

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XLVIII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

KNJIGA 17.



Urednik
PAVEL ŠTERN,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1973.

MIRA NADAŽDIN i ERNEST I. GRIN

DJELOVANJE LIZOZIMA NA ANTIGENO SVOJSTVO TREPONEMA PALLIDUM U FTA (FLUORESCENT TREPONEMA ANTIBODY) TESTU

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 10. VII 1972. god.)

Morfološke promjene *Treponema pallidum* koje se javljaju in vitro zavise, između ostalog, i od koncentracije lizozima koji se ekstrahira iz testikularnog tkiva inokuliranog kunića zajedno sa treponemama. Prisutna količina lizozima u takvoj suspenziji treponema zavisi od individualne reakcije inficiranog zeca i nije uvijek ista (Metzger (1963)². Vršena su brojna ispitivanja djelovanja lizozima na *Treponema pallidum* uglavnom u odnosu na test imobilizacije i aglutinacije treponema i ona su utvrdila da se dodavanjem lizozima može skratiti vrijeme koje je inače potrebno da *Treponema pallidum* budu aglutinirane ili imobilizirane sa specifičnim antitijelima seruma (Metzger i Podwinska (1965)⁵, Metzger (1965)⁴, Ovčinnikov i Podwinska (1968)⁷). Međutim, djelovanje lizozima na antigenu reaktivnost *Treponema pallidum* u FTA-testu nije još dovoljno poznato (Metzger i Ruczkowska (1964)³).

U ovome radu iznosimo rezultate ispitivanja djelovanja lizozima na antigen (*T. pallidum*) različite starosti i njegovu reaktivnost u FTA-testu.

MATERIJAL I METODE

Da bi se utvrdila osjetljivost antigena na (*T. pallidum*) u FTA-testu pod uplivom lizozima, pripremljena je svježa suspenzija *T. pallidum* sa oko 80 treponema u vidnom polju ($\times 400$) i razdijeljena u dva dijela, od kojih je jednom dijelu dodat lizozim (400 ug/ml.). Oba antigena su čuvana na $+4^{\circ}\text{C}$, a razmazi su napravljeni poslije 2, 4, 7, 20 i 30 dana. Razmazi

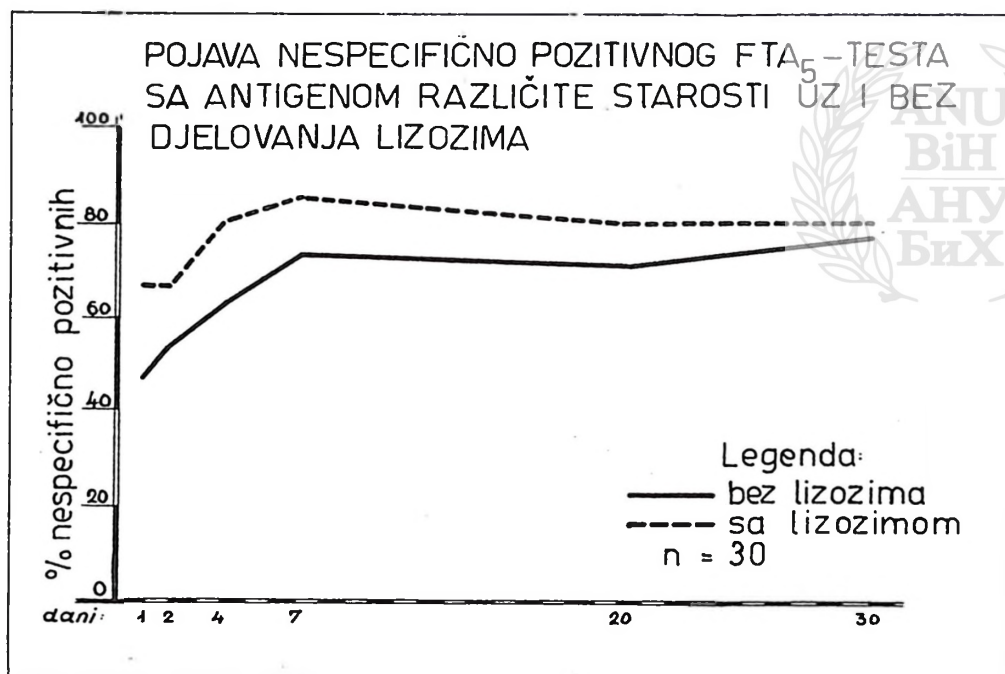
su zatim fiksirani u acetonu 10 minuta i ostavljeni na -20°C do upotrebe. Ovako spremljeni razmazi mogu se čuvati bez ograničenja i pri tome treponeme ostaju morfološki nepromijenjene (Stout i saradnici (1968)⁶).

Izvršena su komparativna ispitivanja angitena u FTA₅ i FTA-ABS-testu sa 30 seruma koji su bili negativni standardnim serološkim reakcijama (STS), testom imobilizacije treponema i fluorescentnim treponemnim testom (FTA₂₀₀).

Upliv lizozima na termostabilni u vodi topljivi antigen Reiter treponeme i upliv na pufer za izvođenje FTA-testa ispitali smo sa 29 serološki negativnih seruma (STS i FTA₂₀₀).

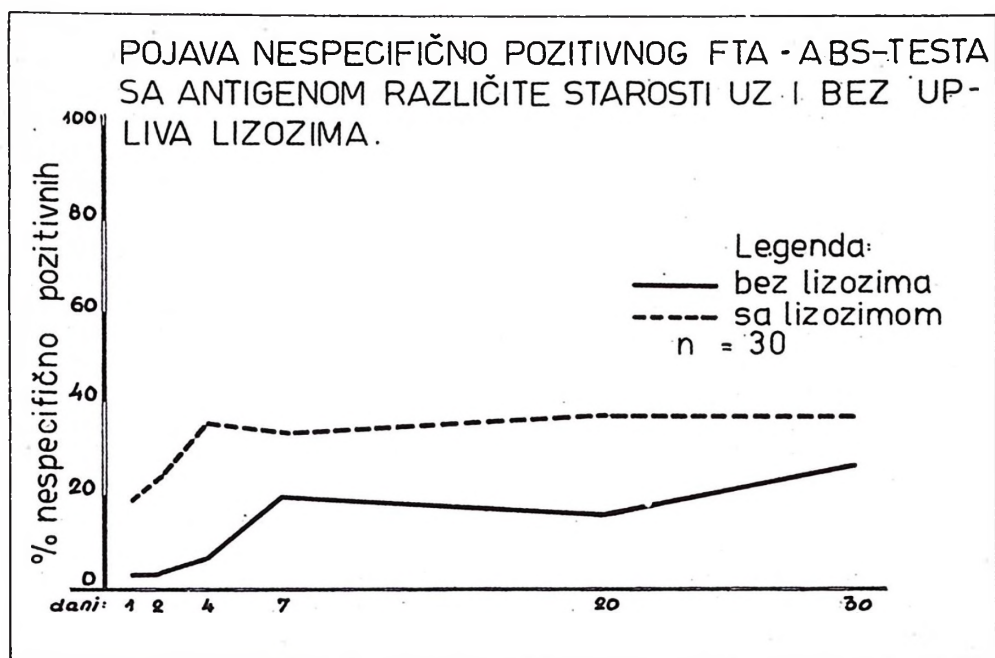
REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati komparativnih ispitivanja FTA₅ i FTA-ABS-testova sa antigenom koji je bio pod uplivom lizozima i istim antigenom koji nije bio izvrnut djelovanju lizozima prikazani su na grafikonima br. 1 i 2.



Grafikon 1.

Dobijeni rezultati ovih ispitivanja pokazali su da upotrebom istih seruma, s jedne strane, obrađenih sa antigenom bez lizozima, a, s druge, antigenom koji je bio izložen djelovanju lizozima postoji izrazito povećana reaktivnost antigena pod uplivom lizozima u FTA₅ i u FTA-ABS-testu.



Grafikon 2.

Djelovanje lizozima naročito je došlo do izražaja u FTA-ABS-testu i statističkom obradom utvrđeno je da dodavanjem lizozima u antigen signifikantno se povećava nespecifičnost ($P < 0,05$). Dalje je uočeno da lizozim ne djeluje jednako na iste antigene različite starosti i čini se da postoji jači upliv lizozima na antigenu reaktivnost svježije *Treponema pallidum* nego starije.

Nadalje smo ispitivanjem upliva lizozima na druge komponente koje ulaze u reakciju FTA-ABS-testa (sorbent i pufer) mogli utvrditi da prisustvo lizozima i u sorbentu kao i u puferu povećava broj nespecifično pozitivnih reakcija (tab. br. 1). Porast nespecifično pozitivnih reakcija postignut na ovaj način ne znači ujedno da lizozim djeluje na sam sorbent ili pufer. Mnogo je bliža pretpostavka da tek kasnije u kontaktu sa antigenom (*T. pallidum*) djelovanje lizozima dolazi do izražaja razaranjem površnog sloja same *treponeme*, zbog čega dolazi i do veće reaktivnosti u FTA-testu (tab. br. 1).

Tabela 1.

DJELOVANJE LIZOZIMA NA PUFER I SORBENT U FTA₅ I FTA-ABS-TESTU
n = 29

test rezultat	FTA ₅		FTA-ABS	
	Pufer	Pufer + Lizozim	Sorbent	Sorbent + Lizozim
Reaktivan	18	27	8	12
Nereaktivan	11	2	21	17

Dodavanjem lizozima u sorbent povećava se nespecifična reaktivnost FTA-ABS-testa za 14%, dok sa puferom reaktivnost FTA-metode je uvećana za 21%. Ova procentualna razlika u djelovanju lizozima u prethodnom kontaktu sa sorbentom odnosno puferom upućuje na to da tom prilikom dolazi i do izvjesnih promjena lizozima, koje su veće u kontaktu sa sorbentom nego sa puferom, ili da sam sorbent smanjuje nespecifičnost reakcije.

Postignuti rezultati u izvršenim ispitivanjima djelovanja lizozima na druge sorbirajuće materije koje su iskorištavane za apsorpciju nespecifičnih antitijela (Nadaždin (1970)⁶ pokazuju da je lizozim povećao nespecifičnost testa manje ili više sa svim ispitivanim sorbirajućim materijama izuzimajući ultrazvukom razorene Reiter treponeme (»sonicate«), što govori u prilog pretpostavci da samo takav sorbent stvarno apsorbuje nespecifična antitijela iz seruma, pa eventualne promjene koje nastaju na *T. pallidum* pod uplivom lizozima ne dolaze do izražaja u konačnom rezultatu.

Na osnovu različite reaktivnosti treponema u FTA-testu može se zaključiti da *Treponema pallidum* ima heterogenu antigenu građu. Rezultati naših ispitivanja reaktivnosti *T. pallidum* u FTA-reakciji u skladu su sa pretpostavkom D'Alessandra i Dardanoni (1959)¹ da je specifična antigena komponenta patogene treponeme smještena površno, dok se grupno specifični antigen nalazi nešto dublje i stupa u reakciju fluorescentnog testa samo ako je struktura treponeme znatno izmijenjena. Ova izmjena strukture može se postići i dodatkom lizozima, koji ima razarajuće djelovanje na ovojnicu patogene *T. pallidum*; međutim, povećanjem djelovanja lizozima povećava se i reaktivnost seruma koji sadrži nespecifična antitijela.

ZAKLJUČAK

1. Djelovanjem lizozima na *Treponema pallidum* povećava se nespecifičnost fluorescentnog (FTA) testa.

2. Upliv lizozima na antigenu reaktivnost *Treponema pallidum* ovisi o starosti suspenzije treponema. Djelovanje lizozima je jače izraženo u svježoj suspenziji treponema nego u starijoj.

MIRA NADAŽDIN and ERNEST I. GRIN

INFLUENCE OF LYSOZYMES UPON THE ANTIGENIC REACTIVITY OF *TREPONEMA PALLIDUM* IN THE FLUORESCENT ANTIBODY TEST (FTA)

SUMMARY

Comparative investigations have been carried out in respect of the antigenic reactivity of *T. pallidum* in FTA_s and FTA-ABS test under influence of lysozyme.

The analysis were performed on 30 sera which were TPI, FTA₂₀₀ and STS negative.

It could be demonstrated by this investigations, that suspensions of Treponemes treated with lysozyme in the FTAs and FTA-ABS test acquire the ability to bind the group specific antibodies and to produce more biologic false positive results than suspensions without addition of lysozyme.

It could be further shown that the effect of lysozyme on the antigenic reactivity of Treponemes depends also on the age of the respective Treponeme suspension. In fresh suspensions the effect of lysozyme is more intensive than in the older one.

LITERATURA

1. D'Alessandro G. and Dardanoni L.: Treponemal antigens and syphilis serology. IN/VDT/127 (1959).
2. Metzger M.: Lysozyme activity of rabbit sera and testicular tissue fluid during the development of syphilitic lesions. WHO/VDT/RES/37, 1—10 (1963).
3. Metzger M. and Ruczkowska J.: Influence of lysozyme upon the reactivity of Treponema pallidum in the fluorescent antibody reaction. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 12, 702—708 (1964).
4. Metzger M.: A one-day Treponema pallidum immobilization test. Bull. Wld. Hlth. Org., 32, 357—362 (1965).
5. Metzger M. and Podwinska J.: Studies of the mechanism of development of agglutinability of pathogenic Treponema pallidum accelerating effect of some proteolytic and mucopolysaccharide — splitting enzymes. WHO/VDT/RES/72, 1—16 (1965).
6. Nadaždin M.: Značaj sorbirajućih materija u fluorescentnom treponemnom apsorpcionom testu. Med. arhiv, XXIV, 3—6, 101—104 (1970).
7. Ovčinnikov N. and Podwinska J.: The effect of lysozyme and temperature upon acceleration of Treponema pallidum immobilization test. Vestn. dermat. vener., 11, 67—69 (1968).
8. Stout G. et al.: Preparation and standardization of the sorbent used in the fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-ABS) test. Hlth. Lab. Sci., 4, 1, 5—8 (1968).