Absorpcja nieswoistych przeciwciał zawiesinami *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium z badanych próbek surowicy jako przydatna metoda w serodiagnostyce salmonellozy prowadzonej odczynem ELISA na potrzeby nadzoru epidemiologicznego

Absorption of non-specific antibodies with *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium suspensions from tested serum samples as a useful method in serodiagnosis of salmonellosis carried out by ELISA for epidemiological surveillance

Waldemar Rastawicki, Natalia Rokosz-Chudziak, Karolina Śmiateńska, Urszula Roguska

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

Poszukiwanie przeciwciał dla pałeczek *Salmonella* w próbkach surowicy jest cenną metodą diagnostyczną w przypadku podejrzenia salmonellozy u ludzi. Ze względu na wysokie podobieństwo antygenowe pałeczek *Salmonella*, jako antygenu w odczynie ELISA wykorzystuje się przeważnie mieszaninę lipopolisacharydów uzyskanych z dwóch najczęściej występujących serotypów pałeczek *Salmonella*, tj. *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Taki antygen zapewnia wystarczającą czułość i swoistość w rutynowo prowadzonej na potrzeby lekarzy klinicyistów serodiagnostyce salmonellozy, nie umożliwia natomiast rozróżnienia serotypu pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnego za zakażenie. W przypadku konieczności określenia konkretnego serotypu, np. w dochodzeniu epidemiologicznym, pomocne może być zastosowanie absorpcji zawiesinami bakteryjnymi nieswoistych przeciwciał z próbek surowicy osób chorych. W prezentowanej pracy przedstawiono prostą, tanią i skuteczną metodę prowadzenia absorpcji zawiesinami pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* nieswoistych przeciwciał z próbek surowicy osób z salmonellozą.

Słowa kluczowe: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, serodiagnostyka salmonellozy, krzyżowe reakcje, absorpcja

ABSTRACT

Introduction: Diagnosis of salmonellosis is usually made by stool culture however in many laboratories ELISA for the detection of human serum antibodies against mixture of LPS antigens of the two predominant serovars of *Salmonella* was developed. We present the method of absorbing non-specific antibodies with *S. Enteritidis* (serovars D) and *S. Typhimurium* (serovars B) suspensions from serum samples as a useful method in serodiagnosis of salmonellosis carried out by ELISA. This simple, cost-efficient and effective method of absorption may be used in the epidemiological investigations.

Methods: We used in-house ELISA three different antigens: LPS of the *S. Enteritidis*, LPS of the *S. Typhimurium* and 1:1 mixture of LPS of both serovars. Serum samples collected from 14 patients with salmonellosis, were absorbed with 20% bacterial suspensions obtained from *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and mixture of both serovars (serovars B+D). The non-absorbed sera and sera after particular absorptions were tested separately in ELISA with all three antigens.

Results: The all 14 non-absorbed serum samples showed a high positive results in the IgA, IgG and IgM ELISA with all three LPS antigens. Absorption of the 13 from 14 tested samples with the *Salmonella* B suspension resulted in a significant decrease in the level of antibodies to *Salmonella* B antigen, but only a very slight decrease in the levels of *Salmonella* B + D and *Salmonella* D antigen. On the other hand, the absorption of the same sera with *Salmonella* D suspension, caused a significant decrease in the level of antibodies for serovars D, B and B + D antigens. Such a test result clearly shows that the 13 serum samples were obtained from patients with an infection caused by *S. Enteritidis* (serogroup D). A opposite picture of the humoral response was obtained in the case of one serum sample obtained from a subject with an infection caused by *S. Typhimurium* (serogroup B).

Conclusions: The presented work demonstrates the usefulness of absorption of non-specific antibodies with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* suspensions in serodiagnosis of salmonellosis carried out by ELISA.

Key words: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, serodiagnosis of salmonellosis, cross-reactions, absorption

WSTĘP

Salmonellozy to grupa chorób zakaźnych przewodu pokarmowego wywoływana przez Gram-ujemne pałeczki *Salmonella*, tzw. pałeczki niedurowe (odzwierzęce), inne niż *S. typhi* i *S. paratyphi* (czynniki etiologiczne duru brzuszego i durów rzekomych), zaliczane do dwóch gatunków: *S. enterica* i *S. bongori*. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi za wywoływanie salmonellozy w naszym kraju odpowiedzialne są przede wszystkim pałeczki należące do grupy serologicznej D, głównie *S. Enteritidis* (ponad 70,0% przypadków) i grupy B, głównie *S. Typhimurium* (około 10,0% przypadków) (8). Drobnoustroje te posiadają wspólne komponenty antygenowe (antygen 1,12) odpowiedzialne za występowanie reakcji krzyżowych w badaniach serologicznych.

W dostępnej literaturze istnieją liczne doniesienia o wykorzystaniu badań serologicznych w laboratoryjnej diagnostyce salmonellozy (1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13). Serodiag-

nostyka jest szczególnie przydatna w przewlekłych przypadkach chorobowych, przebiegających chociażby jako reaktywne zapalenie stawów, kiedy nie ma już możliwości wyizolowania czynnika etiologicznego. Ze względu jednak na występowanie licznych, czasami bardzo silnych reakcji krzyżowych, w większości testów jako antygenu wykorzystuje się mieszaninę lipopolisacharydów uzyskanych metodą Westphala z pałeczek należących tylko do dwóch serotypów najczęściej odpowiedzialnych za wywołanie salmonellozy, tj. *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis* (2, 7, 9, 10). Takie postępowanie jest bardzo wygodne i wystarczające w rutynowej serodiagnostyce salmonellozy prowadzonej na potrzeby lekarzy klinicystów. Trzeba mieć jednak na uwadze fakt, że przy użyciu takiego preparatu antygenowego, nie można jednoznacznie określić odczynem ELISA grupy serologicznej pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnych za zakażenie i wystąpienie objawów klinicznych. Nie mniej jednak taka informacja może być przydatna w niektórych okolicznościach, np. w dochodzeniu epidemiologicznym. W przypadkach bowiem, kiedy wynik badania bakteriologicznego jest ujemny, poszukiwanie swoistych przeciwciał, utrzymujących się w surowicy chorego przez szereg tygodni, może być jedyną możliwością potwierdzenia etiologii choroby oraz grupy serologicznej pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnych za wywołanie objawów klinicznych.

W prezentowanej pracy przedstawiono metodę absorpcji nieswoistych przeciwciał zawieszinami *Salmonella Typhimurium* i *Salmonella Enteritidis* z próbek surowicy osób z salmonellozą jako skutecznego narzędzia przydatnego w dochodzeniu epidemiologicznym prowadzonym metodami serologicznymi.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Przedmiotem badań było 14 próbek surowicy uzyskanych od osób podejrzanych o salmonellozę. Do badań wybrano próbki surowicy, w których w rutynowych badaniach prowadzonych odczynem ELISA wykazano wysoki poziom przeciwciał dla preparatu antygenowego, będącego mieszaniną lipopolisacharydów (w stosunku 1:1) uzyskanych z pałeczek *Salmonella Typhimurium* oraz *Salmonella Enteritidis*.

Odczyn immunoenzymatyczny ELISA. Odczyn opracowano we własnym zakresie i wykonywano na płytkach polistyrenowych firmy Nunc zgodnie z metodyką opisaną uprzednio (7). W odczynie ELISA zastosowano trzy różne preparaty antygenowe:

1. Mieszaninę wagowo równych ilości lipopolisacharydów (Sigma, nr kat. L-6011 i L-6511) uzyskanych metodą Westphala z pałeczek *S. Enteritidis* (grupa D) oraz *S. Typhimurium* (grupa B). Preparat ten jest stosowany w rutynowo prowadzonych badaniach serologicznych w kierunku salmonellozy.
2. Lipopolisacharydy (Sigma, nr kat. L-6011) uzyskane metodą Westphala z pałeczek *S. Enteritidis* (grupa D)
3. Lipopolisacharydy (Sigma, nr kat. L-6511) uzyskane metodą Westphala z pałeczek *S. Typhimurium* (grupa B)

Końcowe stężenie użytkowe każdego preparatu antygenowego wynosiło 5 µg/ml. W badaniach wykorzystano próbki surowicy nie poddane absorpcji, absorbowane zawiesiną pałeczek *Salmonella* grupy B, absorbowane zawiesiną pałeczek *Salmonella* grupy D oraz absorbowane zawiesiną pałeczek *Salmonella* grup B+D. Rozcieńczenie próbek surowicy wynosiło 1:100.

Absorbcja przeciwciał. Absorpcję wykonywano w celu pozbycia się krzyżowych, nieswoistych reakcji zachodzących pomiędzy badanymi próbkami surowicy oraz użytymi w odczynie ELISA preparatami antygenowymi. W tym celu uzyskano we własnym zakresie 20% zawiesinę pałeczek *S. Enteritidis* (grupa D) oraz *S. Typhimurium* (grupa B). Następnie, do trzech probówek zawierających każda po 75 μ l surowicy dodawano odpowiednio: 150 μ l 20% zawiesiny pałeczek *S. Enteritidis*, 150 μ l 20% zawiesiny pałeczek *S. Typhimurium* oraz 150 μ l mieszaniny obydwu 20% zawiesin (75 μ l *S. Enteritidis* + 75 μ l *S. Typhimurium*). Surowice wraz zawiesinami wytrząsano przez 1,5 godziny w temperaturze 37°C, wirowano i wstawiano na noc do chłodni. Po tym czasie osad bakteryjny ponownie zwirowywano a surowicę przeznaczano do badań w odczynie ELISA.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na Rycinach 1-3 przedstawiono średnie arytmetyczne poziomy przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM oznaczone we wszystkich 14 próbkach surowicy osób z salmonellozą. Jako antygen w odczynie ELISA zastosowano kolejno: zawiesinę pałeczek *Salmonella* serotypów B+D (Ryc. 1), serotypu *Salmonella* B (Ryc. 2) oraz serotypu *Salmonella* D (Ryc. 3).

Ryc. 1. Średni arytmetyczny poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM (OD₄₅₀) dla antygeny LPS *Salmonella* grup B+D oznaczony odczynem ELISA w 14 próbkach surowicy osób z salmonellozą bez absorpcji, absorbowanych zawiesiną *Salmonella* grupy B, *Salmonella* grupy D oraz *Salmonella* grup B+D.

W przypadku badania próbek surowicy nie poddanych absorpcji, bez względu na zastosowany antygen, uzyskiwano w odczynie ELISA wynik dodatni. Istotne różnice w poziomie przeciwciał można zaobserwować dopiero po zastosowanej absorpcji. I tak, absorpcja badanych próbek zawiesiną *Salmonella* B spowodowała, co oczywiste, wyraźny spadek poziomu przeciwciał dla antygeny *Salmonella* B, ale za to niewielki spadek poziomu przeciwciał dla antygeny *Salmonella* B+D oraz *Salmonella* D.

Ryc. 2. Średni arytmetyczny poziom przeciwciał (OD_{450}) dla antygenu LPS *Salmonella* grupy B oznaczony odczynem ELISA w 14 próbkach surowicy osób z salmonelozą bez absorpcji, absorbowanych zawiesiną *Salmonella* grupy B, *Salmonella* grupy D oraz *Salmonella* grup B+D.

Ryc. 3. Średni arytmetyczny poziom przeciwciał (OD_{450}) dla antygenu LPS *Salmonella* grupy D oznaczony odczynem ELISA w 14 próbkach surowicy osób z salmonelozą bez absorpcji, absorbowanych zawiesiną *Salmonella* grupy B, *Salmonella* grupy D oraz *Salmonella* grup B+D.

Z drugiej strony, absorpcja surowic zawiesiną pałeczek *Salmonella* D, poza bardzo wyraźnym spadkiem poziomu przeciwciał oznaczonego odczynem ELISA z antygenem *Salmonella* D, spowodowała także znaczący spadek poziomu przeciwciał dla antygenów B oraz B+D. We wszystkich przypadkach największy spadek siły reakcji w odczynie ELISA zaobserwowano po absorpcji surowic mieszaniną zawiesin pałeczek *Salmonella* z grup B+D. Taki wynik badań świadczy jednoznacznie, że badane próbki surowicy w zdecydowanej przewadze uzyskano od osób z zakażeniem wywołanym przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis (grupa serologiczna D). Faktycznie, szczegółowa analiza poszczególnych wyników wykazała, że tylko w jednym przypadku uzyskano próbkę surowicy od osoby z zakażeniem wywołanym przez pałeczki *Salmonella* Typhimurium (grupa serologiczna B).

Na rycinie 4 przedstawiono szczegółowe poziomy przeciwciał klasy IgG oznaczone odczynem ELISA w próbce surowicy osoby z zakażeniem wywołanym przez pałeczki *S. Typhimurium* (słupki zaznaczono kolorem ciemniejszym) oraz dla porównania, poziomy przeciwciał osoby z typowym zakażeniem pałeczkami *S. Enteritidis*. Obydwie surowice nie poddane absorpcji, bardzo wyraźnie, prawie bez znaczących różnic, reagowały ze wszystkimi trzema antygenami. Tak więc, bez względu na użyty w odczynie ELISA antygen, nie było możliwe rozróżnienie grupy serologicznej pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnych za zakażenie. Aby to umożliwić konieczne było przeprowadzenie swoistej absorpcji. I tak, w odczynie ELISA, w którym zastosowano mieszaninę dwóch antygenów (B+D), czyli stosowaną do opłaszczania płytek w rutynowych badaniach diagnostycznych, zaobserwowano spadek siły reakcji po absorpcji zawiesiną pałeczek *Salmonella* B surowicy uzyskanej tylko od osoby z zakażeniem *S. Typhimurium*. Dokładnie odwrotna sytuacja miała miejsce po absorpcji surowic zawiesiną *Salmonella* D, gdzie nastąpił drastyczny spadek reakcji z antygenem B+D tylko w przypadku surowicy osoby z zakażeniem wywołanym pałeczkami *S. Enteritidis*. Dopiero absorpcja próbek surowicy mieszaniną pałeczek *Salmonella* B+D spowodowała bardzo wyraźny spadek reakcji w odczynie ELISA zarówno z antygenem *Salmonella* B+D jak i pozostałymi dwoma antygenami. Wyniki uzyskane w odczynie ELISA z poszczególnymi antygenami *Salmonella* B oraz *Salmonella* D potwierdziły obserwacje poczynione w przypadku użycia jako antygeny mieszaniny obydwu serotypów. Co ciekawe, absorpcja przeciwciał osoby z zakażeniem *S. Enteritidis* swoistą zawiesiną *Salmonella* D spowodowała silniejszy spadek reakcji w odczynie ELISA z antygenem *Salmonella* B niż absorpcja przeciwciał osoby z zakażeniem *S. Typhimurium* swoistą zawiesiną *Salmonella* B w odczynie ELISA z antygenem *Salmonella* D (Rycina 4).

Prowadzenie serodiagnostyki zakażeń wywoływanych przez pałeczki z rodzaju *Salmonella* nie jest łatwym zadaniem, ze względu na powszechność występowania zakażeń (wysoki poziom tła immunologicznego) oraz wysokie podobieństwo budowy antygenowej nie tylko w obrębie rodzaju *Salmonella* ale także rodziny *Enterobacteriaceae*. Lipopolisacharydy, stosowane jako antygeny w odczynie ELISA, są długimi heteropolimerami złożonymi z trzech strukturalnie odmiennych regionów: lipidu A, oligocukru rdzeniowego i wielocukru o swoistości antygenowej O, będącego antygenem somatycznym. Zarówno lipid A jak i oligocukier rdzeniowy są strukturami wysoce konserwatywnymi, o podobnej budowie antygenowej charakterystycznej dla wszystkich pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. O przynależności pałeczek *Salmonella* do określonych grup serologicznych decyduje natomiast budowa antygeny somatycznego a utworzone przez różne cukry proste konfiguracje chemiczne decydują o jego swoistości serologicznej. Jest to najbardziej zewnętrzna część LPS którą można uzyskać z komórki bakteryjnej różnymi metodami, w tym metodą ekstrakcji kwasem trójchlorooctowym (metoda Boivina) lub mieszaniną fenolu z wodą (metoda Westphala) (3, 6, 7, 14).

Ryc. 4. Poziom przeciwciał klasy IgG (OD₄₅₀) dla antygenu LPS *Salmonella* grupy B+D, *Salmonella* grupy B oraz *Salmonella* grupy D oznaczony odczytnem ELISA w próbie surowicy osoby z zakażeniem pałeczkami *S. Enteritidis* (grupa D) oraz z zakażeniem pałeczkami *S. Typhimurium* (grupa B) bez absorpcji i po absorpcji zawiesinami pałeczek *Salmonella*.

Zastosowanie w odczynie ELISA jako antygenu mieszaniny LPS dwóch najczęściej występujących serotypów pałeczek *Salmonella*, jest podyktowane ich wysokim podobieństwem antygenowym. Taki antygen zapewnia wystarczającą czułość i swoistość wyników serologicznych rutynowych badań prowadzonych u osób z podejrzeniem salmonellozy (2, 7, 9, 10). W przypadku konieczności określenia konkretnego serotypu pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnego za zakażenie, pomocne może być zastosowanie absorpcji swoistymi zawiesinami nieswoistych przeciwciał obecnych w badanych próbkach surowicy. W takim przypadku, równolegle do surowicy nie poddanej absorpcji należy zbadać w odczynie ELISA z antygenem B+D surowice absorbowane niezależnie zawiesiną pałeczek *S. Typhimurium* oraz *S. Enteritidis*. Opisaną metodę absorpcji nieswoistych przeciwciał można również wykorzystać w przypadku próbek surowicy uzyskanych od osób zakażonych innymi serotypami pałeczek *Salmonella*.

PIŚMIENNICTWO

1. Chart H, Cheasty T, Pinna E i inni. Serodiagnosis of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *S. enterica* serovars Paratyphi A, B and C human infections. J Med Microbiol 2007; 56: 1161-6.
2. Falkenhorst G, Ceper TH, Strid MA i inni. Serological follow-up after non-typhoid salmonella infection in humans using a mixed lipopolysaccharide ELISA. Int J Med Microbiol 2013; 303: 533-8.
3. Freudenberg M, Merlin T, Gumenscheime M i inni. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. Microbes and Infection 2001; 3: 1213-22.
4. Gall D, Nielsen K, Bermudez RM i inni. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortusequi*. Res Vet Sci 2006; 81: 215-7.
5. Isomaki O, Vuento R, Granfors K. Serological diagnosis of salmonella infections by enzyme immunoassay. Lancet 1989; i: 1411-4.
6. Lamas A, Miranda JM, Regal P i inni. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. Microbiol Res 2018; 206: 60-73.
7. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Przydatność wybranych lipopolisacharydowych preparatów antygenowych uzyskanych z pałeczek *Salmonella* grupy serologicznej B i D do serodiagnostyki salmonellozy. Med Dośw Mikrobiol 2011, 63: 65 – 71.
8. Małgorzata Sadkowska-Todys, Mirosław P Czarkowski. Salmonellozy w Polsce w 2014 roku. Przegl Epidemiol 2016; 70: 358-66.
9. Strid MA, Dalby T, Mølbak K, Krogfelt KA. Kinetics of the human antibody response against *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium determined by lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Vac Immunol 2007; 14:741-7.
10. Strid MA. Sero-response to *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium infections: antibody decay profiles and sero-epidemiology. Rozprawa doktorska 2005, Statens Serum Institut, Kopenhaga, Dania.

11. *van Zijderveld FG, van Zijderveld-van Bommel AM, Anakotta J.* Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella* enteritidis infections in experimentally infected chickens. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2560-6.
12. *Wirz-Dittus S, Belloy L, Doherr MG i inni.* Use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in sheep naturally infected with *Salmonella* Abortusovis. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 531-6.
13. *Svenungsson B, Jorbeck H, Lindberg AA.* Diagnosis of *Salmonella* infections: specificity of indirect immunofluorescence for rapid identification of *Salmonella* enteritidis and usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1979; 140: 927-36.
14. *Wen SC, Best E, Nourse C.* Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. *J Paediatr Child Health* 2017; 53: 936-41.

Otrzymano: 1 IV 2019 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skazań Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny w Warszawie