

ANDRZEJ SALWA

Próba oceny metody cytochemicznej i mikroilościowej testu redukcji NBT

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

Powszechnie wiadomo, że intensyfikowanie produkcji zwierzęcej zwiększa ryzyko zachwiania równowagi fizjologicznej organizmów zwierzęcych. Nowe technologie chowu wywołują liczne zaburzenia przemiany materii, stanowiące tło przyczynowe takich zjawisk, jak: pogorszenie wydajności i rozrodczości, rodzenie słabego potomstwa oraz osłabienie odporności na choroby zakaźne.

Badania nad wpływem zaburzeń metabolicznych na zdolności obronne włączono do badań algorytmicznego programu diagnostycznego w stadach krów mlecznych, realizowanego przez Oddział Weterynaryjnej Ochrony Produkcji Zwierzęcej ZHW w Gdańsku (13, 14).

W praktyce weterynaryjnej przyjęto empirycznie, że zaburzenia metaboliczne stanowią często pierwotną przyczynę osłabienia odporności zwierząt na zakażenie. W piśmiennictwie zagadnieniu temu przypisuje się niewielką wagę, a badania odnoszą się prawie wyłącznie do zagadnień empirycznych i epizootycznych.

Jedną z metod badania nieswoistej odporności komórkowej jest test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT), zastosowany po raz pierwszy przez Parka i wsp. w 1968 r. (8). Test ten pozwala na ocenę funkcji fagocytów w procesie odporności. Istota testu polega na wnikięciu do komórki podczas fagocytozy błękitu nitrotetrazoliowego i jego redukcji do formazanu NBT. Barwnik jest redukowany w układzie enzymatycznym wewnątrzkomórkowego unieszkodliwiania drobnoustrojów, a kompleks barwny odkłada się w postaci złożeń w cytoplazmie.

Jak dotąd niewiele jest danych na temat zastosowania testu redukcji NBT w diagnostyce weterynaryjnej. Poli i wsp. stosowali ten test w wykrywaniu zakażeń bakteryjnych u psów i kotów (9, 10). Renshaw i wsp. w 1977 r. zastosowali test NBT w klinicznych przypadkach zespołu granulocytopenii u psów (12).

W Polsce Nikolańczuk w 1978 r. przedstawiła wyniki testu redukcji NBT zastosowanego do oceny funkcji granulocytów obojętnochłonnych u cieląt w pierwszych dniach życia (6).

Test wykonywany jest dwoma podstawowymi metodami: cytochemiczną wg Parka i wsp. (8) i ilościową opracowaną przez Baehnera i Nathana (1). Metoda cytochemiczna wraz z jej modyfikacjami (2, 19), polega na inkubacji mieszaniny krwi z roztworem NBT i wykonaniu preparatu mikroskopowego, w którym oblicza się odsetek granulocytów zawierających złoże formazanu NBT. Zmodyfikowaną metodą cytochemiczną posługiwała się m.in. Nikolańczuk (7). W 1968 r. Baehner i Nathan (1) opracowali metodę

ilościową, która polegała na inkubacji wyizolowanych granulocytów obojętnochłonnych z roztworem NBT i ekstrakcji powstałego formazanu NBT z komórek rozpuszczalnikiem organicznym w temp. 100°C. W 1974 r. Raman i Poland (11) opisywali nową metodę mikroilościową. Posługiwali się nią m.in. Sychłowy i Lukas (18).

Celem podjętych badań własnych było określenie praktycznej przydatności testu NBT wykonywanego metodami cytochemiczną i mikroilościową.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 78 krowach mlecznych rasy ncb, klinicznie zdrowych, w wieku 3 lat, pochodzących z 3 stad PGR. Krew żyłą pobierano jałowo do próbek plastikowych lub silikonowanych z heparyną (20 j.m./ml krwi). Badania wykonywano po upływie 2—3 godz. od pobrania krwi.

Metodę cytochemiczną stosowano wg Parka i wsp. (8). Krew pełną w ilości 0,1 ml mieszano w równej objętości z 0,2% roztworem NBT w PBS o pH 7,2. Próbki inkubowano przez 15 min. w temp. 30°C i przez 15 min. w temp. pokojowej. Następnie wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych, które utrwalano alkoholem metylowym i barwiono odczynnikiem Giemsy. Preparaty oglądano pod immersją, obliczając odsetek granulocytów obojętnochłonnych, zawierających wyrażony formazan.

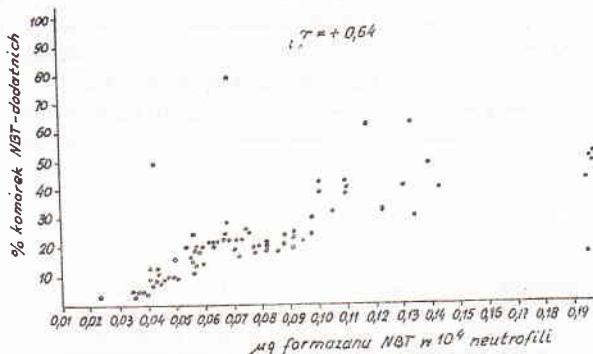
Metodę mikroilościową wykonywano wg Sychłowego i Lukas (18). Krew pełną w ilości 0,1 ml mieszano z 0,1 ml 0,2% roztworu NBT w PBS o pH 7,2. Próbki inkubowano przez 15 min. w temp. 37°C i przez 15 min. w temp. pokojowej. Po inkubacji do mieszaniny dodawano rozpuszczalnik formamid i wytrząsano przez okres 5 min. Po odwirowaniu mierzone natężenie powstałego zabarwienia na spektrofotometrze „Specol” wobec próby zerowej, przy długości fali 546 nm. Zawartość μg formazanu NBT w leukocytach powstałego po inkubacji odczytywano z wykresu kalibracyjnego. Następnie ilość formazanu NBT przeliczano na $\mu\text{g}/10^4$ granulocytów/min.

Wyniki i omówienie

W celu dokonania oceny metod obliczono podstawowe wartości statystyczne (ryc. 1). W metodzie cytochemicznej średnia arytmetyczna \bar{x} wynosiła 24, przy odchyleniu standardowym $s=15$. W metodzie mikroilościowej średnia arytmetyczna wynosiła $\bar{x}=0,079$ przy odchyleniu standardowym 0,041. Współczynnik korelacji (r), będący odzwierciedleniem zależności między wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu obu metod wyniósł +0,64.

Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że wyniki obu metod uzyskane przez różnych autorów nie są jednakowe. Raman i Poland (11) wykazali korelację wyższą, w której $r=+0,94$, natomiast w pracy Sychłowego i Lukas (18), korelacja była niska. Istota tych rozbieżności jest prawdopo-

dobnie spowodowana tym, że stężenie formazanu NBT określane w metodzie mikroilościowej nie ma ścisłego związku z odsetkami komórek NBT dodatnich oznaczonych w metodzie cytochemicznej. Wśród komórek NBT dodatnich znajdują się fagocyty zawierające różne ilości formazanu NBT (18). Ponadto na wyniki uzyskane w metodzie mikroilościowej mogą rzutować nieznaczne ilości formazanu NBT wytwarzane przez monocyty i płytki krwi, nie uwzględniające w metodzie cytochemicznej (5).



Ryc. 1. Schemat zależności między wynikami testu redukcji, NBT wykonanego metodą cytochemiczną i metodą mikroilościową

Ilość komórek NBT dodatnich świadczy o aktywności komórkowego systemu obrony nieswoistej. Przyjęto, że prawidłowa liczba komórek NBT dodatnich w organizmie zdrowym wynosi około 10% (8). W badaniach własnych stwierdzono u pewnej grupy krów zwiększony odsetek komórek formazanowych pomimo, że próbki krwi pochodziły od krów, u których nie stwierdzono objawów chorobowych. Przy doborze krów nie uwzględniano jednak możliwości występowania zaburzeń podklinicznych. Można więc przypuszczać, że oprócz czynników zakaźnych i ewidentnych chorób klinicznych, występują jeszcze inne czynniki, które także mogą wpływać na metabolizm fagocytów. Przypuszczenie to, odnoszące się do podklinicznych zaburzeń homeostazy wymaga uściśleń i stanowi przedmiot badań własnych.

Wyniki przeprowadzonych badań zdają się potwierdzać dane piśmiennictwa (3, 4, 15, 16, 17), że metoda cytochemiczna, mimo swej prostoty w wykonaniu, posiada pewne mankamenty. Należy do nich zaliczyć przede wszystkim skłonność krwinek do tworzenia aglomeratów, które opadają na dno próbówki i utrudniają prawidłowe wykonanie preparatu. Ponadto, przy wykonywaniu preparatu komórki mogą ulegać uszkodzeniu, a to sprawia, że kompleks barwny NBT wydostaje się na zewnątrz, co zmniejsza liczbę rejestrowanych komórek formazanowych. Dodatkowe trudności ze znalezieniem odpowiedniej ilości granulocytów występują w przypadkach granulocytopenii oraz u bydła.

Test redukcji NBT wykonywany metodą mikroilościową zdaje się mieć pewną przewagę nad metodą klasyczną Parka i wsp. Zaletą metody

mikroilościowej jest większy obiektywizm w ocenie wyników, gdyż odczyt odbywa się przy użyciu kolorymetru (5). Metoda jest jednak bardziej czasochłonna i być może dlatego nie zawsze zalecana.

Wnioski

1. Metoda cytochemiczna jest metodą prostą i szybką w wykonaniu, jednak stwarza możliwości popełnienia błędów, wynikającego z subiektywizmu badań mikroskopowych preparatu.

2. Metoda mikroilościowa pozwala na większy obiektywizm w ocenie wyniku, dzięki zastosowaniu kolorymetrii.

3. Stwierdzono, że we krwi niektórych krów klinicznie zdrowych ma miejsce wzrost komórek NBT dodatnich. Można przypuszczać, że jest to spowodowane występowaniem chorób podklinicznych. Przypuszczenie to stanowi przedmiot dalszych badań.

Piśmiennictwo

- Baehner R. L., Nathan D. C.: N. Engl. J. Med. 278, 971, 1968.
- Gifford R. H., Malawista S. E.: J. Lab. clin. Med. 75, 511, 1970.
- Gordon A. M., Rowan R. M., Brown T., Carson H. G.: J. clin. Path. 26, 52, 1973.
- Graham R. C.: N. Engl. J. Med. 288, 970, 1973.
- Luce J. K., Tan J. S., Watanakunakoru C.: Am. J. Med. 58, 685, 1975.
- Nikolajczuk M.: Arch. Immunol. Ther. Exp. 26, 1, 1978.
- Nikolajczuk M.: Medycyna Wet. 35, 604, 1979.
- Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M.: Lancet 22, 532, 1968.
- Polí G., Nicoletti, Faravelli G.: Folia Vet. Lat. 3, 215, 1973.
- Polí G., Mantelli F.: Clinica vet. 8, 241, 1974.
- Raman U., Poland R. L.: Pediatr. Res. 9, 334, 1975.
- Renshaw H. W., Chatburn C., Bryan G. M., Bartsch R. C., Davis W. C.: J. Am. med. Ass. 166, 5, 443, 1975.
- Rutkowiak B.: Medycyna Wet. 35, 287, 1979.
- Rutkowiak B., Wolańczyk-Rutkowiak K.: Mat. XXI Światowego Kongr. Wet. Moskwa 5, 43, 1979.
- Salwa A.: Mat. Sesji Nauk. PTNW o/Gdańsk, Nowećin 69, 1979.
- Segal A. W.: Lancet 2, 1248, 1974.
- Szczylik C., Górnaś P., Carewicz R.: Diag. Lab. 15, 1, 1979.
- Sychłowy A., Lukas A.: Pol. Tyg. lek. 33, 45, 1978.
- Windhorst D. B., Holmes B., Good R. A.: Lancet 1, 737, 1967.

Adres autora: lek. wet. Andrzej Salwa, ul. Stryjewskiego 21/34, 80-625 Gdańsk.

Сальва А. — Попытка оценки цитохимического и микроколичественного методов теста редукции нитротетразольного синия.

Сравнивались цитохимический и микроколичественный методы теста редукции нитротетразольного синия, примененного в оценке фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов у клинически здоровых молочных коров из стад госхозов.

Полученные результаты показали, что микроколичественный метод является более объективным благодаря применению колориметрии и показывает хорошо корреляцию с цитохимическим методом ($r = +0.64$). В исследованиях обнаружилось появление повышенных значений теста редукции нитротетразольного синия, не нашедших обоснования в клинической картине.

Salwa A. — Appraisal of cytochemical and microquantitative test of NBT reduction.

Cytochemical and microquantitative NBT tests were compared in reference to the phagocytic activity of neutral granulocytes in normal cows of large scale breeding. It was found that microquantitative method was more objective due to colorimetry application and showed a good correlation with cytochemical method ($r = +0.64$). The examinations revealed an increased values of NBT test which did not find the confirmation in clinical pictures of the animals.