MARIA PROST, ANTONINA SOPIŃSKA

Ocena aktywności komórkowych procesów obronnych u karpi chorych na saprolegniozę, po leczeniu zielenią malachitową i zastosowaniu preparatu immunostymulującego

Zakład Chorób Ryb Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Saprolegnioza, czyli pleśniawka, jest często występującą chorobą karpi hodowlanych, pojawiającą się zwłaszcza w wyniku uszkodzeń powłok ciała w czasie zabiegów wykonywanych w przebiegu cyklu hodowlanego (odłów, transport). Najczęściej stosowanym i skutecznym środkiem leczniczym do zwalczania tej grzybicy jest zieleń malachitowa. Lecznicza kąpiel ryb w wodnym roztworze tego środka o odpowiednim stężeniu może być stosowana zarówno w basenach po odłowie ryb ze stawów, jak i bezpośrednio w stawach. Środek ten jest również stosowany do zwalczania pleśniawki ikry (przede wszystkim ikry łososiowatych), a także przeciw niektórym chorobom bakteryjnym i pierwotniaczym ryb. Jest to związek toksyczny zarówno dla ryb, jak i ludzi wykonujących zabieg leczniczy u ryb oraz, jak wykazały niektóre badania (3), mający własności mutagenne. Pomimo tego ze względu na dobrą skuteczność i brak innych leków o podobnym działaniu, lek ten jest powszechnie stosowany w gospodarstwach rybnych w wielu krajach przy zachowaniu ostrożności w czasie kontaktu z nim ludzi oraz w dawkowaniu dla ryb.

Celem pracy było określenie wpływu na aktywność obronnych procesów komórkowych karpia następujących czynników:

— stanu chorobowego — saprolegniozy
— środka leczniczego — zieleni malachitowej
— środka immunostymulującego, który mógłby pobudzić aktywność obronną oraz w wyniku tego spowodować szybszy efekt terapii i powrót ryby do dobrego stanu zdrowotnego.

Do podjęcia badań i realizacji postawionego celu skłoniły nas wyniki otrzymane w uprzednio wykonanej pracy dotyczącej aktywności komórkowych procesów immunologicznych u karpi dotkniętych inwazją pijawek, leczonych Neguvonem i poddanych działaniu preparatu immunostymulującego (1), które wykazały negatywny wpływ inwazji na aktywność obronną, supresyjne działanie leku oraz korzystny wpływ immunostymulacji na proces likwidacji skutków choroby.

Materiał i metody

Materiałem do badań było 50 sztuk narybku (K_1) karpia o masie 120—150 g, pochodzącego z gospodarstwa w Dębicy (woj. lubelskie), wykazującego obecność na skórze licznych, białych grzybni *Saprolegnia* oraz 10 sztuk karpia o podobnej wadze, pochodzących z gospodarstwa w Podlodowie (woj. lubelskie), nie zakażonych tymi grzybami.

Ocenę komórkowej aktywności obronnej karpi doświadczalych i kontrolnych przeprowadzono przy pomocy testu NBT określającego aktywność metaboliczną granulocytów obojętnochłonnych zmodyfikowanego według własnych badań (2), testu rozetowego E określającego liczbę form rozetowych tworzonych przez limfocyty T oraz przy pomocy badania cytochemicznego określającego obecność α-naftyloesterazy w błonach komórkowych limfocytów T. Jako badanie pomocnicze pozwalające pośrednio sądzić o odpowiedzi obronnej ryb wykonano obliczenie ogólnej liczby leukocytów oraz liczby neutrocytów we krwi badanych ryb.

Do kąpieli leczniczej karpi chorych na pleśniawkę użyto krystalicznej zieleni malachitowej w stężeniu 1 g na 150 l wody. Czas kąpieli wynosił 1 godzinę. Stężenie to i czas ekspozycji są powszechnie stosowane dla karpi w gospodarstwach stawowych. Temperatura płynu leczniczego wynosiła 15°C.

Do immunostymulacji użyto preparatu Lewamizol firmy Jansen. Środek ten jest stosowany u zwierząt domowych jako lek przeciwrobaczy oraz jako stymulator komórek efektorowych biorących udział w zjawiskach odpornościowych, szczególnie limfocytów T i fagocytów. Podawano go rybom dootrzewnowo w ilości 0,1 mg dla jednej ryby lub w kąpieli w roztworze wodnym o stężeniu 75 mg na 75 l wody trwającej 4 dni. Dawka dootrzewnowa Lewamizolu oraz stężenie tego środka w kąpieli były określone na podstawie własnych wstępnych badań nad wpływem środków immunostymulujących na organizm ryb.

Ryby podzielono na następujące grupy, z których każda zawierała 10 sztuk narybku: I — kontrolna — ryby zdrowe, II — ryby z wyraźnymi objawami pleśniawki, III — ryby z pleśniawką kąpane w roztworze zieleni malachitowej, IV — ryby z pleśniawką kąpane w zieleni malachitowej i poddane po 24 godzinach immunostymulacji Lewamizolem podanym dootrzewnowo, V — ryby z pleśniawką nie leczone, poddane immunostymulacji Lewamizolem w kąpieli, VI — ryby z pleśniawką nie leczone, poddane immunostymulacji Lewamizolem podanym dootrzewnowo.

Materiał do badań z krwi ryb grupy III pobierano po 7 dniach od wykonania kąpieli leczniczej, z krwi ryb grup IV i VI również po 7 dniach od wykonania immunostymulacji dootrzewnowej, zaś z krwi ryb grupy V po 3 dniach po immunostymulacji Lewamizolem w kąpieli. Postępowanie to jako najkorzystniejsze ustalono we wstępnych badaniach własnych.

Ogólną liczbę krwinek białych obliczano w 1 m^3 krwi w sposób rutynowy. Bezwzględną liczbę neutrocytów w mm^3 krwi oceniano na podstawie odsetka neutrocytów obliczanego z rozmazu zabarwionego odczynnikiem May-Grunwalda-Giemzy. Aktywność metaboliczną granulocytów obojętnochłonnych określano przy użyciu testu NBT, aktywność immunologiczną limfocytów T oceniano na podstawie testu rozetowego E, zaś procent limfocytów T w krwi reagujących pozytywnie na obecność α-naftyloesterazy w ich błonach komórkowych określano metodą cytochemiczną ANAE. Wszystkie te metody opisano w uprzednich badaniach własnych (2).

Tab. 1. Wyniki badań własnych ($\bar{x} \pm s$)

Grupy badawcze	Liczba leukocytów w 1 mm³ krwi	Liczba neutrocytów w 1 mm³ krwi	mg formazanu NBT w próbie 1 mm³ krwi	mg formazanu NBT w 10^6 neutrocytów	Liczba rozetek E na 500 limf.	Procent limfocytów ANAE+
I	19300 2055,8 a	1346,2 433,1 a	0,077 0,005 a	0,654 0,306 a	4,98 1,89 a	56,38 9,04 a
II	51600 3657 b	19573 4007 b	0,056 0,003 a	0,029 0,005 b	36,87 5,95 b	40,46 6,47 b
III	31800 4147 a	8984 2246 a	0,027 0,003 a	0,030 0,007 a	9,1 3,15 a	54,36 9,92 a
IV	47530 4792 b	9192 196,07 b	0,078 0,005 b	0,088 0,022 b	27,87 2,92 b	64,62 6,95 b
V	67400 3565 a	15529 3739 a	0,078 0,005 a	0,052 0,013 a	47,44 3,30 a	76,07 8,37 a
VI	58700 5207 a	6514 2388 b	0,080 0,009 a	0,142 0,060 b	47,11 9,42 a	73,52 7,53 a

Objaśnienia: we wszystkich grupach doświadczalnych istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ zaznaczono różnymi literami (a b), brak istotności jednakowymi literami (a a); porównania dokonano między grupami: I i II, III i IV oraz V i VI.

Z uzyskanych wyników obliczano średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe oraz wykonano statystyczne porównanie wyników przy pomocy testu t Studenta na poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki (tab. 1) wskazują, że w przebiegu saprolegniozy (porównanie grup I i II) następuje uaktywnienie się układu białokrwinkowego wyrażające się zwiększeniem liczby ogólnej leukocytów oraz liczby neutrocytów, a także spadek aktywności metabolicznej neutrocytów i spadek procentu limfocytów T. W przebiegu intensywnej produkcji krwinek białych w stanie chorobowym, co świadczy o mobilizacji mechanizmów obronnych, następuje przypuszczalnie produkcja licznych form niedojrzałych tych krwinek, które odznaczają się niską aktywnością metaboliczną wykazaną testem NBT. O mobilizacji komórkowego układu obronnego w stanie choroby świadczy znaczny wzrost tworzonych przez limfocyty T form rozetowych. Trudno jednakże wyjaśnić zmniejszenie się procentu limfocytów T wykazanego testem ANAE.

Zieleń malachitowa powoduje obniżenie się ogólnej liczby krwinek białych oraz neutrocytów i bardzo znaczne obniżenie liczby form rozetowych (grupy II i III). Mogłoby to świadczyć o obniżeniu aktywności obronnej, czyli działaniu immunosupresyjnym tego leku, jednakże wyniki otrzymane przy pomocy testu NBT oraz testu ANAE nie potwierdzają tego działania zieleni malachitowej.

Immunostymulacja zastosowana po leczeniu zielenią malachitową powoduje statystycznie istotny wzrost ogólnej liczby leukocytów oraz neutrocytów, a także istotny wzrost aktywności neutrocytów obojętnochłonnych, liczby rozet tworzonych przez fimfocyty T oraz procentu limfocytów T pozytywnie reagujących na test ANAE (grupy III i IV).

Zastosowanie Lewamizolu w kąpieli i iniekcji u ryb chorych nie leczonych (grupy V i VI) wykazało, że oba te sposoby podania wykazują podobną skuteczność. Z wyjątkiem wyników otrzymanych testem NBT wszystkie pozostałe wartości uzyskane przy pomocy pozostałych użytych w pracy metod ulegają po immunizacji znacznemu wzrostowi (grupy V i VI) w porównaniu do tych wartości w grupie ryb leczonych i stymulowanych (grupa IV). Na tej podstawie można sądzić, że efekt immunostymulacji jest zmniejszany działaniem środka leczniczego, tj. zieleni malachitowej.

Pozytywny wpływ Lewamizolu na chore ryby wyrażał się również bardziej widoczną i szybciej postępującą likwidacją grzybni na powierzchni ciała oraz znacznie lepszą kondycją ryb niż w grupach nie poddanych immunostymulacji. Infekcja grzybicza u wszystkich ryb eksperymentalnych była bardzo zaawansowana, a ryby słabe. W czasie wykonywania badań u grup nie poddanych immunostymulacji notowano śnięcia, natomiast w grupach po podaniu Lewamizolu śnięcia nie wystąpiły.

Wnioski

1. W przebiegu procesu chorobowego wywołanego przez infekcję grzybów z rodzaju *Saprolegnia* następuje uaktywnienie komórkowych procesów immunologicznych karpia.
2. Lewamizol jest skutecznym preparatem immunostymulującym u karpia. Oprócz działania stymulującego aktywność obronną ma on również pozytywny wpływ na przebieg zejścia procesu chorobowego.
3. Ze względu na podobieństwo efektu działania Lewamizolu po podaniu rybom w kąpieli i w iniekcji, do praktycznego użycia można polecić kąpiel ryb z tym środkiem.
4. Ze względu na różnice otrzymanych wyników zastosowanymi metodami trudno jest jednoznacznie wnioskować o immunosupresyjnym działaniu zieleni malachitowej. Konieczne są na ten temat dalsze badania przy użyciu jeszcze innych metod.

Piśmiennictwo

1. *Prost M., Sopińska A.:* Medycyna Wet. 44, 455, 1988.
2. *Sopińska A.:* Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
3. *Steffens W., Lieder U., Nehring D., Hatlop H. W.:* Z. Fisch. 10, 745, 1962.

Adres autora: prof. dr hab. Maria Prost, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Prost M., Sopińska A. — **Evaluation of the activity of cellular protective reactions in the carp with saprolegnia infection after treatment with malachite green and immunostimulation**

The effect of saprolegnia infection, therapy using malachite green and application of Lewamisole as a stimmulant on the activity of cellular protective mechanisms in the carp was evaluated. Three methods were used in experimentations: the NBT to determine a metabolic activity of neutrophils, rosette E test to check a number of rosettes produced by T lymphocytes, cytochemic method to detect the presence of alpha-naphylesterase in membranes of T lymphocytes. Moreover, a total number of blood leukocytes and neutrophils was determined.

It was found that: 1) fungal infection stimmulates immunological cellular reactions 2) Lewamisole appeared to be an effective immunostimulant which affected positively the course and descent of infection 3) in practice the fish may be bather in Lewamisole solution insted of intraperitoneal injection of this immunostimulant because both ways of this drug application gave a comparable results 4) immunosuppresive action of malachite green due to some discrepancies of results (table 1) may not be univocally stated.

JANUSZ WAWRZKIEWICZ, KRYSTYNA WAWRZKIEWICZ

Krzyżowe reakcje immunologiczne u cieląt po szczepionkach przeciwko grzybicy skórnej*)

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

Od dawna wiadomo, że budowa antygenowa dermatofitów jest bardzo złożona i że zawiera zarówno grupowo swoiste, jak i gatunkowo specyficzne frakcje (5, 6, 7). Jednak dopiero wyraźny postęp w technikach immunologicznych przyczynił się znacznie do dokładniejszego poznawania tej struktury.

Andrieu i wsp. (1) analizując, przy użyciu immunoelektroforezy, skład antygenowy różnych gatunków dermatofitów wykazali, w zależności od szczepu, od 10 do 20 różnych frakcji antygenowych. Christiansen i Svejgaard (3) liczbę tę znacznie podwyższyli stwierdzając za pomocą immunoelektroforezy ilościowej u *T. rubrum* i *M. canis* 35, u *T. mentagrophytes* 26 i u *E. fluccosum* 25 odmiennych komponentów antygenowych. Późniejsze badania tych samych gatunków, przeprowadzone z zastosowaniem krzyżowej elektroforezy przez Montclos i Guinet (9) pozwoliły na wykazanie jeszcze od 15 do 20 dodatkowych antygenów. Obecność wspólnych antygenów warunkuje międzygatunkowe krzyżowe reakcje serologiczne (12, 13, 16) i zjawiska krzyżowej nadwrażliwości (2, 10, 23).

Pozostaje jednak nadal do wyjaśnienia zagadnienie, czy antygeny grzybowe uczulające limfocyty T, odpowiedzialne za alergię typu późnego, są sprzężone z frakcjami antygenowymi indukującymi odporność komórkową, czy też stanowią odmienne ugrupowania.

Jak dotąd opracowano i wprowadzono do praktyki weterynaryjnej między innymi szczepionkę LTF-130 (15) i Trichovac — zawierające atenuowane szczepy *Trichophyton verrucosum*, wakcynę SP-1 ze szczepu *Trichophyton equinum* przeciwko trychofitozie koni (11) oraz szczepionkę Mentavac TM-135 opartą na immunogennym szczepie *Trichophyton mentagrophytes* (8, 14). Wszystkie te preparaty stanową żywe szczepionki, odrębne dla każdego gatunku zwierząt, o stosunkowo dużej skuteczności w przypadkach infekcji homologicznym gatunkiem grzyba. Nasuwa się pytanie, jak kształtują się zjawiska odpornościowe u immunizowanych zwierząt w przypadku zakażenia heterologicznymi dermatofitami.

Obecne badania miały na celu prześledzenie krzyżowych reakcji immunologicznych u cieląt, którym podano inaktywowane szczepionki przeciwko trychofitozie bydła, a następnie zakażano sztucznie różnymi gatunkami dermatofitów.

Materiał i metody

Szczepy. Do produkcji szczepionek wykorzystano krajowe szczepy *Trichophyton verrucosum* 43 (szczep izolowany od bydła w 1974 r.), 53 (szczep izolowany od bydła w 1988 r.), *T. mentagrophytes* 1 (szczep izolowany od bydła w 1983 r.) i 37 (szczep izolowany od człowieka w 1988 r.) oraz szczep *T. mentagrophytes var. granulosum* 58 (szczep izolowany od człowieka w 1984 r.). Dodatkowo do próby challenge używano szczepu *T. verrucosum* „Z" o sprawdzonej zjadliwości (szczep izolowany od bydła w 1984 r.).

Szczepionki. Inaktywowane szczepionki, przygotowane wg metody podanej przez autorów (18), stosowano dwukrotnie domięśniowo w odstępie 10-dniowym w dawkach po 6 ml na sztukę.

Test skórny. W próbie skórnej stosowano alergeny stanowiące filtraty 4-miesięcznych hodowli szczepów *T. verrucosum* 43, *T. mentagrophytes* 1 i *T. mentagrophytes var. granulosum* 58 na cukrowym podłożu Sabourauda. Alergeny podawano śródskórnie w okolicy szyi w ilości 0,4 ml, a wyniki odczytywano po 24 godzinach. Różnice w grubości fałdu skórnego powyżej 3 mm traktowano jako wynik dodatni.

Próba challenge. Do inokulacji zwierząt stosowano stałą objętość wystandaryzowanych zawiesin szczepów *T. verrucosum* „Z", *T. mentagrophytes* 1 i *T. mentagrophytes var. granulosum* 58, zawierających wzrastającą liczbę komórek grzyba, co odpowiadało w przybliżeniu od 10 do 10 000 minimalnym dawkom zakażającym (19). Poszczególne zawiesiny nanoszono na depilowaną i dodatkowo podrażnioną mechanicznie skórę. Każde zwierzę inokulowano równocześnie dwoma różnymi szczepami (na 1 boku badano 1 szczep),

*) Badania finansowane w ramach programu RR—II—24.