

19. Santos Y., Tornanzo A. E., Barja J. L., Nieto T. P., Villa T. G.: Infect. Immun. 56, 3285, 1988.  
 20. Sanayal S. C., Agarwal R. K., Annapurana E.: Indian J. Med. Res. 78, 324, 1983.  
 21. Sukroongreung S., Nilakul C., Tantimavanichs S.: Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 3, 330, 1983.  
 22. Wadström T., Ljungh A., Wretling B.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. 84, 112, 1976.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Anusz, ul. Dybowskiego 7, p. 1, 10-738 Olsztyn-Kortowo 2

STANISŁAW KLIMENTOWSKI

## Wpływ zakażeń BLV i rozwijającego się procesu białaczkowego na zawartość immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów i ich płodów

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

### Summary

**The influence of Bovine leukemia virus and developing leukemic process on the content of G, M and A immunoglobulin classes in sera of cows and their foetuses**

Sera of 51 cows, including 8 cows with a nodular form of epizootic bovine leukemia, from cowsheds of a high percent of BLV infection (more than 80%) and their foetuses have been examined. The presence and content of IgG, IgM and IgA in sera of cows and their foetuses was determined by the method of a radial single immunodiffusion using standard kits (Miles). The highest content of IgG (1946 mg/100 ml) was noted in sera of cows with a sub-clinic form of leukemia and the lowest one (1579 mg/100 ml) in seropositive cows. However, these differences were not statistically significant. The level of serum IgM was significantly higher in healthy cows (536 mg/100 ml) and in sera of seropositive cows (486 mg/100 ml) comparing to cows with a permanent lymphocytosis (419 mg/100 ml) and with histopathological lesions (441 mg/100 ml). The content of IgA ranged in all groups from 57 to 60 mg/100 ml.

In a group of foetuses from cows with a permanent lymphocytosis the level of serum IgM was higher (13.9 mg/100 ml) comparing to other groups (16.5–17.6 mg/100 ml). A slightly higher level of all immunoglobulin classes was observed in seropositive foetuses against EBL.

Dotychczasowe badania nad zawartością immunoglobulin w surowicy krwi bydła białaczkowego dostarczyły sprzecznych wyników. Trainin i wsp. (27) stwierdzili u 80% bydła z postacią guzowatą białaczki brak IgM. Pierce i wsp. (19) badając 289 krów białaczkowych wykazali u wszystkich obecność przeciwciał klasy G i M. Matthaeus i Straub (12) na 16 krów mlecznych z guzowatą postacią białaczki i 23 krowy z trwałą limfocytozą wykazali w przypadkach wyraźnych zmian guzowatych obecność IgM. Natomiast w badaniach Atluru i wsp. (1) oraz ostatnio Gatei i wsp. (5) zdrowe zwierzęta wykazały istotnie wyższy poziom IgM w surowicy krwi niż krowy z trwałą limfocytozą. Z kolei zawartość IgG była wyższa u zwierząt z trwałą limfocytozą w porównaniu z bydlęciem zdrowym i guzowatą postacią białaczki.

Reasumując można stwierdzić, że przeprowadzone dotychczas badania nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na zmiany zawartości immunoglobulin u bydła w przebiegu EBB.

Celem pracy było określenie wpływu zakażeń BLV i rozwijającego się procesu białaczkowego na zawartość immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów.

### Material i metody

Materiał do badań stanowiły surowice krwi pobrane od 51 krów i ich płodów, w tym od 8 krów z guzowatą postacią EBB, pochodzących z obór o wysokim odsetku (ponad 80%) zakażeń BLV. Krew do badań pobierano podczas uboju sanitarnego w wybranych rzeźniach województwa wrocławskiego.

Do badań jakościowych i ilościowych immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów zastosowano gotowe zestawy firmy „Miles” do pojedynczej immunodifuzji radialnej wg metodycznych przesłanek Faheya i Manciniego (4, 10). Zawartość IgG mierzono w przedziale między 500–4000 mg/100 ml, wykorzystując w tym celu 4 surowice standardowe IgG zawierające 500, 1000, 2000 i 4000 mg/100 ml. Zawartość IgM mierzono w przedziale między 60–520 mg/100 ml, wykorzystując w tym celu 4 surowice standardowe IgM zawierające 60, 130, 260 i 520 mg/100 ml. Zawartość IgA mierzono w przedziale 50–400 mg/100 ml wykorzystując 4 surowice standardowe IgA zawierające 50, 100, 200 i 400 mg/100 ml. Gotowe płytki z agarozą zawierały bydłce monospecyficzne surowice anty-IgG, -IgM i -IgA. Do dołków w żelu agarozowym dokładnie odmierzano surowice standardowe i badane przy użyciu mikropipet. W przypadku IgG objętość ta wynosiła 2,5 µl, a przy IgM i IgA — 10 µl. Po 18 godz. (przy IgG) lub 22 godz. (przy IgM i IgA) inkubacji w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej odczytywano średnicę kręgów precypitacyjnych w mm. Na podstawie wartości surowic standardowych, wykorzystując regresję liniową sporządzono krzywą wzorcową, z której odczytywano wartości dla badanych surowic. Surowice krwi krów rozcieńczano do ww. badań w stosunku 1:4, natomiast surowice płodów zagęszczano 10-krotnie poprzez liofilizację.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie obliczając średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe oraz istotność różnic pomiędzy dwoma średnimi testem t-Studenta przy  $p < 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań jakościowych i ilościowych zawartości immunoglobulin klasy G, M i A w surowicy krwi krów-matek i ich płodów przedstawiono w tabeli 1. Zawartość IgG była najwyższa (1946 mg/100 ml) u krów z subkliniczną postacią choroby (grupa III), a najniższa (1579 mg/100 ml) u krów z dodatnimi wynikami badań serologicznych (grupa II), przy czym różnice te nie były statystycznie istotne. Pozostałe grupy krów (I i IV) wykazywały wartości pośrednie. Poziom IgM był znacznie wyższy u krów zdrowych (grupa I) — 536 mg/100 ml i wykazujących dodatnie wyniki badań serologicznych (grupa II) — 486 mg/100 ml, w porównaniu do krów grupy III wykazujących trwałą limfocytozę (419 mg/100 ml) i zmiany histopatologiczne (grupa IV) — 441 mg/100 ml. Wykazana najniższa zawartość IgM u krów z limfocytozą (grupa III) — 419 mg/100 ml różniła się

Tab. 1. Zawartość immunoglobulin w surowicy krwi krów-matek oraz ich płodów ( $\bar{x} \pm s$ )

Grupy zwierząt	Zawartość immunoglobulin w mg/100 ml					
	IgG		IgM		IgA	
	matki	płody	matki	płody	matki	płody
Grupa I Krowy z ujemnym wynikiem serolog. i hematol. n = 7	1741 ± 272	33,6 ± 5,5	536 <sup>a</sup> ± 65	17,0 ± 5,0	57,0 ± 9,4	1,9 ± 0,4
Grupa II Krowy z wynikiem serol. dodatnim i hematol. ujemnym n = 7	1579 ± 798	27,3 ± 7,6	486 <sup>a</sup> ± 179	17,6 ± 4,0	59,5 ± 6,1	1,6 ± 0,3
Grupa III Krowy z dodatnim wynikiem serol. i hematol. n = 16	1946 ± 356	29,1 ± 9,2	419 <sup>b</sup> ± 200	13,9 ± 4,8	57,8 ± 4,3	1,7 ± 0,6
Grupa IV Krowy z dodatnim wynikiem badania histopat. n = 12	1802 ± 495	31,0 ± 9,2	441 <sup>a</sup> ± 154	16,5 ± 5,0	60,0 ± 6,0	1,9 ± 0,9

Objaśnienie: średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$ .

statystycznie istotnie od wartości uzyskanych u krów zdrowych (grupa I) i serologicznie dodatnich (grupa II). Zawartość IgA nie wykazywała większych różnic, a jej średni poziom w poszczególnych grupach wahał się w granicach 57,0—60,0 mg/100 ml. Określając zawartość immunoglobulin u płodów podzielonych na grupy wg wyników badań diagnostycznych uzyskanych u krów-matek nie stwierdzono między nimi istotnych różnic. Jedynie w grupie płodów pochodzących od matek z trwałą limfocytozą (grupa III) wykazano niższą zawartość IgM (13,9 mg/100 ml) w porównaniu do pozostałych grup (16,5—17,6 mg/100 ml).

W tab. 2 przedstawiono zawartość immunoglobulin klas G, M i A u płodów podzielonych na grupy wg uzyskanych u nich wyników badań diagnostycznych. Nieznacznie wyższe poziomy immunoglobulin wszystkich klas zaobserwowano u płodów serologicznie dodatnich w kierunku EBB (grupa II), jednak różnice te nie były statystycznie istotne.

Badania nad zachowaniem się immunoglobulin w przebiegu białaczki były przedmiotem wielu prac. W 1968 r. Trainin i wsp. (28, 29, 30) wykazując immunoelektroforetycznie w 80% brak IgM w surowicy krwi bydła z przewlekłą limfocytozą i postacią guzową EBB oraz za pomocą immunofluorescencji selektywny niedobór produkcji IgM przez komórki węzłów chłonnych i śledziony, wyrazili optymistyczny pogląd wskazujący na możliwość wykorzystania tego wskaźnika do diagnostyki białaczek. Również w trakcie immunizowania bydła białaczkowego albuminą surowicy ludzkiej lub syntetycznym antygenem stwierdzali wspomniani autorzy obniżony lub czasowy brak produkcji IgM (29).

W odróżnieniu od cytowanych autorów (28, 29, 30) Matthaeus i Straub (12, 15) na 41 badanych surowic krów białaczkowych i podejrzanych o różne formy białaczki w 90% stwierdzili obecność IgM. Matthaeus i Weiland (13, 14) analizując precypitujące przeciwciała anty-BLV wykazali, że należą one do klasy IgM. W innych badaniach Matthaeus i Straub (16) u bydła klinicznie zdrowego i białaczkowego, zakażonego eks-

Tab. 2. Zawartość immunoglobulin w surowicy krwi płodów bydłych ( $\bar{x} \pm s$ )

Grupy płodów	Zawartość immunoglobulin w mg/100 ml		
	IgG	IgM	IgA
Grupa I Płody z ujemnym wynikiem serologicznym i hematol. n = 23	30,7 ± 6,1	16,2 ± 4,0	1,6 ± 0,4
Grupa II Płody z wynikiem serolog. dodatnim i hematol. ujemnym n = 6	34,5 ± 7,5	19,2 ± 5,5	2,2 ± 0,9
Grupa III Płody z dodatnim wynikiem serolog. i hematolog. n = 4	28,3 ± 1,9	16,2 ± 4,3	1,95 ± 0,9
Grupa IV Płody z dodatnim wynikiem badania histopatol. n = 5	29,2 ± 1,3	17,0 ± 4,1	2,0 ± 0,8

perymentalnie wirusem IBR/IPV nie stwierdzili istotnych różnic w porównywanych grupach co do zawartości IgM i IgG. Najwyższy poziom IgM uzyskano w 2 tygodnie po zakażeniu, a IgG po 4 tygodniach. Wyniki tych badań odbiegają od obserwacji Trainina i wsp. (29) oraz wskazują na brak przydatności oznaczenia IgM w diagnostyce EBB.

Pierce i wsp. (19) badali zawartość IgG i IgM w surowicy krwi u 135 krów z ujemnym wynikiem badań hematologicznych, uzyskując ich średnie zawartości odpowiednio 2286 i 295 mg/100 ml, a u krów hematologicznie dodatnich (95 zwierząt) wartości te wyniosły 2474 i 285 mg/100 ml. Wykazano przy tym istotną korelację pomiędzy ilością limfocytów a zawartością IgM. W grupie krów z podwyższoną liczbą limfocytów ( $> 30.000/\mu\text{l}$ ) zawartość IgM była istotnie wyższa (389 mg/100 ml) w porównaniu z grupą kontrolną. Otrzymane przez tych autorów wyniki korespondują z rezultatami uzyskanymi przez Matthaeusa i Strauba (16). Natomiast Sobiech (25) wykazała istotnie niższą zawartość IgM u młodych krów (2—3 lata) z limfocytozą aniżeli u krów zdrowych i z limfocytozą, ale w starszym wieku ( $> 4$  lat). Ungar-Waron i wsp. (31) immunizowali zdrowe i białaczkowe krowy syntetycznym antygenem, a następnie określali zawartość IgG i IgM oraz skład i aktywność oczyszczonych swoistych przeciwciał. Ilościowo nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości przeciwciał IgG i IgM pomiędzy porównywanymi grupami. Obserwowano natomiast niższą aktywność precypitacyjną oraz niższe miana w biernej hemaglutynacji u zwierząt białaczkowych. Autorzy sugerują, że ołok zachowanej produkcji przeciwciał IgG i IgM istnieje upcśledzenie ich funkcji biologicznej.

Ishikara i wsp. (7) wykazali, że średnia zawartość Ig u krów serologicznie i hematologicznie dodatnich w kierunku EBB utrzymuje się na fizjologicznym poziomie tj. IgG: 2200—2640 mg/100 ml, a IgM: — 250—280 mg/100 ml. Jednocześnie wykazali oni wyraźny spadek IgM u bydła z guzową postacią EBB (95,6 mg/100 ml).

Matthaeus i Straub (15) nie stwierdzili istotnych różnic w zawartości immunoglobulin klasy G, M i A w sianie oraz mleku krów zakażonych BLV w porównaniu z grupą kontrolną. Schultz i Duncan (24) podają

o obniżonej zawartości IgA u krów z kliniczną postacią białaczki przy jednoczesnym braku różnic w zawartości IgG i IgM. Meiron i wsp. (11) u zakażonych eksperymentalnie BLV 16 cieląt w okresie 2-letnim pod kontrolą badań serologicznych i wirusologicznych wykazali, że swoiste przeciwciała anty-BLV należały do obu klas immunoglobulin. W większości przypadków przeciwciała IgM pojawiały się wcześniej od IgG. Średnia zawartość IgG u cieląt zdrowych wynosiła 2615 mg/100 ml, a u cieląt doświadczalnych w 8 tygodni po zakażeniu — 2320, a w 42 tygodniu — 2590 mg/100 ml. Natomiast średnia zawartość IgM u cieląt zdrowych wyniosła 324 mg/100 ml, a u cieląt doświadczalnych — 348 mg/100 ml. W 5 tygodniu po zakażeniu wzrosła do 400 mg/100 ml, aby obniżyć się w 19–22 tygodniu do 152 mg/100 ml. Obniżenie poziomu IgM obserwowano szczególnie u cieląt z limfocytozą, podczas gdy u nie wykazujących limfocytozę zawartość IgM była w normie. W badaniach własnych oraz innych autorów (1, 5, 6, 8) odnotowano również spadek zawartości IgM w surowicy krwi bydła z przewlekłą limfocytozą. Limfocytoza i zmniejszenie poziomu IgM wydają się być główną konsekwencją zakażenia BLV. Dowodem tego jest zaburzenie sekrecji IgM u bydła z subkliniczną i guzowatą postacią EBB. Ubocznym efektem immunosupresyjnego działania BLV u zakażonych zwierząt, polegającym na upośledzeniu produkcji IgM, może być zwiększona podatność tych zwierząt na choroby spowodowane innymi czynnikami zakaźnymi.

Reasumując można stwierdzić, że w przebiegu EBB występują zaburzenia wytwarzania i sekrecji immunoglobulin (IgM), jednak biorąc pod uwagę mnogość innych czynników zakaźnych i niezakaźnych mających podobny wpływ można uznać, że ilościowe oznaczenie IgM ma ograniczoną wartość diagnostyczną.

Odmiennie zjawisko obserwuje się w przypadku płodów, których układ immunologiczny jest pobudzany przez ograniczoną liczbę antygenów. Wówczas surowica krwi płodu zawiera swoiste przeciwciała dla niewielkiej liczby czynników przyczynowych zakażeń łożyskowych, podwyższona zawartość immunoglobulin może być wyrazem infekcji płodu.

Immunokompetencja płodu bydłowego zaczyna rozwijać się w 4–5 miesiącu ciąży (18, 22, 23). Immunologicznie kompetentne komórki plazmatyczne — nośniki IgM identyfikowano 59 dnia, a IgG w 135 dniu ciąży (23). Immunoglobuliny klasy M oznaczano u płodów w pojedynczej immunodyszce radialnej 130, a klasy G 145 dnia ciąży (22, 23). W dotychczasowych badaniach serologicznych płodów obecność swoistych przeciwciał stwierdzono przy naturalnym lub eksperymentalnym zakażeniu różnymi czynnikami zakaźnymi od 132 dnia ciąży (18, 22, 23).

Sawyer i wsp. (22) zakazili płody w różnych okresach ciąży chlamydiami, *Vibrio fetus*, *Coxiella burnetti*, wirusem bluetongue, BVD i *Anaplasma marginale*. Badaniami serologicznymi wykazali oni obecność swoistych przeciwciał u zakażonych płodów, a zawartość IgM we wszystkich przypadkach była wyższa u cieląt zakażonych w porównaniu z grupą kontrolną. Osburn i wsp. (17) nie zdołali wykazać wirusa choroby niebieskiego języka (bluetongue) u płodów owczych po 100 dniach ciąży, ale po 122 dniach stwierdzono przeciwciała neutralizujące. Inni autorzy (2, 26) w doniesieniach o zakażeniach płodowych wirusem PI-3 i BVD podają, że nie jest łatwo wykryć wirus w czasie pojawiania się swoistych przeciwciał, przez co badania wirusologiczne nie mają przydatności diagnostycznej. Ellis

i wsp. (3) badali zawartość immunoglobulin klasy G; M i A u poronionych i nieporonionych płodów. Najwcześniej wykryto IgM u 90-dniowego płodu, a IgG i IgA u 111-dniowego płodu. Średnia zawartość immunoglobulin u poronionych płodów była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną i rosła wraz z wiekiem od 5-go do 8-go miesiąca ciąży, a w ostatnim miesiącu utrzymywała się na średnim poziomie. Ponadto średnia zawartość IgM (96 mg/100 ml) była wyższa niż IgG (59 mg/100 ml). Obserwowany wraz z wiekiem płodu wzrost zawartości immunoglobulin odzwierciedlać może narastanie immunokompetencji. Spadek poziomu IgM w ostatnim miesiącu życia płodowego spowodowany może być immunosupresją istniejącą w okresie okołoporodowym.

Sawyer i wsp. (22) oraz Braun i wsp. (2) donoszą o wzroście zawartości IgG i jej przypisują główną obronną rolę. Ich badania jednak dotyczyły płodów, które przeżyły infekcję, a więc po stosunkowo długim czasie od momentu zakażenia. IgM jest pierwszą immunoglobuliną produkowaną w odpowiedzi na wniknięcie czynnika zakaźnego i jej przypisuje się ważną rolę w pierwszej fazie odporności humoralnej.

Kirkbride i wsp. (9) badając 164 poronione płody stwierdzili średnią zawartość IgG — 128 mg/100 ml oraz IgM — 34 mg/100 ml, podczas gdy w grupie kontrolnej wartości te wyniosły odpowiednio 1,3 i 1,4 mg/100 ml. Jednocześnie cytowani autorzy podają, że oznaczenie zawartości immunoglobulin u poronionych płodów może mieć wartość diagnostyczną wówczas, jeżeli podwyższone ich poziomy są wynikiem odpowiedzi immunologicznej na śródmaciczne zakażenie czynnikiem zakaźnym.

W piśmiennictwie brak jest danych co do zawartości immunoglobulin w przebiegu zakażeń BLV u płodów. Badania własne wykazały podwyższony poziom IgG i IgM u płodów serologicznie dodatnich w kierunku EBB, co potwierdzałyby spostrzeżenia cytowanych wcześniej autorów (22) odnośnie zakażeń innymi drobnoustrojami. Wykazany wzrost zawartości IgM w grupie II płodów związany jest prawdopodobnie z pierwotną odpowiedzią immunologiczną na zakażenie BLV. Przemawia za tym obecność swoistych przeciwciał anty-BLV w surowicy krwi tych płodów. W grupie III i IV płodów z dodatnimi wynikami badań hematologicznych i histopatologicznych zawartość immunoglobulin była na poziomie średnich wartości grupy kontrolnej (IgM) lub nieco niższa (IgG).

#### Piśmiennictwo

1. Atluru D., Johnson D. W., Paul P. S., Muscoplat C. C.: Am. J. Vet. Res. 40, 515, 1979.
2. Braun E. K., Osburn B. J., Kendrick J. W.: Am. J. Vet. Res. 34, 206, 1973.
3. Ellis W. A., Logan E. F., O'Brien J. J.: Clin. exper. Immunol. 33, 136, 1978.
4. Fahey S. L., McKelvey E. J. Immunol. 94, 24, 1965.
5. Gatei M. H., Lavin M. F., Daniel R. C. W.: J. Med. Vet. B 37, 575, 1990.
6. Heeney J. L., Valli V. E., Montesanti J.: J. Gen. Virol. 69, 659, 1988.
7. Ishikara K., Ohtani T., Kitagawa H., Onuma M.: Jap. J. Vet. Res. 42, 427, 1980.
8. Jacobs R. M., Valli V. E., Wilkie B. N.: Am. J. Vet. Res. 41, 372, 1980.
9. Kirkbride C. A., Martinovich D., Woodhouse D. A.: New Zealand Vet. J. 35, 180, 1977.
10. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F.: Immunochemistry 2, 235, 1965.
11. Meiron R., Brenner J., Gluckmann A., Avraham R., Trainin Z.: Vet. Immunol. Immunopath. 9, 105, 1985.
12. Matthaeus W., Straub O. C.: Zbl. Vet. Med. B 22, 758, 1975.
13. Matthaeus W., Weiland F.: Zbl. Vet. Med. B 22, 606, 1975.
14. Matthaeus W., Weiland F.: Vet. Microbiol. 1, 263, 1976.
15. Matthaeus W., Straub O. C.: The immune response of normal and leucotic cattle to IBR/IPV-virus. W: Bovine Leucosis (A. Burny wyd.) Commission of the European Communities, Luxembourg 1977, s. 571.

16. Matthaeus W., Straub O. C.: Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 24), 152, 1978.
17. Osburn B. J., Johnson R. T., Silverstein A. M., Prendergast R. A., Jochim M. M., Levy S. E.: Lab. Invest. 25, 205, 1971.
18. Osburn B. J., Stabenfeldt G. H., Ardans A. A., Tresc C., Sawyer M.: J. Am. vet. med. Ass. 164, 295, 1974.
19. Pierce K. R., Young M. F., Mc Arthur N. H., Williams J. D., Am. J. Vet. Res. 36, 771, 1977.
20. Ressang A. A., Rumawas W., Rondhuis R. P., Haagsma I., Bercofich Z.: Zbl. Vet. Med. B 27, 576, 1980.
21. Ristau E., Wittmann W.: Mh. Vet. Med. 43, 543, 1985.
22. Sawyer M., Osburn B. J., Knigh H. D., Kendrick J. W.: Am. J. Vet. Res. 34, 1281, 1973.
23. Schultz R. D.: Cornell Vet 63, 107, 1973.
24. Schultz R. D., Duncan J. R.: Proc 5th Int. Symp. on Bovine Leukosis Commission of the European Communities, Tübingen 1984, s. 313.
25. Sobiech E.: Immunoglobuliny klasy G i M u bydla dotkniętego białaczką limfatyczną. Praca dokt. AR Wrocław 1979.
26. Swift B. L., Kennedy P. C.: Am. J. Vet. Res. 33, 57, 1972.
27. Trainin Z., Klopfer U.: Bibl. Haemat. 35, 500, 1970.
28. Trainin Z., Klopfer U.: Cancer Res. 31, 1968, 1971.
29. Trainin Z., Ungar-Waron H., Meiron R., Barnea A., Sela M.: J. Comp. Path. 83, 571, 1976.
30. Trainin Z., Nobel T. A., Klopfer U., Neumann F.: Refuah vet. 25, 187, 1983.
31. Ungar-Waron H., Arraham R., Glueckmann A., Trainin Z.: Ann. Rech. Vet. 9, 315, 1978.
32. Zemen G. O., Cohen G., Budrus M., Williams G., Javer H.: J. Allergy Clin. Immunol. 49, 10, 1972.

Adres autora: dr hab. Stanisław Klimentowski, ul. Pierwioskowa 6, 53-225 Wrocław

ZOFIA ROTKIEWICZ, ZDZISŁAW LARSKI

## Wpływ kwasu 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido)etylo/fenoksy/ 2,2 metylopropionowego na namnażanie się w hodowlach komórek wirusa Herpes simplex typ 1 szczepu TK 900 wirusa choroby Aujeszkyego szczepu Roakin wirusa choroby Newcastle

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR-T,  
ul. Czajpowskiego 13 bl. 105, 10-957 Olsztyn

### Summary

The influence of 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) ethyl/phenoxyl-2-methyl-propionic acid on the multiplication in cell cultures of herpes simplex virus, type 1, TK900 strain of pseudorabies virus, and Roakin strain of Newcastle disease virus

2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) ethyl/phenoxyl-2-methyl-propionic acid (CBMP) reduced the intensity of cytopathic effect, delayed the time of its appearance for 24—48 hours and finally caused a significant lowering of TCID<sub>50</sub> titer of herpes simplex in monkey kidney cell cultures and of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures. On the other hand CBMP did not exert any effect on the multiplication of Roakin strain of NDV in chick embryo cell cultures. The preparation did not inactivate directly the viruses being examined and did not influence their adsorption. It is suggested that antiviral effect of CBMP is due to disordering the lipid metabolism in cells what causes the disturbances of virus envelope synthesis.

Badania Grossberga (2) i Steinharta (10) wskazały na możliwość hamowania w hodowlach komórek syntezy niektórych wirusów otoczkowych: West Nile, kalifornijskiego zapalenia mózgu i *Herpes simplex* przez ester etylowy kwasu 2/4-chlorofenoksy-/izomasłowego (CPIB). Zakładano przy tym, że przeciwwirusowe działanie tego preparatu jest następstwem dezorganizacji syntezy lipidowego komponentu otoczki. Następnie wykazano w hodowlach komórek hamowanie przez ten lek syntezy wirusów choroby Newcastle (8, 9) i choroby Aujeszkyego (3), przy czym dodatkowe badania (7) wykonane z tym ostatnim wirusem wskazują na słuszność zakładanego mechanizmu działania. Stwierdzono również lecznicze działanie tego leku w doświadczalnej opryszczce rogówki u królików (4) oraz w leczeniu pacjentów z tym schorzeniem (5). Podobne działanie w hodowli komórek oraz w leczeniu doświadczalnej opryszczki wykazał kwas 2-/4-/2-(4-chlorbenzamido) etylo/fenoksy/-2,2 metylopropionowy (CBMP) (1).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu CBMP na namnażanie się w hodowlach komórek kilku wirusów otoczkowych.

### Materiał i metody

Wirus *Herpes simplex* typ 1 otrzymano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; miano tego wirusa w hodowli komórek nerki małpy wynosiło około  $10^{-5.6}/0,15$  ml. Wirus choroby Aujeszkyego szczep TK 900 wykazywał miana TCID<sub>50</sub> około  $10^{-7.2}/0,15$  ml w hodowlach komórek zarodka kurzego, a wirus choroby Newcastle (ND) szczep Roakin, miano TCID<sub>50</sub>  $10^{-9.5}/0,15$  ml w hodowli komórek zarodka kurzego.

Miana TCID<sub>50</sub> oznaczono metodą Reeda-Muencha, a statystyczną zmienność ich różnicy według tablicy Lorenza (6); przy stosowanych w badaniach własnych co najmniej trzykrotnych powtórzeniach mianowania wirusa, różnica 0,7 log jest statystycznie znamienna. Jednowarstwowe hodowle komórek zarodka kurzego (HKZK) sporządzono w sposób powszechnie stosowany, zaś hodowlę komórek nerki małpy (HKNM), płyny odżywcze hodowli, PBS, surowicę oraz roztwór trypsyny otrzymano z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Badany preparat przeciwlipemiczny, kwas 2-/4-/2-(4 chlorbenzamido) etylo/fenoksy/ 2,2 metylopropionowy (CBMP) stanowił Bezafibrat produkcji firmy Boehringer — Mannheim otrzymany od jej przedstawiciela w Warszawie.

### Wyniki i omówienie

Badanie toksyczności CBMP dla hodowli komórek nerki małpy i hodowli komórek zarodka kurzego. Preparat rozpuszczono w płynie Parkera alkalizowanym n/10 NaOH do pH około 7,8 i wprowadzono do hodowli w ilościach dających końcowe stężenie 200, 400, 800 mcg/ml płynu odżywczego. Kontrolę stanowiły hodowle, do których dodawano odpowiednią ilość płynu stanowiącego rozpuszczalnik leku. Czas obserwacji wynosił 5 dni. Maksymalnie tolerowaną dawką było stężenie 400 mcg/ml i takiego używano w doświadczeniach.

Redukcja miana TCID<sub>50</sub> wirusa *Herpes simplex* w hodowlach komórek nerki małpy oraz wirusa choroby Aujeszkyego i choroby Newcastle w hodowli komórek zarodka kurzego. Hodowle doświadczalne zawierające CBMP w płynie odżywczym utrzymującym i kontrolne zakażono 10-krotnie wzrastającymi rozcieńczeniami wirusa i obserwowano przez 5 dni inkubowania w 37°C. Preparat zmniejszał natężenie efektu cytopatycznego oraz opóźniał czas jego występowania o 24—48 godzin,