

# PATOLOGIA I TERAPIA

MARIAN GRUNDBOECK

## Serologiczna diagnostyka enzootycznej białaczki bydła

Z Pracowni Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach

### Zastosowanie różnych odczynów serologicznych

Próby serologicznego rozpoznawania białaczki bydła czynione były od szeregu lat. Schwerdt (19) w 1963 r. używał do tego celu odczynu precipitacji posługując się jako antygenem wyciągami z białaczkowo zmienionych bydłych węzłów chłonnych. Próby te, niestety nie dały pozytywnych wyników. Wielkie nadzieje wiązano później z odczynem lateksowym, który po raz pierwszy do rozpoznawania białaczki bydła usiłował zastosować Lehnert (9). Cząsteczki lateksu opłaszczal on wyciągiem z bydłowej tkanki białaczkowej. Spośród szeregu publikacji, które się pojawiły na temat tego odczynu, na uwagę zasługuje doniesienie Egorovej i Prituły (2). Autorzy ci stwierdzili, że w białaczkowych stadach dodatnie wyniki testu wykazuje 17—67% pogłowia, podczas gdy w stadach wolnych od tej choroby omawiany odsetek pozostaje w granicach 0—5%. Podobne wyniki uzyskał w RFN Schmidt (18), jednakże wykazał on nieswoisty dla białaczki charakter tego odczynu.

Dopiero Miller i wsp. (10) w USA uzyskali w hodowli limfocytów z krwi chorego na białaczkę bydła intensywną replikację wirusa białaczki bydła, co pozwoliło na sporządzenie bardziej stężonych wyciągów antygenowych. Wyciągi te w odczynie immunodiffuzji reagowały z surowicami zwierząt wykazujących hematologiczne lub kliniczne objawy białaczki oraz z surowicami owiec zakażonych doświadczalnie wirusem białaczki bydłowej. Ujemne wyniki odczynu uzyskano natomiast przy użyciu surowic bydła ze stad wolnych od białaczki oraz surowic zwierząt wykazujących sporadyczną postać choroby (11). Odczyn immunodiffuzji w żelu agarozowym lub agarowym znalazł zastosowanie w szeregu ośrodków naukowych zajmujących się białaczką bydła, przy czym poszczególni badacze wprowadzali modyfikacje w metodzie przygotowania antygeny oraz w technice wykonania odczynu. Przedmiotem prac była również chemiczna charakterystyka antygenów. Z cząsteczek wirusa udało się wyodrębnić kilka białek o antygenowym charakterze a mianowicie: polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 24 000, inny polipeptyd o ciężarze 12 800—15 500 oraz glikoproteid o ciężarze 60 000 daltonów (7, 8, 13).

Do rozpoznawania białaczki bydła zastosowano również z powodzeniem odczyn wiązania dopełniacza (12). Odczyn ten pozwala na szybkie sprawdzenie obecności wirusa w hodowlach komórkowych, a także na wykrycie swoistych przeciwciał w surowicach podejrzanych o zakażenie lub chorych zwierząt. Samo wykonanie odczynu nie odbiega od ogólnie przyjętego wzoru. Przy badaniu surowic bydłych okazuje się jednak niezbędne używanie dopełniacza świnki morskiej z 5% dodatkiem nieinaktywowanej surowicy bydłowej oraz zastosowanie około 18-godzinnej inkubacji odczynu. W przypadku badania surowic owczych wystarcza inkubacja 2-godzinna. Toteż do określania zakażenia hodowli komórek szczególnie nadaje się surowica owiec doświadczalnie zakażonych omawianym wirusem. Odczyn wiązania dopełniacza podobnie jak odczyn immunodiffuzji rozpowszechnił się w licznych ośrodkach badawczych zajmujących się białaczką bydła.

Próby zastosowania odczynów immunofluorescencyjnych do badań nad omawianą chorobą czynił już Tolle w 1961 r. (20). Do sporządzania preparatów używał on świeżych tkanek z bydła chorego na białaczkę lub z myszy, które próbowano zakażać komórkowym materiałem białaczki bydłowej. U myszy tych uzyskano rozwój bliżej niezidentyfikowanych proliferacji tkanki limfatycznej, dających się przeszczepiać na inne zwierzęta. Pośredni odczyn fluoryzujących przeciwciał z użyciem surowic chorych na białaczkę krów wykazywał w preparatach ogniska fluorescencji, znajdujące się nie tylko w limfocytach, lecz również w osoczu krwi względnie w płynach tkankowych oraz w czerwonych krwinkach. W świetle późniejszych prac, uzyskane przez Tollego wyniki należy uznać za nieswoiste dla omawianej choroby. Przeniesienie procesu białaczkowego z krowy na mysz wydaje się bardzo mało prawdopodobne, a opisany obraz fluorescencji nie znalazł potwierdzenia w późniejszych badaniach.

Swoisty dla wirusa białaczki bydłowej odczyn immunofluorescencyjny udało się uzyskać dopiero 11 lat później Ferrerowi i wsp. (4). W badaniach tych zastosowano zarówno bezpośrednią jak i pośrednią technikę odczynu. Intensywnie fluoryzowała zaródź komórek z krótko-

trwałych hodowli limfocytów krwi białaczkowych zwierząt, jak również zaródź komórek białaczki bydłowej, utrzymywanych w hodowli w licznych pasażach. Ressang i wsp. (17) do immunofluorescencyjnego wykrywania przeciwciał w surowicach krwi używali linii komórkowej, wykazującej jednowarstwowy charakter wzrostu w hodowli i stale produkującej wirus białaczki. Linię tę uzyskano drogą kokultywacji komórek płuc płodu bydłowego z limfocytami krwi chorej na białaczkę krowy. Preparatów do odczynu nie przygotowano poprzez naniesienie zawiesiny wyhodowanych już komórek na szkiełka mikroskopowe, jak to ma miejsce przy hodowli limfocytów w zawieszynie, lecz komórki pokrywały powierzchnię tych szkiełek, namnażając się w trakcie hodowania. Uzyskany w tych warunkach obraz fluorescencyjny był analogiczny, jak w odczynach opisanych przez Ferrera i wsp.

Z innych technik immunofluorescencyjnych, użytych w badaniach nad białaczką bydła, na uwagę zasługuje odczyn wykonywany w zawieszynie żywych komórek. Badania przy użyciu tej metody przeprowadziła Egorova (1), uzyskując zadowalające wyniki.

Zdaniem autorów zachodniemieckich (6) najczulszym testem immunofluorescencyjnym w diagnostyce białaczki bydła jest odczyn z użyciem konjugatu przeciw dopełniaczowi surowicy człowieka. W metodzie tej, będącej szczególną postacią odczynu pośredniego, na preparat szkiełkowy z badanymi komórkami nakrapla się kolejno: inaktywowaną surowicę bydłą zawierającą przeciwciała przeciw wirusowi białaczki bydła, następnie świeżą surowicę człowieka i na koniec wyżej wymieniony konjugat. Obraz fluorescencyjny uzyskany w ten sposób jest podobny, jak w zwyczajnym odczynie pośrednim.

Przeprowadzono również udane próby zastosowania do diagnostyki omawianej choroby pośredniego odczynu immunoperoksydazowego (17). Odczyn ten jest podobny do pośredniego odczynu immunofluorescencyjnego. Ponieważ konjugat nie zawiera tutaj fluorochromu lecz peroksydazę, dającą się potem swoiście wybarwiać, badania przy użyciu tej metody można prowadzić w jasnym polu zwyczajnego mikroskopu.

#### **Ocena serologicznej metody rozpoznawania białaczki bydła oraz poszczególnych technik badawczych**

Badania wykazały, że występowanie swoistych przeciwciał przeciw wirusowi białaczki bydłowej w surowicy zwierząt jest wskaźnikiem aktualnie istniejącego zakażenia tym wirusem. Wielu badaczy stwierdziło, że w hodowli limfocytów serologicznie dodatnich zwierząt z reguły można wykazać obecność onkornawirusa, podczas gdy zwierzęta reagujące

ujemnie są wolne od zakażenia. Według wyników uzyskanych przez Ferrera i wsp. (5) zgodność między dodatnimi odczynami immunofluorescencyjnymi a dodatnimi wynikami badania wirusologicznego osiąga 90%. Badanie serologiczne daje dodatnie wyniki niemal we wszystkich klinicznych przypadkach białaczki bydła za wyjątkiem zachorowań młodych zwierząt zaliczanych do sporadycznej postaci choroby. U bydła z białaczkowych stad dodatnie odczyny serologiczne występują nie tylko u przeważającej większości zwierząt z przewlekłą limfocytozą, lecz również u niektórych sztuk nie wykazujących jakichkolwiek objawów choroby.

Påulsen i wsp. (16) posługując się testem immunodyfuzji w żelu stwierdzili w białaczkowym stadzie bydła 92% dodatnich wyników wśród sztuk z przewlekłą limfocytozą, a 19% u zwierząt hematologicznie ujemnych. Parodi i wsp. (15) w analogicznej sytuacji wykazali odczynem wiązania dopełniacza 74,5% dodatnich wyników u sztuk hematologicznie dodatnich, 54% u podejrzanych a 25% u sztuk z prawidłowym obrazem krwi. Ferrer i wsp. (3) w czterech dotkniętych białaczką stadach bydła stwierdzili pośrednim odczynem immunofluorescencyjnym obecność swoistych przeciwciał w surowicy u 80—100% sztuk z limfocytozą oraz u 25—76% zwierząt z prawidłowym poziomem limfocytów.

Ressang i wsp. (17) przeprowadzili porównawcze badania serologiczne w grupie bydła liczącej 516 sztuk, wśród których limfocytozę wykazywało około 4% zwierząt. Odczynem immunodyfuzji w żelu wykazano 8,5% dodatnich wyników, odczynem wiązania dopełniacza 9%, pośrednim odczynem immunoperoksydazowym 11,2%, a pośrednim odczynem immunofluorescencyjnym 13%. Jak widać, mikroskopowe testy diagnostyczne oparte na znakowanych przeciwciałach wykazują większą czułość niż inne. Nie można jednakże ograniczyć się wyłącznie do tych metod. Do badania jednorodności i tożsamości serologicznej preparatów antygenowych, zwłaszcza polipeptydów i glikoproteidów, bardziej odpowiedni jest odczyn immunodyfuzji w żelu.

Zaletą metod serologicznych jest nie tylko duża swoistość i czułość, lecz również zdolność wczesnego wykrywania choroby, ponieważ przeciwciała zwykle pojawiają się 2—3 miesiące po zakażeniu (13). Również w czasie remisji zmian klinicznych i hematologicznych może utrzymywać się wysokie miano przeciwciał (4).

#### **Wykorzystanie metod serologicznych w rutynowej diagnostyce i w badaniach naukowych**

Serologiczne rozpoznawanie białaczki bydła w niektórych państwach jest już wykorzystywane w praktyce. Serologiczne odczyny, dzięki zaletom przedstawionym w poprzednim rozdziale, stanowią cenne uzupełnienie morfologicznych badań krwi zwłaszcza przy rozpoznawaniu cho-

roby u poszczególnych zwierząt. Metody te powinny zabezpieczyć prawidłowy z epizootiologicznego punktu widzenia obrót zwierzętami w skali krajowej i między państwowej. Nadto uwalnianie stad od białaczki w oparciu o metody serologiczne powinno być łatwiejsze i skuteczniejsze, ponieważ zostanie nie tylko uściślona selekcja wśród dorosłego pogłowia, lecz również można będzie ze stad eliminować zakażoną młodzież.

Metody serologiczne stwarzają nadto nowe możliwości w badaniach nad białaczką bydła, zwłaszcza jej etiologią, patogenezą, epizootiologią czy nawet epidemiologią. Prace doświadczalne, w których podaje się zwierzętom wirus białaczki bydłowej pozwalają na wykazanie zakażenia przy użyciu metod hematologicznych po upływie przynajmniej 2—3 lat. Natomiast metody serologiczne mogą dostarczyć analogicznych informacji po upływie paru miesięcy.

Sporny problem możliwości zakażenia różnych gatunków zwierząt bydłym wirusem białaczki został w znacznym stopniu wyjaśniony dzięki metodom serologicznym. Okazało się, że nie tylko bydło, lecz również owce i kozy reagują na wprowadzenie wirusa produkcją swoistych przeciwciał, co jest wskaźnikiem zaistniałego zakażenia. O zakażeniu tych zwierząt świadczy również obecność cząsteczek onkornawirusa w hodowlach limfocytów z ich krwi oraz rozwijanie się u niektórych sztuk klinicznego obrazu choroby. Olson i Baumgartener (14) podawali wirus białaczki bydłowej myszom, świnkom morskim, szczurom, chomikom, kotom, świnom, psom oraz ptakom nie stwierdzając pojawienia się u tych zwierząt swoistych przeciwciał. Dlatego niespodzianką było stwierdzenie swoistych przeciwciał po doświadczalnym podaniu szympansom wirusa białaczki bydłowej (21). Badania wirusologiczne nie wykazały jednak replikacji czynnika zakaźnego w organizmie tych zwierząt, a wyniki badań hematologicznych i klinicznych pozostawały w granicach normy. Przeprowadzone badania nie wykazały zatem zakażenia się małym bydłym onkornawirusem. Van Der Maaten i Miller (21) na podstawie prac własnych i innych badaczy stwierdzili, że dotychczasowe badania serologiczne ludzi nie wykazały przeciwciał reagujących z antygenami wirusa białaczki bydłowej, co może być uważane za wskaźnik odrębności etiologicznej białaczek ludzi i bydła.

Metody serologiczne stanowią niewątpliwie dalszy krok w doskonaleniu rozpoznawania białaczki bydła. Ostateczna ocena diagnostycznej wartości tych metod nie została jeszcze dokonana. Różne odczyny serologiczne dają w pewnym odsetku sprzeczne wyniki. Badania serologiczne są nadto znacznie kosztowniejsze od badań hematologicznych. Dlatego też nie trzeba się spodziewać rychłego zmięczenia morfologicznych badań krwi. Badania te wspierane metodami se-

rologicznymi będą nadal podstawowym testem rozpoznawczym, służącym do epizootiologicznej oceny stad.

#### Piśmiennictwo

1. Egorova W. D.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 30, 1974 (8).
2. Egorova W. D., Pritula L. M.: Veterinarija, Moskwa 30, 1967 (4).
3. Ferrer J. F., Abt D. A., Bhatt D. M., Marshak R. R.: Cancer Res. 34, 893, 1974.
4. Ferrer J. F., Avila L., Stock N. D.: Cancer Res. 32, 1864, 1972.
5. Ferrer J. F., Bhatt D. M., Abt D. A., Marshak R. R., Baliga V. L.: Cornell Vet. 65, 527, 1975.
6. Frenzel B., Mussgay M., Schneider L. G., Straub O. C.: Zentbl. Vet. Med. B. 22, 519, 1975.
7. Gilden R. V., Long C. W., Hanson M., Toni R., Chapman H. P., Oroszlan S., Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: J. gen. Virol. 29, 305, 1975.
8. Kaaden O. R., Dietschold B., Frenzel B., Mussgay M., Seraub O. C., Weiland F.: Vet. Microbiol. 1, 121, 1976.
9. Lehnert E.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77, 113, 1964.
10. Müller J. M., Miller L. D., Olson C., Gillette K. G.: J. natn. Cancer Inst. 43, 1297, 1969.
11. Miller J. M., Olson C.: J. natn. Cancer Inst. 49, 1459, 1972.
12. Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: J. natn. Cancer Inst. 53, 1699, 1974.
13. Müller J. M., Van Der Maaten M. J.: Vet. Microbiol. 1, 195, 1976.
14. Olson C., Baumgartener L. E.: Comp. Leukemia Res. 1975, Bibl. haemat. no. 43, 255, 1976.
15. Parodi A. L., Levy D., Guillemain B., Irgens K.: Bull. Off. int. Epizoot. 85, 275, 1976.
16. Paulsen J., Kuwitsky S., Schliesser Th.: Zentbl. Vet. Med. B. 20, 696, 1973.
17. Ressang A. A., Ellens D. J., Mastenbroek N., Quak J., Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: Zentbl. Vet. Med. B. 23, 566, 1976.
18. Schmidt F. W.: Zentbl. Vet. Med. B. 15, 174, 1968.
19. Schwerdt H.: Versuche über die Brauchbarkeit der Präzipitationsreaktion zur Diagnose der Rinderleukose. Praca doktorska. Tierärztl. Hochschule, Hannover 1963.
20. Tolle A.: Dt. tierärztl. Wschr. 68, 193, 1961.
21. Van Der Maaten M. J., Müller J. M.: Vet. Microbiol. 1, 351, 1976.

Adres autora: prof. dr Marian Grundboeck, ul. 22 Lipca 3 m. 13, 24-100 Puławy.

**RIVETZ B., BOGIN E., HORSTEIN K., MERDINGER M.:** Zmiany biochemiczne w surowicy krwi u kur w przebiegu zakażenia szczepami wirusa choroby Newcastle o różnej zjadliwości. Zmiany w białkach surowicy, kwasie moczowym, lipidach i elektrolitach. (Biochemical changes in fowl serum during infection with strains of Newcastle disease virus of differing virulence. Changes in serum proteins, uric acid, lipids and electrolytes). Res. vet. Sci. 22, 185—191, 1977 (3).

Kurczęta w wieku 5—6 tygodni rasy Leghorn-New Hampshire zakażono domięśniowo w dawce  $10^3$  EID<sub>50</sub> lentogenicznym szczepem LaSota, mezogenicznym szczepem Vineland-Izrael 3089 względnie welogenicznym szczepem Izrael 1967. Próbkę krwi pobierano z serca przed zakażeniem i w okresie 10 dni po zakażeniu. W surowicy krwi oznaczono zawartość białka całkowitego, albumin, globulin, kwasu moczowego, lipidów, cholesterolu, wapnia, magnezu, sodu i potasu. U kurcząt zakażonych szczepem welogenicznym poziom białka całkowitego i albumin obniżał się o 20%, lipidów o 46%, cholesterolu o 21% po 48 godz. po zakażeniu. Jednocześnie występował istotny wzrost poziomu kwasu moczowego w surowicy (61%) po 72 godz. po zakażeniu. Badane parametry nie zmieniały się w sposób istotny w surowicy kurcząt zakażonych szczepem mezogenicznym wirusa choroby Newcastle. U kurcząt zakażonych szczepem lentogenicznym wzrastała zawartość cholesterolu i kwasu moczowego. Maksymalne wartości tych składników notowano po 48 godz. po zakażeniu. U wszystkich zakażonych ptaków poziom potasu w surowicy spadał, przy czym po zakażeniu szczepem mezogenicznym lub lentogenicznym wynosił on 31% po 72 godz. po zakażeniu.

G.