

JAN RUŁKA, BOŻENA KOZACZYŃSKA*, MICHAŁ REICHERT*, EWA BUZAŁA

Wartość diagnostyczna mieszanego antygenu wirusa enzoptycznej białaczki bydła (BLV) i wirusa parainfluenzy (PI₃) w odczynie immunodyfuzji w żelu (ID)

Pracownia Patologii Komórkowej i *Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Diagnostic values of two antigens in the immunodiffusion test: containing only bovine leukaemia virus (BLV) and comprising BLV plus parainfluenza virus (PI₃)

Serological studies were carried out using two kinds of antigens i.e. BLV and BLV plus parainfluenza virus (PI₃) propagated in FLK cells. Out of 38 cattle sera sixteen (42.2 per cent) produced positive results with the BLV antigen and 31 (81.6 per cent) with the mixed antigen. The findings showed that with the mixed antigen the positive results rose by 39.4.

Diagnostyka enzoptycznej białaczki bydła w kraju i na świecie prowadzona jest przy użyciu różnych testów m.in. odczynu immunodyfuzji – ID (2, 9, 12, 14, 16, 18, 27), ELISA (2, 5, 19, 22, 27, 28), RIA (1, 2, 3, 8, 28), czy rewertazowego (11, 26). Podstawowym odczynem w obecnej diagnostyce laboratoryjnej białaczki bydła jest odczyn immunodyfuzji. Mimo swoich zalet – np. wysokiej swoistości – jest on jednak mniej czuły od testu ELISA i RIA. Cechę tę podkreślają m.in. Gupta i Ferrer (12), Graves i wsp. (8) oraz Roberts i wsp. (23).

Serologiczna diagnostyka enzoptycznej białaczki bydła w Polsce wykonywana jest przy użyciu antygenu BLV uzyskanego z hodowli komórek FLK. Mimo ostrych rygorów laboratoryjnych w procesie produkcji antygenu, mogą zdarzyć się przypadki dodatkowego jej zakażenia innymi wirusami. Antygen doświadczalny uzyskany z takiego materiału wirusowego ulega oczywistej dyskwalifikacji podczas badań kontrolnych, jednakże z teoretycznego punktu widzenia interesująca wydaje się być jego swoistość i czułość względem przeciwciał anty BLV.

Wysoki procent zakażeń bydła zarówno wirusem parainfluenzy, jak i wirusem enzoptycznej białaczki bydła oraz możliwość wykrywania przeciwciał anty PI₃ przy użyciu odczynu immunodyfuzji (6, 15, 24), skłoniły do podjęcia badań nad oceną aktywności serologicznej mieszanego antygenu zawierającego równocześnie białka wirusa BLV i wirusa PI₃ w diagnostyce zakażeń BLV.

Materiał i metody

Surowice. Do badań użyto 38 surowic krów rasy ncb w wieku 4-8 lat, pochodzących z gospodarstwa zapowietrzonego wirusem enzoptycznej białaczki oraz wirusem parainfluenzy bydła. Próbkę krwi do badań serologicznych pobierano z żyły jarzmowej wg powszechnie znanej metodyki. Surowicę referencyjną stanowiła surowica krowy, u której serologicznie stwierdzono białaczkę: miano przeciwciał swoistych dla BLV w ID wynosiło 1:4, a w teście ELISA 1:512.

Hodowla komórek. W badaniach użyto komórek FLK zakażonych permanentnie wirusem enzoptycznej

białaczki bydła. Podłożem wzrostowym był płyn RPMI 1640 z dodatkiem 6% inaktywowanej surowicy cielęcą bezzarodkową, wolnej od przeciwciał anty BLV.

Komórki MDBK. Hodowli tych komórek używano do namnażania wirusa PI₃. Podłoże wzrostowe stanowił płyn Eagle'a z dodatkiem 6% uprzednio wymienionej surowicy cielęcą, zaś podłoże utrzymujące – płyn Eagle'a zmieszany w równych objętościach z płynem Parkera 199 z dodatkiem 0,5% surowicy.

Antygeny. Antygen BLV – materiałem wyjściowym był wirus BLV z supernatantu znad hodowli komórek FLK zebrany w 96 godzin po pasażu. Antygen mieszanym (BLV+PI₃) – przygotowano go z supernatantu znad hodowli komórek FLK zakażonych dodatkowo wirusem PI₃, namnożonym uprzednio w hodowli komórek MDBK. Miano TCID₅₀ wirusa PI₃ w tym antygenie wynosiło 10^{6,60}/0,2 ml. Antygen PI₃ – przygotowano z supernatantu znad hodowli komórek MDBK zakażonych wirusem PI₃ zebrany w 5 dni po zakażeniu, gdy efekt cytopatyczny obejmował 50 – 75% zdegenerowanych komórek. Miano TCID₅₀ wirusa w tym antygenie wynosiło 10^{7,5}/0,2 ml. Wszystkie wymienione antygeny przygotowano metodą siarczanową wg Miller i Van Der Maatena (21).

Odczyn immunodyfuzji w żelu agarowym (ID). Test wykonywano techniką Ouchterlony'ego wg Grundboeck-Juško, Grundboeck (10).

Test ELISA. Odczyn wykonywano wg Steca i wsp. (27).

Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty ilustruje tab. 1. Referencyjne badania testem ELISA 38 surowic krów w kierunku enzoptycznej białaczki bydła wykazały 22 wyniki o mianie 1:128 – 1:2048, 10 wyników o mianie 1:32 – 1:64 i 6 wyników ujemnych.

Porównując wartość diagnostyczną doświadczalnego antygenu wirusa BLV w odczynie ID z antygenem BLV zakażonym dodatkowo wirusem PI₃, stwierdzono: 16 dodatnich wyników z antygenem mieszanym BLV i 31 dodatnich wyników z antygenem mieszanym (BLV+PI₃). W rezultacie wykazano 42,2% dodatnich wyników z antygenem BLV oraz 81,6% z antygenem mieszanym. Ilość dodatnich wyników z antygenem mieszanym była wyższa o 39,4%, w stosunku do wyników z antygenem BLV. Przeprowadzone badania wskazują na brak zgodności dodatnich wyników w odczynie ID dla antygenu BLV z dodatnimi wynikami dla antygenu mieszanego. Wśród dodatnich wyników z antygenem mieszanym znajduje się również 11 rezultatów (oznaczone kropką) odpowiadających ujemnym wynikom ID zarówno z antygenem BLV, jak i z antygenem PI₃. Zaznaczyć należy, że w teście ELISA 8 z nich odpowiadało mianu 1:32 lub 1:64, pozostałe 3 wyniki – mianu 1:256. Ponieważ wszystkich wymienionych 11 surowic wykazywało ujemny wynik ID z antygenem PI₃ należy przyjąć, że dodatni wynik odczynu

Tab. 1. Wyniki kontroli serologicznej doświadczalnych serii antygenów BLV, BLV+PI3 i PI3 z surowicami bydła białaczkowego

Lp.	Nr surowicy	Test ELISA	Odczyn immunodyfuzji z antygenem:		
			BLV	BLV+PI3	PI3
1	178	2048	+	+	+
2	220	128	+	+	+
3	200	256	+	+	+
4	140	2048	+	+	-
5	215	2048	+	+	-
6	221	128	+	+	-
7	222	256	+	+	-
8	228	256	+	+	-
9	231	512	+	+	-
10	232	2048	+	+	-
11	234	2048	+	+	-
12	243	64	+	+	-
13	244	256	+	+	-
14	245	1024	+	+	-
15	246	2048	+	+	-
16	251	512	+	+	-
17	159	32	-	+	-
18	192	64	-	+	-
19	209	256	-	+	-
20	211	64	-	+	-
21	216	256	-	+	-
22	225	256	-	+	-
23	239	32	-	+	-
24	242	64	-	+	-
25	247	64	-	+	-
26	250	64	-	+	-
27	255	32	-	+	-
28	175	256	-	+	+
29	227	256	-	+	+
30	229	256	-	+	+
31	233	32	-	+	+
32	253	-	-	-	+
33	238	256	-	-	-
34	241	-	-	-	-
35	248	-	-	-	-
36	249	-	-	-	-
37	254	-	-	-	-
38	256	-	-	-	-
K2 (BLV+)		512	1:4 ^x	1:4	-

Objaśnienia: + dodatni wynik immunodyfuzji, - ujemny wynik immunodyfuzji, x dodatni wynik immunodyfuzji z surowicą rozcieńczoną 1:4, K2 (BLV+) surowica referencyjna anty BLV.

ID z antygenem mieszanym pochodzi od komponenty antygenowej wirusa BLV. W świetle uzyskanych rezultatów należałoby stwierdzić, że miano 1:32 i 1:64 w teście ELISA jest mianem dodatnim. Powszechna interpretacja tych mian jako wynik ujemny kryje w sobie duże niebezpieczeństwo, gdyż zwierzęta wykazujące miano ELISA 1:32 lub 1:64, pozostające w sąsiedztwie krów zdrowych, mogą być potencjalnymi nosicielami wirusa BLV i przyczynić się do szerzenia choroby w stadzie. Badania Kuźmaka (18) wykazały również, że miano testu ELISA 1:64 jest wynikiem dodatnim. Przyjmując miano ELISA 1:32 i 1:64 jako dodatni wynik testu oraz uwzględniając dodatnie wyniki odczynu ID z antygenem mieszanym, ostatecznie stwierdzono: 32 wyniki dodatnie i 6 ujemnych.

Zgodność wyników odczynu ID z wynikami testu ELISA dla wirusa BLV była tematem badań wielu autorów. Uwzględniając wyniki Klimentowskiego (16, 17), Toma i wsp. (28), Hoff-Jørgensen (13) oraz Ressanga i wsp. (22), wyniki badań własnych odbiegają od rezultatów wymienionych autorów. Badania Toma i wsp. (28), Kadena (14) oraz Manza i wsp. (19) wykazały zgodność

wyników obu testów w 80%, zaś Behrensa i wsp. (2) oraz Forschnera i wsp. (7) w 90%. Klimentowski (16) w swoich badaniach wykazał wprawdzie, że nie ma praktycznie różnic pomiędzy wynikami testu ID i ELISA jednakże podkreśla wyższą czułość testu ELISA nad ID.

Kontrola serologiczna 38 badanych surowic w odczynie ID przy użyciu antygeny PI₃ wykazała 8 dodatnich wyników, wśród których 3 były zgodne z dodatnimi wynikami dla antygeny BLV oraz dla antygeny mieszanego BLV+PI₃. Z pozostałych 5 wyników dodatnich 4 były zgodne z wynikami dla antygeny mieszanego, a wynik z surowicą 253 był dodatni tylko dla antygeny PI₃. Wymienione 4 dodatnie wyniki ID z antygenem PI₃ (surowica nr 175, 207, 229 i 233) są zgodne z dodatnimi wynikami dla antygeny mieszanego BLV+PI₃.

Przeprowadzone badania wskazują zarówno na możliwość wykrywania przeciwciał dla wirusa PI₃ w odczynie ID przy użyciu antygeny BLV zanieczyszczonego wirusem parainfluenzy PI₃, jak i na wzrost nieswoistości dodatnich wyników odczynu dla białek wirusa BLV w obecności białek wirusa parainfluenzy. Obserwacje te pokrywają się z uprzednimi badaniami Rułki i wsp. (25), w których

notowano wzrost impulsów aktywności enzymu odwrotnej transkryptazy wirusa enzoptycznej białaczki w obecności wirusa parainfluenzy bydła.

Piśmiennictwo

- Ban J., Zajac V., Altaner C., Černý L.: Zntbl. Vet. Med. 29, 591, 1982.
- Behrens F., Ziegelmaier R., Forschner E., Manz D., Wiegand B.: Curr. Topics Vet. Med. Anim. Sci. 15, 173, 1982.
- Bex F., Bruck C., Mammerickx M., Portetelle D., Ghysdael J., Cleuter Y., Leclerg M., Dekegel D., Burny A.: Cancer Res. 39, 1118, 1979.
- Burridge M.J., Thurmand M.C., Miller J.M., Schmer M.J.P., Van Der Maaten M.J.: Am. J. vet. Res. 43, 1966, 1982.
- Engwal E., Perhman P.: J. Immun. 109, 129, 1972.
- Fischman H., Bang F.B.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 966, 1966.
- Forschner E., Ewald P., Keyserlingk-Eburnius W., Röttgen M., Seidler M.J.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 92, 3, 1979.
- Graves D.C., Mc Qude M., Weibel K.: Am. J. Vet. Res. 43, 960, 1982.
- Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 38, 19, 1982.
- Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Instrukcja Nr 54. Min. Rol. i Gosp. Żywn. Dep. Wet. z dnia 20 lutego 1985.
- Grundboeck-Juško J., Reichert M.: Medycyna Wet. 46, 284, 1990.
- Gupta P., Ferrer J.F.: Anns Réch. Vét. 9, 683, 1978.
- Hoff-Jørgensen R.: CEC Sci. Workshop Bovine Leucosis. Luxemburg 1980, s. 55.
- Kaaden C.R., Neth R., Frenzel B.: Anns Réch. Vét. 9, 771, 1978.
- Kita J., Norcross N., Gillespie J.H.: Cornell Vet. 43, 431, 1968.
- Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
- Klimentowski S.: Ocena przydatności metody chemiluminescencji w diagnostyce białaczki limfatycznej P 388 myszy i enzoptycznej białaczki bydła. Praca dokt, AR, Wrocław 1984.
- Kuźmak J.: Występowanie i wartość diagnostyczna przeciwciał przeciw wirusowi enzoptycznej białaczki bydła w surowicy krwi i wydzielinie gruczołu mlekowego krów. Praca dokt, I. Wet., Puławy 1987.
- Manz D., Wiegand D., Behrens F., Ziegelmaier R.: Zntbl. Vet. Med. 28, 280, 1981.
- Miller J.M., Schmer M.J., Van Der Maaten M.J.: Am. J. vet. Res. 42, 5, 1981.
- Miller J.M., Van Der Maaten M.J.: Vet. Microbiol. 1, 195, 1976.
- Ressang A.A., Gielkens A.L.J., Quak J., Mastenbroek N., Tuppert C., De Castro A.: Anns Réch. Vét. 9, 663, 1978.
- Roberts D.H., Lucas M.H., Swallow C.: Vet. Immun. Immunopat. 22, 275, 1989.
- Rułka J.: Medycyna Wet. 46, 88, 1990.
- Rułka J., Reichert M., Stec J.: Medycyna Wet. (w druku).
- Rösler H., Werner C., Drescher B., Witman W., Venker P., Rosenthal A.: Arch. exper. Vet. Med. 34, 595, 1980.
- Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Medycyna Wet. 41, 117, 1985.
- Toma B., Crespeau C., Vuillaume A., Duret Ch., Chappuis C., Levy D., Parodi A.L.: Proc. Fifth Inter. Symp. Bovine Leukosis. Tübingen 1982, s. 400.

Adres autora: dr Jan Rułka, ul. Lubelska 17/6, 24-100 Puławy

EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI, JANUSZ DANEK

artykuł przeglądowy

Etiopatogeneza osteochondrozy koni

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Instytutu Weterynarii w Puławach, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Osteochondroza jest chorobą młodych, rosnących zwierząt. Termin ten (*osteochondrosis* – OCD – skr. ang.) obejmuje kompleks zmian charakteryzujących się zaburzeniami rozwoju, wzrostu i kostnienia chrząstki, co niektórzy nazywają syndromem osteochondrozy (19, 25). Olson (23) uważa jednak, że określenie to jest nieodpowiednie i zbyt ogólne oraz, że właściwa nazwa tych przypadłości powinna brzmieć: dyschondroplazja – DCP. Ponadto trzeba dodać, że Watkins (32) jako synonimu osteochondrozy używa terminu *physitis*.

W piśmiennictwie funkcjonują jeszcze dwa inne, szersze pojęcia, obejmujące oprócz osteochondrozy stany chorobowe prowadzące do deformacji kości, chrząstki, stawów, ścięgien i postawy zwierząt rosnących, a mianowicie: ortopedyczny syndrom wzrostu lub ortopedyczna choroba wzrostu (ang. – syndrome of developmental orthopedic disease – DOD) oraz metaboliczna choroba kości (ang. – metabolic bone disease – MBD). Drugi termin preferuje Gabel (6) sugerując, że w odróżnieniu od DOD wskazuje on na najczęstszą przyczynę choroby. Inni autorzy uważają jednak, że jest to określenie mało precyzyjne, a nawet mylące, gdyż informuje wyłącznie o chorobie kości, podczas gdy zmiany dotyczą nie tylko kości, ale również stawów i ścięgien (19, 30). W publikacjach naukowych można więc spotkać się z tym, że te same zmiany chorobowe opisywane są jako OCD, DCP, DOD lub MBD.

Pomijając jednak rozważania terminologiczne, w ostatnim dwudziestoleciu obserwuje się zwiększającą się istotnie liczbę tego typu zachorowań oraz coraz częstsze posługiwanie się terminem osteochondroza. Choroba ta nie była dotychczas w kraju opisywana, choć obserwacje i badania własne wskazują, że jest to u nas coraz bardziej aktualny problem. Osteochondroza występuje u ludzi i większości zwierząt domowych, a wśród nich najczęściej u świń i drobiu. Największy wzrost zachorowań obserwuje się u świń, co wiąże się z wieloma czynnikami, a szczególnie z selekcją ukierunkowaną na szybkie przyrosty, która zmienia właściwe proporcje między rozwojem mięśni i kości (32). Również w hodowli koni obserwuje się tendencję uzyskiwania źrebiąt szybko rosnących i dobrze umięśnionych, gdyż za takie zwierzęta uzyskuje się najwyższe ceny. Powoduje to, że hodowcy stosują często zbyt intensywne żywienie ziarnem, zapominając o konieczności zbilansowania dawki pokarmowej i tym niektórzy tłumaczą występujący również u źrebiąt wzrost zachorowań na osteochondrozę (20). Bliższe zajęcie się omawianym zagadnieniem wykazało, że elementów sprzyjających chorobie jest jednak znacznie więcej (19, 30).

Do najczęściej wymienianych czynników predysponujących zalicza się szybki wzrost i dużą masę ciała, niezbilansowane żywienie, zaburzenia mineralne, zatrucia, czynniki biomechaniczne, endokrynologiczne i genetyczne. Czynniki tych nie sposób jest odgraniczyć, jak również trudno określić, który z nich jest najważniejszy.