	14.	21.
celkové Ig	0	0	1:20	1:20	1:40	1:40	1:320	1:640	1:640
IgM	0	0	1:10	1:20	1:40	1:80	1:320	1:320	1:160
IgG	0	0	0	0	1:10	1:10	1:40	1:80	1:320

nejvýznamnější interval mezi 3. a 4. dnem. Předchozí experimenty (data neprezentována) zabývající se smrtností poukázaly na nejvyšší úhyn pokusných zvířat právě v tomto intervalu. V pozdějších intervalech, ve kterých docházelo již k nárůstu titru izotypu IgG byly symptomatické projevy spíše minoritní a docházelo k postupnému uzdravování. Z těchto důvodů lze považovat metodu ELISA za ideální pro potvrzení výskytu nákazy původcem tularémie v rámci epidemiologických studií. Přesná diagnóza tularémie je možná až po projevech prvních symptomů a z těchto důvodů by pro tyto fáze měla být použita metoda PCR umožňující lepší amplifikaci signálů.

Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že se podařilo prokázat postupný vzestup hladiny celkových protilátek proti mikroorganismu *Francisella tularensis* LVS především v časně fázi po infekci, tj. do 14. dne od vyvolání infekce. Následná analýza hladiny IgG protilátek prokázala následnou specifickou odpověď hostitelského organismu.

Literatura

1. CULKIN, SJ. – RHINEHART-JONES, T. – ELKINS, KL. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, p. 3277–3284.
2. DREISBACH, VC. – COWLEY, S. – ELKINS KL. Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, p. 1988–1996.
3. EIGELSBACH, HT., et al. Live tularemia vaccine. I. Host-parasite relationship in monkeys vaccinated intracutaneously or aerogenically. *J. Bacteriol.*, 1962, vol. 84, p. 1020–1027.
4. ELLIS, J., et al. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 1, p. 631–646.
5. GURYČOVÁ, D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidem.*, 1998, vol. 14, p. 797–802.
6. HUBÁLEK Z. – HALOUZKA J. Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. *J. Med. Entomol.*, Nov 1997, vol. 34, no. 6, p. 660–663.
7. LOPEZ, MC., et al. Early activation of NK cells after lung infection with the intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS. *Cell Immunol.*, 2004, vol. 232, p. 75–85.
8. MCCOY, GW. Studies upon plague in ground squirrels. II. A plague-like disease of rodents.: *Publ. Health Bull. (Wash.)*, 1911, vol. 43, p. 53–71.
9. MCCOY, GW. – CHAPIN, CW. Further observation on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent: *Bacterium tularense*. *J. Infect. Dis.*, 1912, vol. 10, p. 61–72.
10. POHANKA, M. – PAVLIŠ, O. – SKLÁDAL, P. Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology. *Talanta*, 2007, vol. 71, p. 981–985.
11. POHANKA, M. – PAVLIŠ, O. – SKLÁDAL, P. Rapid characterization of monoclonal antibodies using the piezoelectric immunosensor. *Sensors*, 2007, vol. 7, p. 341–353.

Korespondence: Mgr. Oto Pavliš

Ústřední vojenský zdravotní ústav
Centrum biologické ochrany
561 66 Těchonín
e-mail: oto.pavlis@email.cz

Do redakce došlo 6. 3. 2008