MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2019, 71: 81 - 87 https://doi.org/10.32394/mdm.71.08

Długotrwała odpowiedź humoralna na antygeny *Francisella tularensis* w przebiegu tularemii u ludzi

Long-lasting humoral response to *Francisella tularensis* in human tularemia

Waldemar Rastawicki

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

W pracy oceniono czas utrzymywania się odpowiedzi humoralnej na antygeny *F. tularensis* w przebiegu wybranych przypadków chorobowych. Wykazano, że u niektórych osób już po kilku - kilkunastu tygodniach od momentu wystąpienia objawów klinicznych można zaobserwować stopniowy spadek poziomu przeciwciał, zwłaszcza w klasie IgA i IgM. W przebiegu tularemii może dojść jednak do bardzo intensywnej i długotrwałej odpowiedzi humoralnej. U takich przypadkach wysoki, diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM może utrzymywać się w próbkach kontrolnych uzyskanych wiele miesięcy od początku objawów klinicznych. W celu oceny dynamiki spadku swoistych przeciwciał w przebiegu choroby u tych osób konieczne może być wykonanie szeregu rozcieńczeń badanych próbek surowicy.

Słowa kluczowe: *Francisella tularensis*, tularemia, przeciwciała, odpowiedź humoralna

ABSTRACT

Introduction: Tularemia is a highly infectious zoonotic disease caused by Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. The present study was undertaken to determine the humoral response to *F. tularensis* in the course of human tularemia.

Methods: Twenty eight serum samples obtained from 11 patients with tularaemia were tested by in-house ELISA. The age of the subjects was between 5 and 66 years. From one patient, five serum samples were taken, respectively after 0.5, 1.5, 3, 6 and 12 months from the beginning of the first clinical symptoms.

Results: It has been shown that in some patients after a few to several weeks after the onset of disease, a gradual decrease in the level of antibodies can be observed, especially in the IgA and IgM class. In the course of tularemia, however, a very intense and long-lasting humoral response can occur. In such cases, a high, diagnostically significant level of IgA,

IgG and IgM antibodies may persist in control samples obtained several months after the onset of clinical symptoms.
Conclusions: In order to analysis the dynamics of the decrease in specific antibodies in the course of the disease in some persons, it may be necessary to perform a two-fold series of dilutions of the serum samples tested.

Key words: *Francisella tularensis*, tularemia, antibodies, humoral response

Tularemia jest wysoce zakaźną chorobą odzwierzęcą wywoływaną przez pałeczki *Francisella tularensis*. W zależności od zjadliwości szczepu oraz drogi wniknięcia patogenu do organizmu ludzkiego, rozpoznaje się następujące postacie kliniczne tularemii: wrzodziejąco-węzłową, węzłową, oczno-węzłową, anginową, trzewną, duropodobną oraz płucną (2, 6, 9). Zakażenie może przebiegać w postaci ostrej, z wysoką gorączką, dreszczami, bólami mięśni oraz ogólnym osłabieniem lub w postaci łagodnej. Naturalny rezerwuar *F. tularensis* stanowią małe gryzonie, zającowate, dzikie ptactwo oraz stawonogi, między innymi: kleszcze, muchy oraz komary. Kleszcze, głównie *Dermacentor retikulatus* oraz *Ixodes ricinus,* odgrywają istotną rolę w przenoszeniu choroby. Do zakażenia dochodzi poprzez wtarcie w uszkodzoną skórę człowieka odchodów lub rozgniecionych tkanek kleszcza (2, 4, 5, 6, 9).

W diagnostyce tularemii powszechnie poszukuje się swoistych przeciwciał dla pałeczek *F. tularensis* w surowicy osób chorych. Według danych piśmiennictwa, przeciwciała dla antygenów pałeczek *F. tularensis* pojawiają się u osób zakażonych po 1-14 dniach od wystąpienia objawów klinicznych, osiągając swój najwyższy poziom w 4-7 tygodniu choroby (3, 7). Z obserwacji własnych wynika jednak, że ten wysoki poziom przeciwciał może utrzymywać się jeszcze wiele tygodni czy nawet miesięcy po przebytej chorobie. Celem prezentowanej pracy było wykazanie, na wybranych przypadkach chorobowych, jak długo mogą utrzymywać się przeciwciała dla antygenów *F. tularensis* w surowicy osób po przebytej chorobie. Dodatkowo, na przykładzie 9-letniego dziecka z przebytą oczno-węzłową tularemią, podjęto się szczegółowej oceny dynamiki odpowiedzi humoralnej w poszczególnych klasach immunoglobulin w ciągu roku od wystąpienia zakażenia.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Przedmiotem badań było 28 próbek surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby od 11 osób z tularemią. Najbardziej interesujący był materiał zebrany od 9-letniej dziewczynki z oczno-węzłową postacią tularemii. Próbki surowicy uzyskano od tej pacjentki pięciokrotnie, odpowiednio: 2 tygodnie (próbka nr 1), 6 tygodni (próbka nr 2), 3 miesiące (próbka nr 3), 6 miesięcy (próbka nr 4) oraz 12 miesięcy (próbka nr 5) od początku objawów klinicznych. Pozostałe próbki surowicy wykorzystane w badaniach uzyskano dwu lub trzy-krotnie od osób z różnymi postaciami tularemii. Niestety, w przypadku tych osób nie dysponowano dokładną datą wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, należy przypuszczać jednak, że były to próbki uzyskane w ostrej fazie choroby. Wiek badanych osób wynosił od 5 do 66 lat. We wszystkich próbkach surowicy, we wcześniej prowadzonych rutynowych badaniach serologicznych prowadzonych przy

rozcieńczeniu badanej próbki 1/100, wykryto bardzo wysoki, diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla antygenów *F. tularensis*.

Zestaw ELISA opracowany we własnym zakresie (ELISA NIZP-PZH). Odczyn wykonywano na polistyrenowych płytkach Maxi–Sorp firmy Nunc, wg metody opisanej uprzednio, poszukując przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM (8, 10). Jako antygenu użyto inaktywowanej zawiesiny pałeczek *F. tularensis* rozbitych ultradźwiękami. W odróżnieniu jednak od rutynowo wykonywanego odczynu ELISA, w którym bada się próbkę surowicy wyłącznie w rozcieńczeniu 1/100, w prezentowanej pracy wykonywano także kolejne, dwukrotne rozcieńczenia wybranych próbek surowicy (od rozcieńczenia 1/100 do rozcieńczenia 1/12800). Pozwoliło to na bardziej precyzyjne określenie stężenia poszczególnych immunoglobulin w badanych próbkach surowicy. Oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał we wszystkich pięciu próbkach surowicy przeprowadzono w jednej serii doświadczenia.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I przedstawiono poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM (OD_{450}) oznaczony w rutynowych badaniach diagnostycznych prowadzonych w NIZP-PZH w próbkach surowicy rozcieńczonych 1/100, uzyskanych kilkakrotnie w różnych odstępach czasowych od 11 osób z tularemią. W każdym przypadku, już w pierwszej próbce surowicy uzyskanej w ostrej fazie choroby wykryto wysoki, diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał, we wszystkich trzech klasach immunoglobulin, dla pałeczek *F. tularensis*. Najbardziej istotnym spostrzeżeniem jest jednak to, że ten diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał utrzymywał się w próbkach kontrolnych wszystkich 11 pacjentów (poza jednym wyjątkiem w klasie IgM u pacjenta nr 5) uzyskanych od 23 dni do nawet jednego roku od początku objawów klinicznych. U niektórych osób, poziom ten określony wartością OD_{450} w próbkach kontrolnych zasadniczo nie różnił się od wartości uzyskanej w pierwszej próbce (np. pacjenci nr 1 i 2). U innych, wraz z upływem czasu, można zaobserwować mniejszy lub większy stopniowy spadek poziomu przeciwciał, dobrze widoczny zwłaszcza w klasie IgA i IgM (przykładem takiej dynamiki przeciwciał są wyniki uzyskane u pacjentów nr 6 i 7).W pojedynczych przypadkach (pacjent nr 8) w drugiej próbce zaobserwowano nawet lekki wzrost poziomu przeciwciał, co było zapewne spowodowane uzyskaniem pierwszej próbki surowicy w bardzo wczesnym okresie choroby, kiedy na narósł jeszcze maksymalny poziom przeciwciał.

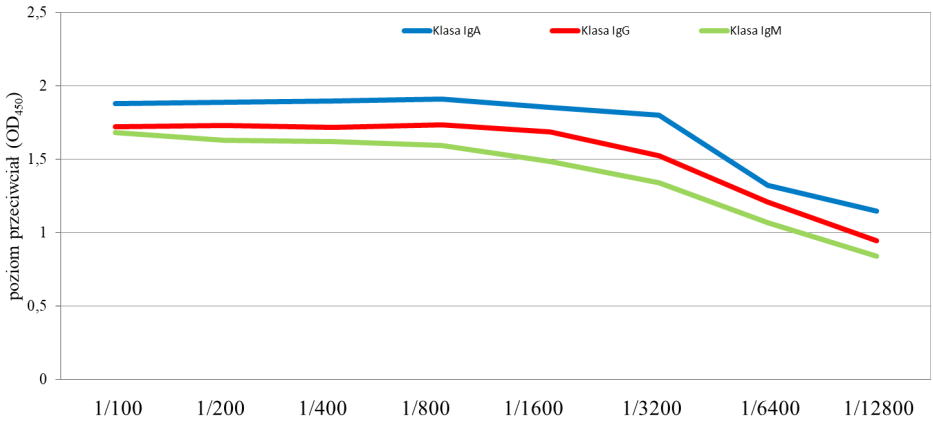
Wszystkie wyniki przedstawione w tabeli I uzyskano w badaniach prowadzonych przy rutynowym rozcieńczeniu próbki surowicy 1/100. Jak można zaobserwować na kilku przykładach przedstawionych powyżej, takie rozcieńczenie próbki nie umożliwia precyzyjnego prześledzenia dynamiki odpowiedzi humoralnej w przebiegu tularemii. Odpowiedzialna za to jest intensywna produkcja przeciwciał przez układ immunologiczny skutkująca bardzo wysokim ich poziomem w surowicy. Tak więc, przy rutynowo stosowanym rozcieńczeniu 1/100 z powodu ograniczeń odczytu spektrofotometru otrzymujemy niejako „spłaszczenie" uzyskanych wyników. Prześledzenie ewentualnych, czasami subtelnych różnic w poziomie przeciwciał w przebiegu tularemii wymaga wykonania kolejnych rozcieńczeń badanych próbek surowicy. Tak więc, w celu określenia jakie rozcieńczenie próbki surowicy w odczynie ELISA byłoby optymalne do prześledzenia dynamiki odpowiedzi humoralnej

w przebiegu tularemii wykonano szereg rozcieńczeń (od 1/100 do 1/12800) czwartej próbki surowicy uzyskanej 6 miesięcy od początku objawów klinicznych od 9-letniego dziecka z węzłowo-oczną postacią tularemii (pacjent nr 11). Uzyskane wyniki wyraźnie pokazują, że w przypadku tego dziecka nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie przeciwciał wyrażonym wartością OD_{450} w próbkach surowicy rozcieńczonych w zakresie od 1/100 do 1/800. Nieznaczny spadek poziomu przeciwciał da się zauważyć dopiero w próbkach surowicy rozcieńczonych w zakresie 1/1600 – 1/3200 i dalszy, wyraźny spadek, w próbkach rozcieńczonych w zakresie 1/6400 – 1/12800.

Tabela I. Poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM (OD_{450}) w próbkach surowicy uzyskanych kilkakrotnie w różnych odstępach czasowych od 11 osób z tularemią. Oznaczenie wykonano przy rutynowym rozcieńczeniu próbki surowicy 1/100.

Pacjent (wiek, płeć)	Kolejna próbka	Odstęp czasu	Przeciwciała klasy IgA	Przeciwciała klasy IgG	Przeciwciała klasy IgM
Nr 1 (34 lata, M)	1	-	2,21	1,98	2,10
	2	23 dni	2,20	1,97	1,97
Nr 2 (53 lat, M)	1	-	1,89	1,71	1,87
	2	30 dni	1,89	1,74	1,83
Nr 3 (1 rok, M)	1	-	1,63	1,78	1,89
	2	50 dni	1,56	1,98	2,00
Nr 4 (36 lat, M)	1	-	1,90	1,68	1,80
	2	53 dni	1,66	1,56	1,67
Nr 5 (66 lat, M)	1	-	1,99	1,88	1,38
	2	62 dni	1,96	1,76	**0,73**
Nr 6 (5 lat, K)	1	-	1,57	1,70	2,02
	2	36 dni	1,39	1,69	1,78
	3	70 dni	1,10	1,62	1,34
Nr 7 (7 lat, M)	1	-	1,87	1,90	2,07
	2	36 dni	1,52	1,74	1,77
	3	70 dni	1,14	1,75	1,29
Nr 8 (21 lat, M)	1	-	1,36	1,39	1,49
	2	5 mc	1,85	1,58	1,62
Nr 9 (58 lat, K)	1	-	1,99	1,84	1,39
	2	7 mc	1,91	1,73	1,24
Nr 10 (41 lat, K)	1	-	1,94	1,72	1,81
	2	3 mc	1,82	1,59	1,64
	3	15 mc	1,76	1,57	1,52
Nr 11 (9 lat, K)	1	-	1,54	1,21	1,02
	2	6 tyg.	1,81	1,51	1,68
	3	3 mc	1,86	1,57	1,70
	4	6 mc	1,88	1,62	1,67
	5	12 mc	1,88	1,59	1,68

Poziom cut-off (OD_{450}): IgA i IgG = 1,00; IgM= 0,8.

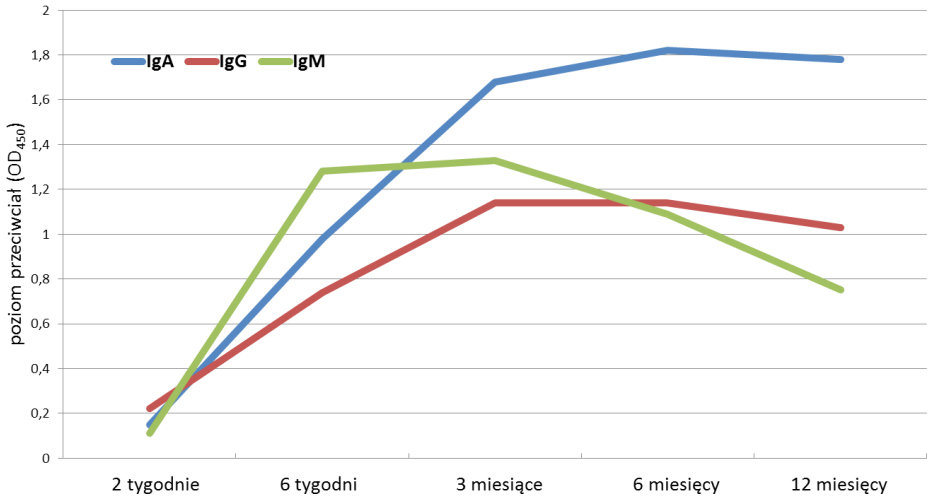


Rycina 1. Poziom przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* oznaczony odczynem ELISA (OD_{450}) w kolejnej, czwartej próbce surowicy rozcieńczonej w zakresie od 1/100 do 1/12800, uzyskanej 6 miesięcy od początku objawów klinicznych od 9-letniego dziecka z węzłowo-oczną postacią tularemii.

Mając do dyspozycji pięć próbek surowicy uzyskanych w przeciągu roku od jednej osoby postanowiono prześledzić u niej dynamikę odpowiedzi humoralnej w przebiegu tularemii. Za optymalne przyjęto rozcieńczeniu próbki surowicy 1/3200. I tak, na rycinie 2 przedstawiono poziom przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* oznaczony odczynem ELISA (OD_{450}) w kolejnych pięciu próbkach surowicy rozcieńczonych 1/3200, uzyskanych w różnych okresach od początku objawów klinicznych od 9-letniego dziecka z węzłowo-oczną postacią tularemii. W pierwszej próbce surowicy, uzyskanej około 2 tygodnie od ekspozycji pacjenta na kleszcza, poziom przeciwciał był stosunkowo niski, aczkolwiek diagnostycznie znamienny i wynosił dla przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM około 0,2. W drugiej próbce surowicy, uzyskanej po kolejnym 1 miesiącu, poziom przeciwciał klasy IgA gwałtownie wzrósł do wartości około 1,3, przeciwciał klasy IgM do wartości 1, natomiast poziom przeciwciał klasy IgG do wartości OD_{450} około 0,75. W trzeciej próbce surowicy, uzyskanej po 3 miesiącach od początku objawów klinicznych, stwierdzono dalszy wzrost poziomu przeciwciał we wszystkich trzech klasach immunoglobulin, przy czym najwyższe poziomy osiągnęły przeciwciała klasy IgA. W czwartej próbce surowicy, uzyskanej mniej więcej po 6 miesiącach od ekspozycji dziecka na kleszcza, obserwowano niewielki ale konsekwentny wzrost poziomu przeciwciał klasy IgA (OD_{450} równe 1,8), utrzymywanie się poziomu przeciwciał klasy IgG i spadek poziomu przeciwciał klasy IgM. W piątej próbce surowicy obserwowano już niewielki spadek poziomu przeciwciał klasy IgA i IgG oraz dalszy, gwałtowny spadek poziomu przeciwciał klasy IgM. Trzeba jednak podkreślić, że nawet w piątej, ostatniej próbce surowicy, uzyskanej po 12 miesiącach od zakażenia, w surowicy badanego dziecka nadal wykrywano na bardzo wysokim, diagnostycznie znamiennym poziomie, wszystkie trzy klasy przeciwciał dla antygenów *F. tularensis*.

Przyjmuje się, że przeciwciała dla antygenów *F. tularensis* pojawiają się we krwi zazwyczaj już po 10-14 dniach od początku objawów klinicznych, osiągając najwyższy poziom w 4-7 tygodniu choroby (3, 7). Jednakże, jak wynika z przeprowadzonych badań, przeciwciała we wszystkich trzech klasach immunoglobulin dla antygenów *F. tularensis*

utrzymują się czasami długo na bardzo wysokim poziomie, uniemożliwiając prześledzenie dynamiki przeciwciał w kolejnych, kontrolnych próbkach surowicy uzyskanych po ustąpieniu objawów klinicznych. W rutynowo prowadzonej diagnostyce tularemii prowadzonej odczynem ELISA przy rozcieńczeniu badanych próbek 1/100 właściwość ta może powodować problemy z prawidłową interpretacją wyników badań serologicznych. Nie wiadomo bowiem, czy wykryty diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał związany jest z aktualnym zakażeniem pałeczkami *F. tularensis* czy też świadczy jedynie o przechorowaniu tularemii w przeszłości. Co więcej, wykrywanie w kontrolnych próbkach surowicy, uzyskanych po kolejnych tygodniach od początku objawów klinicznych, niezmienionego poziomu przeciwciał może wprowadzić w błąd zarówno lekarzy jak i pacjentów, którzy oczekują spadku poziomu przeciwciał dla *F. tularensis* po przeprowadzonej kuracji antybiotykowej.



Rycina 2. Poziom przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* oznaczony odczynem ELISA (OD450) w kolejnych pięciu próbkach surowicy rozcieńczonych 1/3200, uzyskanych w różnych okresach od początku objawów klinicznych od 9-letniego dziecka z węzłowo-oczną postacią tularemii. Wartość cut off przeciwciał < 0,1 (OD_{450}).

Rutynowo w naszym laboratorium stosujemy rozcieńczenie próbki surowicy 1/100 w badaniach diagnostycznych prowadzonych w różnych kierunkach. Ze względu na bardzo niski poziom przeciwciał dla pałeczek *F. tularensis* w polskiej populacji rozcieńczenie to jest wystarczające do jakościowego badania próbek surowicy uzyskanych od osób z podejrzeniem tularemii. Należy się jednak liczyć, że w niektórych przypadkach, kiedy doszło do intensywnej produkcji przeciwciał, rutynowe rozcieńczenie 1/100 może okazać się zbyt niskie do określenia dynamiki spadku przeciwciał. Niemożliwe jest jednakże określenie, jakie inne pojedyncze rozcieńczenie próbki surowicy byłoby uniwersalne dla wszystkich osób z tularemią. Dlatego też, w przypadku konieczności precyzyjnej analizy dynamiki odpowiedzi humoralnej w przebiegu tularemii, należałoby przeprowadzić oznaczenie poziomu przeciwciał w kolejnych rozcieńczeniach (np. od 1/100 do 1/12800) wszystkich próbek surowicy uzyska-

nych w różnych okresach choroby od osób z tularemią, najlepiej w jednej serii badania. Pozwoliłoby to na ustalenie optymalnego rozcieńczenia przy którym można by przeanalizować ewentualne różnice w poziomie przeciwciał dla poszczególnych immunoglobulin w danym przypadku chorobowym. Oczywiście, taki sposób postępowania spowodował by znaczny wzrost zarówno czasochłonności badań jak i przede wszystkim ich ceny.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że najdłużej na wysokim poziomie po zakażeniu wywołanym przez pałeczki *F. tularensis* utrzymują się przeciwciała klasy IgG. *Bavanger* i wsp. (1) wykazali, że lipopolisacharydy odgrywają główną rolę w stymulowaniu produkcji przeciwciał w ostrej fazie zakażenia wywołanego pałeczkami *F. tularensis*. Tak więc, w próbkach surowicy osób z tularemią należałoby spodziewać się przede wszystkim przeciwciał podklasy IgG_2. Faktycznie, w przeprowadzonych uprzednio w NIZP-PZH badaniach, przeciwciała tej podklasy zdecydowanie dominowały w badanych próbkach surowicy osób z tularemią, osiągając z reguły 2-3 krotnie wyższe poziomy niż przeciwciała podklasy IgG_1 i IgG_3 (11)

PIŚMIENNICTWO

1. *Bevanger L, Maeland JA, Kvam AI*. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1: 238-40.
2. *Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW*. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 631-46.
3. *Erricsson M*. Persistence of Cell-Mediated Immunity and Decline of Humoral Immunity to the Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. J Infect Dis 1994; 170: 110-4.
4. *Esmaeili S, Gooya MM, Shirzadi MR* i inni. Seroepidemiological survey of tularemia among different groups in western Iran. Int J Infect Dis 2013; 13: 273-7
5. *Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA*. Tularemia: a 30 year experience with 88 cases. Medicine (Baltimore) 1985; 64: 251-69.
6. *Foley JE, Nieto NC*. Tularemia. Vet Microbiol 2010; 140: 332-8.
7. *Koskela P, Salminen A*. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. J Clin Microbiol 1985; 22: 973–9.
8. *Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R*. Wykorzystanie odczynu ELISA w serologicznej diagnostyce tularemii. Med Dośw Mikrobiol 2005; 57: 425-9.
9. *Rastawicki W, Jagielski M*. Tularemia. Post Microbiol 2005; 44: 265-73.
10. *Rastawicki W, Kurowska J, Hermanowska-Szpakowicz T* i inni. Występowanie przeciwciał dla antygenów *Francisella tularensis* u pracowników leśnych w wybranych regionach Polski 2006; 58: 207-15.
11. *Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N, Wolaniuk N*. Występowanie przeciwciał dla pałeczek *Francisella tularensis* w poszczególnych podklasach IgG u osób z tularemią. Med Dośw Mikrobiol 2014, 66: 11-15

Otrzymano: 21 VIII 2019 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie