

ANTONINA SOPIŃSKA

## Przydatność testu NBT do badań aktywności metabolicznej granulocytów krwi obwodowej karpia\*

Zakład Chorób Ryb Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Test redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT) opiera się na określeniu natężenia procesów oksydoredukcyjnych w cytoplazmie leukocytów krwi obwodowej. Pobudzenie leukocytów jest reakcją na obecne w ustroju czynniki bakteryjne, pasożytnicze lub kompleksy immunologiczne. Aktywność metaboliczna granulocytów odgrywa dużą rolę w procesie fagocytozy, a tym samym w mechanizmach obronnych organizmu.

Ocenę redukcji błękitu nitrotetrazolowego można przeprowadzić metodą cytochemiczną lub spektrofotometryczną. Istotą metody cytochemicznej testu redukcji NBT wprowadzonego do badań przez Parka i wsp. (6) jest redukcja barwnika w komórkach fagocytycznych, która objawia się zmianą jego zabarwienia. Obserwuje się wówczas w mikroskopie świetlnym czarne złoże formazanu w cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych i monocytów. Wynik podaje się w postaci procentu komórek ze złożami (komórki NBT+) na 100 liczonych komórek fagocytycznych.

Metodę spektrofotometryczną zwaną mikroilościową metodą redukcji NBT wprowadzili Bacher i Nathan (2). Została ona później zmodyfikowana przez Ramana i Polanda (8).

Test NBT jest obecnie dość często stosowanym badaniem w diagnostyce niektórych stanów patologicznych u ludzi (2, 3, 5, 12, 14) przy wykrywaniu utajonych infekcji przed operacją dzieci (15, 16), a także ma on zastosowanie w medycynie weterynaryjnej (7, 9, 10).

Celem pracy była ocena obu metod badania aktywności metabolicznej granulocytów krwi obwodowej karpia w zależności od pór roku i temperatury oraz w stanie choroby.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 220 karpach pochodzących z gospodarstw rybactwa województwa lubelskiego. Po 2-tygodniowym okresie adaptacji ryb do warunków akwariowych, do badań pobierano krew z serca, do próbek silikonowych z heparyną (10 j/ml).

Uzyskany materiał poddawano badaniom testowym NBT, wykonując reakcje spontaniczne i stymulowane lateksem.

W I części pracy zastosowano metodę cytochemiczną redukcji NBT jako najczęściej stosowaną (6). Używając do testu krwi rybiej należało wprowadzić modyfikację dotyczącą przedłużonego czasu inkubacji mieszaniny krwi z barwnikiem nitrotetrazolowym. Badania przeprowadzono wiosną, latem, jesienią i zimą u ryb w wieku 9, 12, 16 i 18 miesięcy. Po jednogo-

dzinnej inkubacji w temperaturze 25°C, probówkę delikatnie mieszano i wykonywano rozmaz. Po zabarwieniu odczynnikiem Mansona obliczano odsetek komórek ze złożami zredukowanego barwnika (komórki NBT+) na 100 leukocytów fagocytycznych.

W II części pracy zastosowano metodę mikroilościową redukcji NBT według Ramana i Polanda (8), z użyciem N, N-dwumetyloformamidu do ekstrakcji formazanu. Krew pobierano od ryb w wieku 9 miesięcy (narybek) oraz 17 miesięcy (kroczek). Próbkę krwi wraz z barwnikiem NBT inkubowano w temperaturze 4°C, 10°C, 15°C, 25°C, 37°C w ciągu 1 godziny. Ten czas inkubacji był przedłużony w porównaniu z metodą Ramana i Polanda, co okazało się konieczne w wyniku badań własnych. Ekstynkcję odczytywano na spekułu Carl Zeiss-Jena przy długości fali 546 nm wobec próby ślepej. Granulocyty reagowały z barwnikiem zarówno spontanicznie, jak i po stymulacji lateksem. Każde badanie powtarzano trzykrotnie.

W III części pracy wykonano test redukcji NBT metodą mikroilościową u ryb chorych na erythrodermatitis, botriocefalozę i branchionekrozę. W tej części pracy ryby kontrolne oraz ryby chore były w zbliżonej grupie wiekowej 9–11 miesięcy. Ryby kontrolne nie wykazywały żadnych zmian chorobowych. U ryb chorych na erythrodermatitis obserwowano znaczne zmiany skórne w postaci przekrwień, wybroczyn oraz głębokich owrzodzeń. Przy podejrzeniu botriocefalozy po pobraniu krwi, dokonywano sekcyjnie kontroli zarażenia. Do badań wykorzystywano krew pochodzącą wyłącznie od ryb, u których w przewodzie pokarmowym stwierdzono obecność tasiemców (7–15 sztuk). Zmiany kliniczne karpia chorych na branchionekrozę wskazywały na formę ostrą tej choroby. Obserwowano obrzęk tkanki skrzelowej, wybroczyny, przekrwienia i zwiększoną ilość śluzu na powierzchni skrzelii. Uzyskane wyniki w tej części pracy poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta.

### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania cytochemiczne tes-

Tab. 1. Wyniki cytochemicznego testu NBT u karpia w okresie rocznym (%)

Okres badania	Liczba ryb	Komórki formazanowe			
		Reakcja spontaniczna		Reakcja stymulowana	
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Wiosna (luty, marzec)	24	5,25	2,85	18,54	5,95
Lato (czerwiec, lipiec)	20	17,55	3,79	38,80	6,66
Jesień (październik)	28	18,28	4,48	32,85	4,63
Zima (grudzień)	15	6,93	1,94	12,38	2,93

\*) Praca finansowana przez Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie.

Tab. 2. Wpływ temperatury inkubacji na wyniki mikroilościowego testu NBT u karpia (ekstynkcja przy dł. fali 546 nm)

Miary statystyczne	Narybek (n=30)									
	4°C		10°C		15°C		25°C		37°C	
	sp.	st.	sp.	st.	sp.	st.	sp.	st.	sp.	st.
$\bar{x}$	0,158	0,414	0,258	0,760	0,372	0,978	0,419	1,131	0,506	0,754
s	0,061	0,064	0,065	0,140	0,068	0,171	0,060	0,228	0,163	0,232
Kroczek (n=30)										
$\bar{x}$	0,115	0,380	0,329	0,504	0,438	0,942	0,472	1,030	0,780	1,335
s	0,025	0,057	0,052	0,068	0,083	0,129	0,082	0,160	0,106	0,139

Objaśnienia: sp: — reakcja spontaniczna, st. — reakcja stymulowana.

tu NBT w różnych porach roku (tab. 1) wykazały, że uzyskane wartości wyraźnie zależą od stanu fizjologicznego ryb w danym sezonie roku. W przebiegu reakcji spontanicznej w okresie zimy i wczesnej wiosny, kiedy procesy metaboliczne są znacznie obniżone również aktywność granulocytów i monocytów jest znacznie niższa. Każdorazowe podanie lateksu zwiększało aktywność fagocytujących leukocytów. Dość duży rozrzut uzyskanych wyników w każdym okresie badania (tab. 1) sugeruje, że przypuszczalnie nie zawsze komórki traktowane jako NBT+ były nimi rzeczywiście. W piśmiennictwie spotyka się liczne doniesienia o fałszywie dodatnich i ujemnych wynikach testu ocenianego według cytochemicznej metody Parka i wsp. (4, 5, 12, 13).

Dokładniejszą od cytochemicznej metody okazała się metoda mikroilościowa Ramana i Polanda redukcji NBT przez granulocyty. Wpływ różnych temperatur inkubacji rzutuje na wartości ekstynkcji formazanu w sposób wyraźny (tab. 2). W granicach temperatur 15—25°C wartości te są zbliżone. Zarówno u ryb młodszych jak i starszych skrajnie niskie wartości i skrajnie wysokie otrzymano w temperaturze 4°C i 37°C. Uzyskane wyniki wskazują, że u ryb test ten należałoby wykonywać w zakresie temperatur 15—25°C.

Zastosowanie mikroilościowej metody testu NBT w diagnostyce niektórych chorób ryb (cz. III pracy) dało pozytywne rezultaty. Średnia arytmetyczna wyników (tab. 3) uzyskanych od ryb w grupie kontrolnej wynosiła  $0,366 \pm 0,093$ . Wartości te były zbliżone do uzyskanych od ryb badanych w II cz. pracy (tab. 2). W grupie II ryb z wyraźnymi objawami wskazującymi na *erythrodermatitis* średnia wyników była w porównaniu z grupą I istotnie wyższa  $0,824 \pm 0,187$  ( $p < 0,01$ ). W grupie III ryb z objawami *botriocefalozji* wartość ekstynkcji wykazała również cechy statystycznej istotności ( $p < 0,01$ ). Wynik ten świadczy o tym, że czynnik pasożytniczy nie powoduje tak silnej stymulacji aktywności metabolicznej granulocytów jak czynnik bakteryjny. W grupie IV ryb z objawami *branchionekrozy* uzyskano wartości ekstynkcji wynoszące dla

Tab. 3. Zestawienie wyników testu mikroilościowego NBT przy *erythrodermatitis* (II), *botriocefalozji* (III), *branchionekrozie* (IV) (ekstynkcja przy dł. fali 546 nm)

Grupa	Liczba badanych ryb	$\bar{x} \pm s$	Wartości skrajne
I Kontrola	10	0,366 <sup>a</sup> 0,093	0,200—0,470
II	14	0,824 <sup>b</sup> 0,187	0,650—1,200
III	30	0,526 <sup>c,d</sup> 0,144	0,300—0,650
IV	18	0,271 <sup>a,d</sup> 0,145	0,080—0,550

Objaśnienie: a, b, c — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,01$ .

średniej arytmetycznej  $0,271 \pm 0,145$ . Są to wartości niskie świadczące o obniżonej aktywności metabolicznej granulocytów ryb chorych na tę chorobę. Porównanie tych wartości u ryb z infekcją bakteryjną (*erythrodermatitis*) i inwazją pasożytniczą (*botriocefalozja*) świadczy o braku stymulacji aktywności metabolicznej przez czynnik etiologiczny *branchionekrozy*. Wyniki te sugerują, że czynnik ten nie jest tła bakteryjnego oraz, że test NBT jest szczególnie przydatny do oceny wzmożonej aktywności komórkowej granulocytów w przebiegu infekcji bakteryjnej. Duży rozrzut (0,080—0,550) wyników w grupie IV świadczy o tym, że materiał ten nie był jednorodny. Nie można wykluczyć, że u ryb tej grupy zmiany kliniczne były wywołane różnymi czynnikami etiologicznymi.

## Wnioski

1. Metoda mikroilościowa redukcji NBT jest czulsza i dokładniejsza od metody cytochemicznej; pozwala ona na stwierdzenie wyraźnej zależności pomiędzy aktywnością metaboliczną granulocytów a temperaturą inkubacji próbek krwi z barwnikiem NBT; inkubacja ta powinna być prowadzona w temperaturze 15°C—25°C.

2. Aktywność metaboliczna granulocytów określana testem NBT wzrasta wyraźnie pod wpływem działania lateksu. Świadczy to o możliwości wywołania stymulacji obrony komórkowej u karpia pod wpływem tego czynnika, a także o możliwości oceny jej testem NBT.

3. U karpia zdrowych najwyższa aktywność metaboliczna granulocytów oceniana testem NBT występuje latem i jesienią.

4. Test redukcji NBT, wykonany zwłaszcza metodą mikroilościową, jest szczególnie przydatny do oceny aktywności obrony komorkowej u karpia w przebiegu infekcji bakteryjnych.

#### Piśmiennictwo

1. Ashburn P.: Blood 41, 921, 1973.
2. Baetner R. L., Nathan D. G.: N. Engl. J. Med. 278, 971, 1968.
3. Editorial: Lancet 2, 909, 1971.
4. Milios J. W.: New Engl. J. Med. 49, 287, 1972.
5. Park B. H.: J. Pediatr. 76, 376, 1971.
6. Park B. H., Furling S. M., Smithwick E. M.: Lancet 2, 532, 1968.
7. Poli G., Faravelli G.: Clinica Vet., Milano 87, 248, 1974.
8. Raman U., Poland R. L.: Pediatr. Res. 9, 334, 1975.
9. Renshaw H. W., Ecoland W. P., Thacker D. L., Frank F. W.: Am. J. vet. Res. 31, 1287, 1976.
10. Salwa A.: Medycyna Wet. 38, 582, 1982.
11. Sychtowy A.: Pol. Tyg. lek. 28, 264, 1973.
12. Sychtowy A.: Pediatr. pol. 169, 1975.
13. Sychtowy A., Lukas A.: Pol. Tyg. lek. 33, 45, 1978.
14. Szczepanski Z., Sychtowy A.: Pol. Tyg. lek. 40, 1548, 1972.
15. Wojciechowski T. H., Przybos-Fabiszewska R.: Pol. Tyg. lek. 29, 1105, 1974.
16. Wojciechowski T. H., Górska M., Przybos-Fabiszewska R.: Pol. Tyg. lek. 30, 1403, 1975.

Adres autora: dr Antonina Sopińska, ul. Przędowników Prace 34/25, 21-040 Swidnik

Сопинская А. — Пригодность теста NBT для исследования метаболической активности гранулоцитов периферической крови карпов

Исследовалась метаболическая активность периферической крови здоровых и больных карпов цитохимическим методом и спектрофотометрическим методом редукции NBT.

У здоровых карпов выполнялся тест редукции NBT цитохимическим методом в разные времена года. Оценивалась метаболическая активность гранулоцитов в покое, а также после стимуляции латексом. Наивысшая активность отмечалась летом

и осенью. В каждое время года наблюдался ее рост после стимуляции латексом.

Спектрофотометрическим методом редукции NBT отмечено отчетливую зависимость метаболической активности гранулоцитов от температуры инкубации проб крови с красителем NBT. Полученные результаты показывают, что у рыб инкубацию следует проводить в диапазоне температур 15—25°C.

Исследования метаболической активности гранулоцитов карпов тестом NBT в ходе эритродерматита, бронхонекроза и ботрицефаллеза показывают, что этот тест особенно пригоден в ходе бактериальной инфекции.

Результаты собственных исследований являются доказательством пригодности теста NBT для оценки метаболической активности гранулоцитов крови карпов.

Sopińska A. — The usefulness of the NBT test in the studies of metabolic activity of blood granulocytes in the carp

The metabolic activity of granulocytes of the peripheral blood taken from normal and diseased carps was assessed by means of cytochemical and spectrophotometric method of NBT reduction. In healthy carps the cytochemical reduction test of NBT was performed in different seasons of a year. The metabolic activity of granulocytes was examined in the state of repose and after stimulation with latex. The highest activity was observed in summer and autumn. In each season it grew after stimulation with latex. A distinct dependence of metabolic activity of granulocytes upon the incubation temperature of blood samples with NBT was noted using spectrophotometric method. The findings indicate that the temperature of incubation in fish should fluctuate between 15° and 25°C. The examinations of metabolic activity by the NBT test in the course of erythrodermatitis, bronchionecrosis and botrioccephalosis give evidence that this test is particularly useful in case of bacterial infections. The results of own examinations confirm the usefulness of the NBT test for metabolic assessment of granulocytes of the carp.

GABEL G., MARTENS H.: Absorpcja magnezu ze związku jałówek. (Magnesium absorption from the rumen of heifers). Zbl. Vet. Med. A, 32, 636—639, 1985 (8).

Absorpcja magnezu z przedzoiłdków przeżuwaczy odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stężenia fizjologicznego tego pierwiastka we krwi. Tempo absorpcji Mg ze związku-czepca przebadano u 2 jałówek z przetoką górnego odcinka żwacza. Jałowkom podano 2 l wody z dodatkiem 80—900 mM MgCl<sub>2</sub> i Ch-EDTA (jako rozpuszczalny marker) do dolnego odcinka żwacza. Stosunek Mg:Cr po 6 h wynosił przy dawce 80 mM Mg 0,34±0,12, przy dawce 140 mM Mg 0,26±0,08, przy dawce 300 mM Mg 0,48±0,08, 600 mM Mg 0,63±0,11 i przy dawce 900 mM Mg 0,62±0,1, co wskazuje na adsorpcję Mg ze związku.

G.

GAJADHAR A. A., CARON J. P., ALLEN J. R.: Kryptosporidioza u dwóch źrebiąt. (Cryptosporidiosis in two foals). Can. vet. J. 26, 132—134, 1985 (4).

Oocysty Cryptosporidium sp. stwierdzono przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego w rozmazach z osadu kału poddanego flotacji, pochodzącego od dwóch źrebiąt. U jednego źrebięcia w wieku 7 dni wystąpiło osłabienie, utrata laktowania i śpiączki, którą przypisano posocznicy. Pomimo zastosowania antybiotyków źrebię padło. W skrawkach jelit cienkich w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykazano obecność Cryptosporidium sp. w komórkach nabłon-

ka kosmków jelitowych. U drugiego źrebięcia z biegunką o miernym nasileniu wystąpiło samowyleczenie. Badania kału przeprowadzone po miesiącu nie wykazały obecności oocyst paszyty.

G.

ABDELSALAM E. B., FAROL E. J. H.: Prawidłowa aktywność esterazy w płazmie, pełnej krwi i w tkankach bydła. (Normal esterase activity in the plasma, whole blood and in tissues of cattle). Zbl. Vet. Med. A, 32, 518—525. 1985 (7).

Esterazy stanowią dużą grupę enzymów które występują w tkankach zwierząt, roślin i w drobnoustrojach. Katalizują one hydrolizę estrów aromatycznych i alifatycznych, tioestrów i amidów różnych substancji, w tym związków fosforoorganicznych. We wszystkich tkankach buhajków i cieląt występuje aktywność eksterazy cholinowej. Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w mózgu (cielęta 3—6 mies. 3,28±0,5, buhajki 1—2 lat 3,34±0,6 mM(min/g), w jeli- tach cienkich (odpowiednio 3,50±0,7 i 3,80±0,9 mM (min/g), w nerkach (0,86±0,3 i 0,88±0,1 mM(min/g), sercu (0,82±0,1 i 0,8±0,1 mM(min/g) i w mięśniach przepony (0,85±0,1 i 0,81±0,1 mM(min/g). Najwyższą aktywność karboksylesterazy występowała w wątrobie (cielęta 300,83±33,7, buhajki 394,69±29,14 mM (min/g), najniższa w płazmie krwi (cielęta 0,35±0,1, buhajki 0,33±0,1 mM(min/g).

G.