

Zakład Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej Katedry i Kliniki
Chorób Wewnętrznych Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie

MARCIN SZCZEPANIK

*Nadwrażliwość typu natychmiastowego
w przebiegu naturalnej trichofitozy bydła*

Immediate hypersensitivity in cattle naturally infected by triphophysosis

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena nadwrażliwości typu natychmiastowego u zwierząt z naturalną trichofitozą. Badania wykonano u 24 zwierząt chorych i 6 zwierząt kontrolnych. U wszystkich zwierząt wykonano testy śródskórne oraz test degranulacji bazofilów. Stwierdzono występowanie reakcji dodatnich w obydwu testach u 58,34% osobników chorych oraz korelacji dodatniej pomiędzy wynikami testów śródskórnych i degranulacji bazofilów. Uzyskane wyniki świadczą o rozwoju swoistej nadwrażliwości typu natychmiastowego u bydła zainfekowanego dermatofitem *Trichophyton verrucosum*.

Słowa kluczowe: bydło, *Trichophyton verrucosum*, testy śródskórne, test degranulacji bazofilów

WSTĘP

Powszechnie znany jest fakt występowania zjawisk alergicznych w przebiegu infekcji wywołanych przez różne gatunki dermatofitów. Nadwrażliwość taka stanowiła przedmiot badania wielu autorów zarówno u ludzi, jak i różnych gatunków zwierząt. Większość autorów skupiała się na ocenie występowania nadwrażliwości typu opóźnionego, która – jak powszechnie uważa się – związana jest z powstawaniem swoistej odporności. Zjawiska występowania nadwrażliwości typu natychmiastowego były badane u ludzi i świnek morskich, brak natomiast odpowiednich badań dotyczących bydła [Woodfolk i in. 1996, Wawrzkiwicz i in. 1998]. Celem pracy była więc ocena występowania nadwrażliwości typu natychmiastowego u bydła naturalnie zakażonego dermatofitem *T. verrucosum*.

Zjawiska alergiczne w przypadku infekcji grzybiczych

Poza zdolnością wywołania odpowiedzi typu komórkowego i humoralnego, cechą charakterystyczną dermatofitów jest rozwój nadwrażliwości. Uważa się, że nadwrażliwość typu opóźnionego (komórkowa) związana jest z ostrym, charakteryzującym się intensywnymi zmianami zapalnymi stanem chorobowym, podczas gdy pojawienie się nadwrażliwości typu natychmiastowego związane jest raczej z przypadkami przewlekłymi [Woodfolk i Plattis-Mills 1998].

Antygeny dermatofitów

Za wywołanie odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialne są różne antygeny, choć główną rolę w powstaniu nadwrażliwości przypisuje się jest trzem czynnikom: węglowodanom ściany komórkowej, białkom ściany komórkowej i wydzielanej keratynie. Z reguły za rozwój nadwrażliwości typu natychmiastowego odpowiedzialne są (złożone z glikopeptydów) komponenty ściany komórkowej, natomiast białka ściany komórkowej grzybów warunkują powstanie nadwrażliwości opóźnionej [DeBoer 2001]. Na przykład, wyizolowany od *T. tonsurans* antygen o masie 30 kDa (TRI t 1) odpowiada jedynie za wywołanie nadwrażliwości typu natychmiastowego [Duell i in. 1991], natomiast izolowana od dermatofitów proteina IV odpowiada zarówno za odpowiedź typu natychmiastowego, jak i opóźnionego [Woodfolk i in. 1996].

Nadwrażliwość typu natychmiastowego

Nadwrażliwość typu natychmiastowego w testach śródskórnych stwierdza się po 5 do 30 minutach od podania alergenu. Czynnikiem efektorowym w tym typie nadwrażliwości są przeciwciała klasy E. Są one następnie wiązane przez mastocyty, co prowadzi do ich degranulacji i uwolnienia histaminy oraz powstania procesu zapalnego. Występowanie nadwrażliwości typu natychmiastowego przy jednoczesnym braku nadwrażliwości typu opóźnionego jest częstsze u osobników z przewlekłymi grzybicami. Związane jest to prawdopodobnie z aktywacją limfocytów Th2 i brakiem prawidłowej odpowiedzi ze strony limfocytów Th1; ekspozycja komórek prezentujących antygen na wysokie dawki antygeny może prowadzić do aktywacji limfocytów Th2 i blokowania powstawania cytokin (IL-1 IL-12) niezbędnych do powstania odpowiedzi ze strony limfocytów Th1 [Smith i Griffin 1995]. Stwierdzono również, że poziom przeciwciał specyficznych w stosunku do dermatofitów rośnie wraz z wiekiem oraz jest wyższy u osobników chorych w porównaniu ze zdrowymi. Dodatkowo reakcje we wczesnych testach śródskórnych stwierdzane są również u ok. 5% osobników bez objawów klinicznych [Mangan i in. 2000]. Na podstawie występowania wysokiego poziomu przeciwciał oraz dodatnich wyników we wczesnych testach śródskórnych u osobników z przewlekłymi grzybicami wyciągnięto wniosek, że odpowiedź typu humoralnego nie spełnia funkcji protekcyjnych [Woodfolk i in. 1996].

Do oceny występowania nadwrażliwości typu natychmiastowego w warunkach *in vitro* może być wykorzystany test degranulacji bazofilów [Taszkun 1995, Sainte-Laudy i Prost 1996, Antoszyk i in. 2000]. Stwierdzenie degranulacji tych komórek może być uważane za dowód uczulenia na tenże alergen.

MATERIAŁY I METODY

Zwierzęta doświadczalne

Badania zostały wykonane u 24 zwierząt naturalnie zakażonych dermatofitem *T. verrucosum*. Diagnoza trichofitozy stawiana była na podstawie badania klinicznego i dermatologicznego, dodatkowych badań mikroskopowych włosa oraz zeszkrobiny, a także badania hodowlanego na podłożu Sabourauda. U wszystkich zwierząt wykonano testy śródskórne z trichofityną oraz test degranulacji bazofilów.

Zwierzęta kontrolne

Testy śródskórne i test degranulacji bazofilów został wykonany również u 6 zwierząt niewykazujących objawów trichofitozy, celem standaryzacji alergenu i ustalenia jego dawki toksycznej. Zwierzęta te pochodziły ze stada bydła, gdzie nie stwierdzano do tej pory zakażeń dermatofitami.

Antygen wykorzystany w badaniach i jego standaryzacja do wykonania testów śródskórnych

Użyty do hodowli na płynnym podłożu Sabourauda szczep *Trihophyton verrucosum* został uzyskany od jednego z chorych zwierząt. Hodowla prowadzona była przez 3 miesiące, po czym uzyskany z niej po odwirowaniu supernatant dializowano i filtrowano przez sączi bakteryjne o średnicy porów 0,22 μm . Uzyskany alergen stanowił więc filtrat hodowli poddany dalszemu procesowi klinicznej standaryzacji, celem ustalenia metodą prób właściwego, tj. niepowodującego reakcji toksycznych stężenia. Standaryzacja polegała na śródskórnym podawaniu różnych rozcieńczeń alergenu 6 klinicznie zdrowym krowom, pochodzącym ze stada, gdzie trychofitoza nie występowała. Zastosowano objętości nierozcieńczonego alergenu: 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ml oraz rozcieńczenia alergenu w PBS w stosunku 1/10, 1/100, 1/1000 podawane w objętości 0,1 ml. Odczyt testu dokonywany był po 30 minutach od podania alergenu. W wyniku przeprowadzonych prób stwierdzono, że objętości 0,4, 0,6 i 0,8 ml nierozcieńczonego alergenu wywołują reakcję toksyczną, wyrażającą się powstawaniem w miejscu śródskórnego podania obrzęku i nacieku u wszystkich zwierząt, zaś u 3 zwierząt podobna reakcja wystąpiła również w miejscu podania nierozcieńczonego alergenu w objętości 0,2 ml. Przyjęto zatem, że 0,1 ml nierozcieńczonego alergenu nie wywołuje nieswoistego podrażnienia skóry w miejscu jego śródskórnego podania.

Metodyka wykonania testów śródskórnych

W celu potwierdzenia lub wykluczenia w warunkach przyżyciowych istnienia swoistej reaktywności immunologicznej na antygeny *Trihophyton*, posłużono się testami śródskórnymi. Testy wykonano u 24 zwierząt chorych i 6 kontrolnych.

Wykonanie i interpretacja wyników

Testy śródskórne wykonywano na niepigmentowanej skórze bocznej strony klatki piersiowej, gdzie strzyżono sierść, formując prostokąt o wymiarach w przybliżeniu 10×20 cm. Miejsca iniekcji alergenu oznaczane były markerem. Wraz z roztworem alergenu podawano również roztwór histaminy, stanowiący kontrolę dodatnią oraz roztwór soli fizjologicznej, stanowiący kontrolę ujemną. U wszystkich zwierząt zachowano następującą kolejność podawania: 1 – kontrola dodatnia, 2 – kontrola ujemna, 3 – alergen. Odczytu testów dokonywano po 30 minutach.

Za reakcję dodatnią uznawano występujący w miejscu iniekcji alergenu bąbel i rumień o średnicy zbliżonej lub przewyższającej podobną reakcję na podanie kontroli dodatniej z histaminą.

Test degranulacji bazofilów

Test degranulacji bazofilów wykonano u 30 zwierząt: 24 chorych z grupy doświadczalnej i 6 kontrolnych.

Standaryzacja alergenu

Do badań użyto tego samego alergenu co do testów śródskórnych, doświadczalnie ustalając najwyższe nietoksyczne dla komórek wskaźnikowych stężenie alergenu. Celowi temu posłużyło doświadczenie pilotażowe, wykonane na komórkach wskaźnikowych (leukocyty) konia, pozwalające ustalić, że alergen w stężeniach 10^{-3} nie działa toksycznie i nie powoduje degranulacji w sposób niespecyficzny.

Wykonanie testu i interpretacja wyników

Do próbki z heparyną (5 j.m./ml krwi) pobierano krew żylną konia. Sukcesywnie, w miarę opadania krwinek czerwonych zbierano osocze, które następnie wirowano. Osocze zlewano, natomiast leukocyty przemywano w buforze HEPES bez wapnia. W celu rozerwania powiązania IgE – receptor bazofila, otrzymaną zawiesinę komórkową umieszczano w buforze

mleczanowym (pH = 3,7), a następnie powtórnie przemywano buforem Hepes bez wapnia. Badaną surowicę rozcieńczano w buforze Hepes bez wapnia w stosunku 1:5 i łączono z zawiesiną leukocytów konia. W celu uczulenia bazofili końskich przeciwciałami zawartymi w surowicy krów, otrzymaną mieszaninę inkubowano 18 godzin w temperaturze 4°C. W czasie inkubacji przeciwciała klasy IgE z badanych surowic były opłaszczają bazofile konia. Następnie zawiesinę uczulonych bazofili zawieszano w zwiększających się rozcieńczeniach od 10^{-1} do 10^{-4} roztworów alergenu i poddawano inkubacji w temp. 37°C przez 30 minut. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina komórkowa w buforze Hepes z wapniem. Po inkubacji zawiesinę badanych leukocytów barwiono przez godzinę niebieskim barwnikiem (fiolet nitratetrazoliowy – Sigma) i liczono zabarwione komórki w komorze Bürkera. Interpretując wyniki brano pod uwagę bazofile, które nie uległy degranulacji i miały zabarwione na niebieskoturkusowy kolor ziarnistości cytoplazmatyczne. Wynik testu wyrażony w procentach degranulacji otrzymywano za pomocą wzoru:

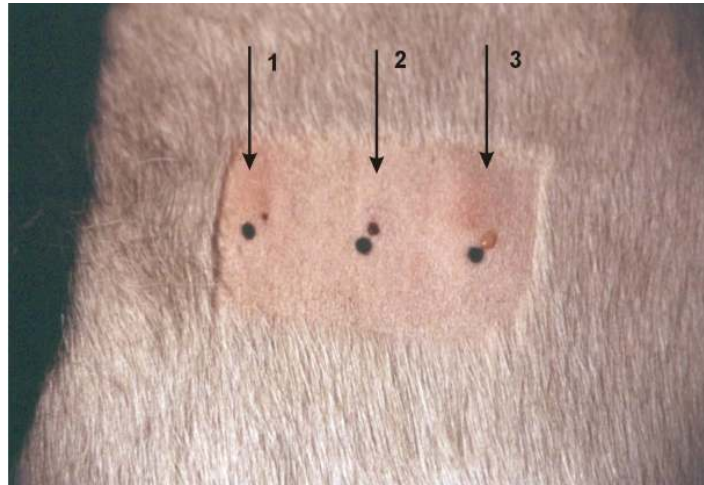
$$\frac{[\text{Liczba bazofili w próbie kontrolnej bez alergenu} - \text{liczba bazofili w studzienkach z alergenem}]}{\text{Liczba bazofili w studzienkach z alergenem}} \times 100$$

Liczba bazofili w studzienkach z alergenem

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki testów śródskórnych

Dodatnie reakcje stwierdzono u 14 zwierząt, co stanowi 58,34% zwierząt badanych. Nie stwierdzono reakcji dodatnich w grupie zwierząt niewykazujących objawów klinicznych. Przykładowa reakcja typu natychmiastowego przedstawiona jest na fotografii 1.



Fot. 1. Dodatnia reakcja typu natychmiastowego w testach śródskórnych u chorego zwierzęcia:
1 – kontrola dodatnia, 2 – kontrola ujemna, 3 – dodatni odczyn wczesny z antygenem *T. verrucosum*

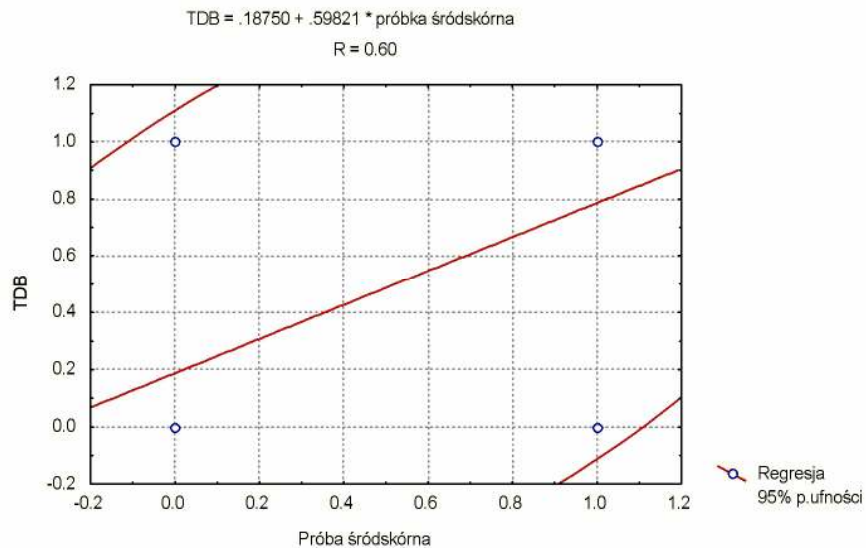
Phot. 1. Positive reaction of immediate type in intradermal tests in a diseased animal:

1 – positive control, 2 – negative control, 3 – positive early reaction with antigen *T. verrucosum*

Wyniki testu degranulacji bazofilów

Dodatnie reakcje w teście stwierdzono u 14 osobników, co stanowi 58,34% zwierząt badanych. Nie stwierdzono dodatnich reakcji w tym teście u osobników niewykazujących objawów klinicznych trichofitozy. Korelacja pomiędzy wynikami testów śródskórnych a testem degranulacji bazofilów przy uwzględnieniu wszystkich zwierząt badawczych i kontrolnych wynosiła 0,6 (rys. 1). Do obliczenia korelacji wykorzystano test Spearmana.

Stwierdzenie dodatnich reakcji typu natychmiastowego w testach śródskórnych oraz dodatnich reakcji typu natychmiastowego u większości zwierząt potwierdza występowanie u nich swoistej nadwrażliwości typu wczesnego. Jak wspomniano we wstępie, nie ma innych prac na ten temat u bydła, co uniemożliwia dokonanie bezpośrednich porównań. Ocena nadwrażliwości typu natychmiastowego na alergeny dermatofitów wykonywana była u ludzi przez Mungan [2000]. W badaniach tych za pomocą testów śródskórnych wykazano występowanie nadwrażliwości typu natychmiastowego u 47,1% do 63,1% chorych (w różnych grupach badawczych). Wyniki te są zgodne z uzyskanymi w badaniach własnych. Nadwrażliwość typu natychmiastowego badana była również u świnek morskich przez Wawrzkievicza [1998]. U zakażonych eksperymentalnie świnek morskich dodatnie reakcje w testach śródskórnych występowały u 20% zwierząt, po szczepieniu dodatnie wyniki były notowane u 58% osobników. Wyniki te są również zgodne z uzyskanymi w badaniach własnych.



Rys. 1. Korelacja pomiędzy wynikami testu degranulacji bazofilów a wynikami testów śródskórnych, uwzględniająca wszystkie zwierzęta badawcze i kontrolne

Fig. 1. Correlation between test results of basophyll degranulation and results of intradermal tests considering all studied and control tests

Odpowiedź immunologiczna typu humoralnego w przypadku infekcji dermatofitami nie jest uznawana za wystarczająca do zapewnienia odporności. Wielu autorów uważa, że nadmierna odpowiedź typu humoralnego oraz rozwój swoistej nadwrażliwości charakterystyczny jest dla osobników z przewlekłymi grzybicami, więc jest to zjawisko nieko-

rzystne, utrudniające powrót do zdrowia. Między innymi u ludzi z objawami atopii stwierdzono występowanie nadwrażliwości typu natychmiastowego oraz przewlekłych postaci trichofityzy [Wilson i in. 1993, Romani 1996]. Stwierdzenie więc u zwierząt tego typu nadwrażliwości może wskazywać na zaburzenia w układzie immunologicznym.

PIŚMIENNICTWO

- Antoszyk G., Porębski G., Stobiecki M., Obtulowicz K., Bogdaszewska-Czabanowska J. 2000: Test degranulacji bazofilów (TDB) w diagnostyce alergicznych odczynów polekowych. *Diagn. Lab.*, 36, 129–144.
- DeBoer D.J. 2001: Immunology and Vaccinology of Dermatophytosis 17th ESVAD-ECVD Congress Veterinary Dermatology, Kopenhaga.
- Duell B., Arruda L.K., Hayden M.L., Chapman M.D., Platts-Mills T.A. 1991: Trichophyton tonsurans allergen. I. Characterization of protein that causes immediate but not delayed hypersensitivity. *J. Immunol.*, 147, 96–101.
- Mungan D., Bavbek S., Peksari V., Celik G., Guey E., Misirlidil Z. 2000: Trichophyton sensitivity in allergic and nonallergic asthma. *Allergy*, , 56, 558–562.
- Romani L. 1997: The T cell response against funginal infections. *Current Opinion in Immunol.*, 9, 484–490.
- Sainte-Laudy J., Prost C. 1996: Binding of canine anaphylactic antibodies on human basophils: application to canine allergy diagnosis. *Vet. Dermatol.*, 7, 185–191
- Smith J.M.B., Griffin J.F.T. 1995: Strategies for the development of vaccine against ringworm. *J. Med. Vet. Mycol.*, 33, 87–91.
- Taszkun I. 1995: Badania nad rolą pałeczki *Erwinia herbicola* w etiopatogenezie naturalnych przypadków *alveolitis allergica* u bydła. Praca dokt. Lublin.
- Wawrzkiwicz K., Ziółkowska G., Cybulska R., Wawrzkiwicz J. 1998: The comparative evaluation of hypersensitivity reactions in guinea pigs infected and vaccinated against *Microsporum canis*. *Ann. UMCS, Sec. DD*, 53, 1–16
- Wilson B.B., Duell B., Millis T.A. 1993: Atopic dermatitis associated with dermatophyte infection and *Trichophyton hypersensitivity*. *Cutis*, 51, 191–192
- Woodfolk J.A., Platts-Mills T.A.E. 1998: The immune response to dermatophytes. *Res. Immunol.*, 149, 436–445.
- Woodfolk J.A., Slunt J.B., Deuell B., Hayden M.L., Platts-Mills T.A. 1996: Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. *J. Immunol.*, 156, 1695–1701.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate immediate phase of hypersensitivity in cattle naturally infected by trichophytosis. All research was done on a group of 24 ill animals and on 6 control animals. The skin tests and basophils degranulation test was performed in all ill and control animals. The positive reaction in both tests was noticed in 58,34% of ill animals. We also noticed strong correlation between results of skin tests and basophils degranulation test. Our data confirm the development of specific immediate type hypersensitivity in cattle naturally infected by *Trichophyton verrucosum*.

Key words: cattle, *Trichophyton verrucosum*, skin tests, basophils degranulation test