

JACEK KUŹMAK

## Enzootyczna białaczka bydła (EBB). I. Badania nad współzależnością występowania przeciwciał dla wirusa EBB w surowicy krwi i wydzielinie gruczołu mlekowego

Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Konieczność rozwijania i doskonalenia diagnostyki enzootycznej białaczki bydła (EBB) wynika ze znacznego rozpowszechnienia tej choroby w Polsce, o czym świadczą wyniki badań hematologicznych prowadzonych w ubiegłych latach. Wypełnianie przez służbę weterynaryjną obowiązku organizacji zwalczania tej choroby wymaga dysponowania metodą diagnostyczną czułą, powtarzalną, łatwą i niezbyt kosztowną.

W diagnostyce serologicznej EBB swoiste przeciwciała oznaczano najczęściej w surowicy krwi. W ostatnich latach duże zainteresowanie budzi możliwość użycia mleka do diagnostyki EBB. Postępowanie takie pozwala na ominięcie pobierania krwi, które jest pracochłonne oraz stwarza okazję do transmisji wirusa (23). Pierwsze prace z tego zakresu (19, 22) koncentrowały się nad wykorzystaniem do oznaczania przeciwciał testu immunodiffuzji (ID). Metoda ta okazała się mało przydatna w związku ze znacznie mniejszą zawartością przeciwciał w mleku niż w surowicy krwi. Wprowadzenie w ostatnich latach do diagnostyki metody immunoenzymatycznej ELISA, znacznie czulszej od ID, stworzyło możliwość oznaczania przeciwciał w mleku.

Badania dotyczące tej tematyki przedstawiono w dwóch odrębnych częściach. Niniejsze opracowanie zawiera wyniki badań nad kształtowaniem się miana przeciwciał w teście ID podczas rocznego okresu obserwacji, z uwzględnieniem zależności między rodzajem użytego do badań materiału i stosowanymi metodami diagnostycznymi.

### Materiał i metody

Grupę doświadczalną stanowiło 12 krów rasy ncb, w wieku od 3 do 9 lat, dodatnich serologicznie. W chwili rozpoczęcia doświadczenia wszystkie zwierzęta były zacielone, w tym dwie krowy były zasuszone. Od każdej krowy w okresie 11 miesięcy, w odstępach 30-dniowych, pobierano krew i wydzielinę gruczołu mlekowego. Ogółem pobrano 123 próby krwi, 109 prób mleka, 20 prób wydzieliny przedsiarowej i 3 próby siary. Uzyskaną po odwirowaniu surowicę krwi rozlewano do 1 ml ampulek, liofilizowano i przechowywano do końca obserwacji. Mleko uzyskane z czterech płatów wymienia łączono i około 10 ml takiej próby wirowano 20 min. przy 3000 obr/min. Odwirowaną warstwę tłuszczu usuwano, ściągając pipetą odtłuszczone mleko, które liofilizowano w 1 ml ampulkach. Podobnie postępowano z siarą i wydzieliną przedsiarową. W pobranym materiale testami ID i ELISA oznaczano swoiste dla wirusa EBB przeciwciała określając ich miano.

Test immunodiffuzji wykonano zmodyfikowaną metodą opisaną przez Miller i Van Der Maatena (18). 0,8 g agarozы (Fluka A. G.) z dodatkiem 8,9 g NaCl łączono ze 100 ml 0,05 M buforu Tris-HCl o pH 7,2 i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej przez około 30 min. Płynne podłoże rozlewano po 5 ml do suchych, czystych chemicznie szklanych płytek Petriego o średnicy 6 cm. Celem żelifikacji podłoża, płytki przechowywano 1—2 godz. w temp. 4°C. W ostudzonym żelu na każdej płytce wycinano sztanca 14 studzienek ułożonych w dwie rzędy. Średnica każdej studzienki wynosiła 5 mm, a odległość między sąsiednimi brzegami studzienek 3 mm. Do studzienek centralnych наносono antygen wirusa EBB w ilości 25 ul. Używano antygenу produkowanego w Instytucie Weterynarii, serie A-247, A-52. Studzienki obwodowe napełniano surowicami kontrolnymi dodatnimi (po dwie w każdej rozecie) oraz badanym materiałem. Przed przystąpieniem do oznaczeń przeprowadzono dodatkowe badania, które wykazały, że wykrywane w wydzielinie gruczołu mlekowego reakcje mają charakter swoisty dla antygenów wirusa EBB. Odczytywanie i interpretację wyników odczynу przeprowadzono zgodnie z Instrukcją nr 54 M.R.i.G.Z. z dn. 83.02.20. (Nr Wet. 2 II 4411—4/83) w sprawie serologicznego rozpoznawania enzootycznej białaczki bydła przy użyciu testu immunodiffuzji (ID) (8).

Test immunoenzymatyczny (ELISA) wykonano metodą pośrednią, w której antygen wirusa EBB wiąże się z płytką polistyrenową. W drugiej fazie reakcji następuje wiązanie antygenу ze specyficznymi przeciwciałami zawartymi w badanej próbce. W przypadku obecności przeciwciał wytworzony kompleks wykrywa się antyimmunoglobuliną skoniugowaną z enzymem, który rozkłada odpowiedni dla enzymu substrat. Intensywność zabarwienia będącego wynikiem rozłożenia substratu jest proporcjonalna do zawartości przeciwciał. Polistyrenowe płytki firmy Plasomed, typu U, opłaszczano antygenem, наносząc do dołków po 0,1 ml odpowiednio rozcieńczonego antygenу. Płytki zawijano szczelnie folią aluminiową i przechowywano w temp. 4°C przez 16 godz. Przed użyciem płytki dołki opróżniano i przemywano je 3-krotnie 0,05% roztworem Tween 20 w wodzie destylowanej. Próby surowicy krwi, mleka, siary i wydzieliny przedsiarowej do oznaczeń rozcieńczano buforem ELISA (0,01 M Kufor fosforanowy o pH 7,2 zawierający 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20 i 4% surowicy końskiej). Objętość nakładanej próby wynosiła 0,1 ml, przy czym surowicę krwi rozcieńczano 1/64, mleko 1/8, siarę i wydzielinę przedsiarową 1/64. Surowicę standardową dodatnią i ujemną rozcieńczano w stosunku 1/64. Na każdej płytce wykonywano próbę odczynnikową, dodając zamiast materiału badanego 0,1 ml buforu ELISA. Płytki przykrywano i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C w wilgotnej komorze. Po inkubacji dołki opróżniano i płukano 3-krotnie roztworem Tween 20. Następnie dodawano 0,2 ml rozcieńczonego koniugatu, płytkę przykrywano i ponownie inkubowano 1 godz. w temp. 37°C. Dołki opróżniano i płukano 3-krotnie, po czym dodawano 0,2 ml 0,1% roztworu kwasu 5-aminosalicylowego i 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,005%. Wyniki testu odczytywano wizualnie po 2 godz. i weryfikowano po 18 godzinach. Za dodatnie przyjmowano próby, dla których

intensywność larwy była co najmniej taka sama, jak dla surowic standardowych dodatnich. Za ujemne uznawano próby, gdy odpowiadające im dołki w świetle przechodzącym miały barwę dołków surowicy standardowej ujemnej lub były bezbarwne.

Wyniki i omówienie

Na ryc. 1 przedstawiono kształtowanie się średniej arytmetycznej miana przeciwciał w płynach ustrojowych krów w kolejnych miesiącach obserwacji.

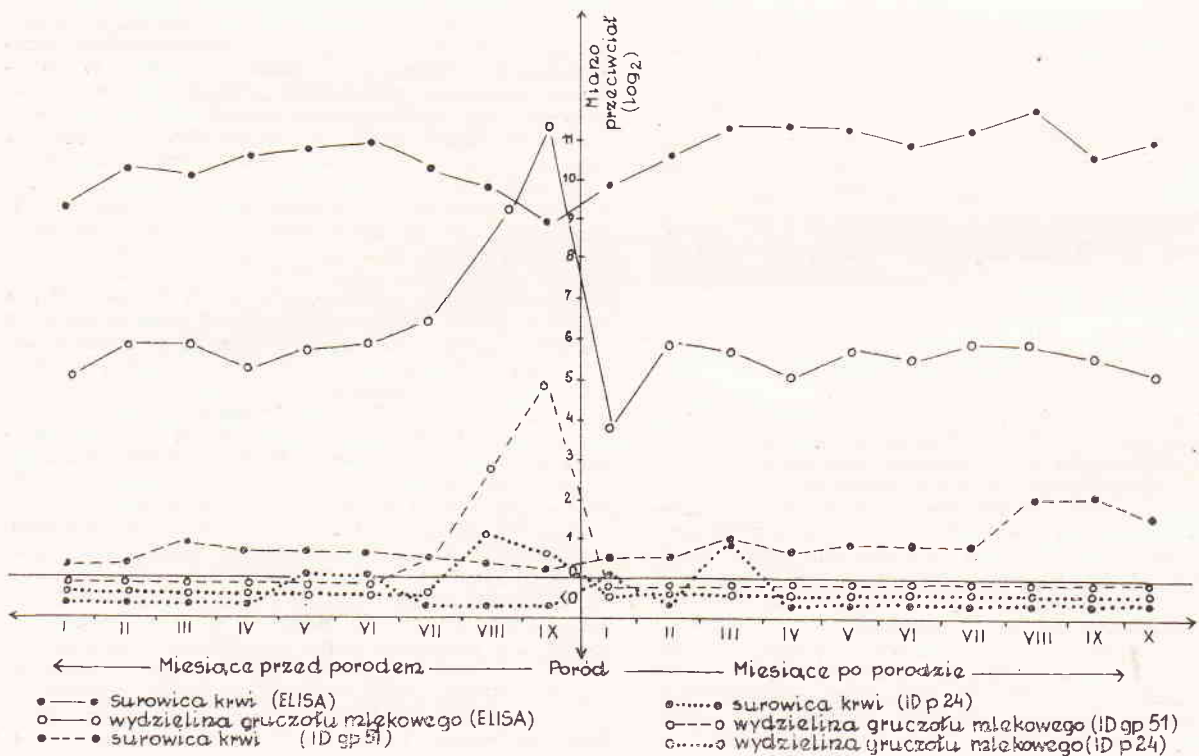
Analiza wyników wykazała okresowe wahania miana przeciwciał w surowicy krwi w teście ID i ELISA z tym, że przy stosowaniu pierwszej metody u 9 krów w surowicy krwi okresowo występowały rezultaty ujemne. U 2 zwierząt serokonwersja z wyniku dodatniego na ujemny wystąpiła 4-krotnie, u jednego 3-krotnie, u dwóch 2-krotnie, a u trzech zwierząt obserwowano jednorazowe pojawienie się wyniku ujemnego. Czas utrzymywania się takich rezultatów nie przekraczał dwóch miesięcy, a szczególnie częste ich występowanie było widoczne w okresie przed porodem.

Analiza wyników badania wydzieliny gruczołu mlekowego wykazała, że stosując test ID, przeciwciała wykrywa się jedynie w wydzielinie przedsiarowej i siarze, ponieważ żadna ze 109 prób mleka nie wykazała obecności przeciwciał w teście. Testem ELISA wykrywano przeciwciała w trzech badanych płynach ustrojowych, obserwując znaczne wahania miana. W mleku 6 krów zanotowano okresowo rezul-

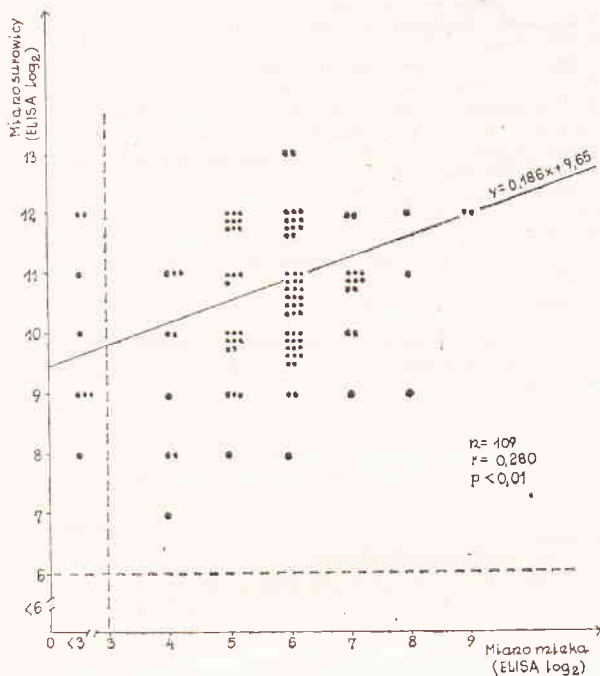
taty ujemne, które występowały głównie po porodzie pomiędzy 7 a 36 dniem.

Krowy, u których występowała największa zmienność rezultatów badania surowicy krwi i mleka posiadały niższe miana przeciwciał w surowicy krwi niż zwierzęta z niezmiennymi rezultatami. Stwierdzono także, że u takich zwierząt dodatni wynik w surowicy krwi wystąpił już 13 miesięcy przed rozpoczęciem obserwacji, podczas gdy u krów z serokonwersją rezultaty takie obserwowano na 3 miesiące przed rozpoczęciem obserwacji.

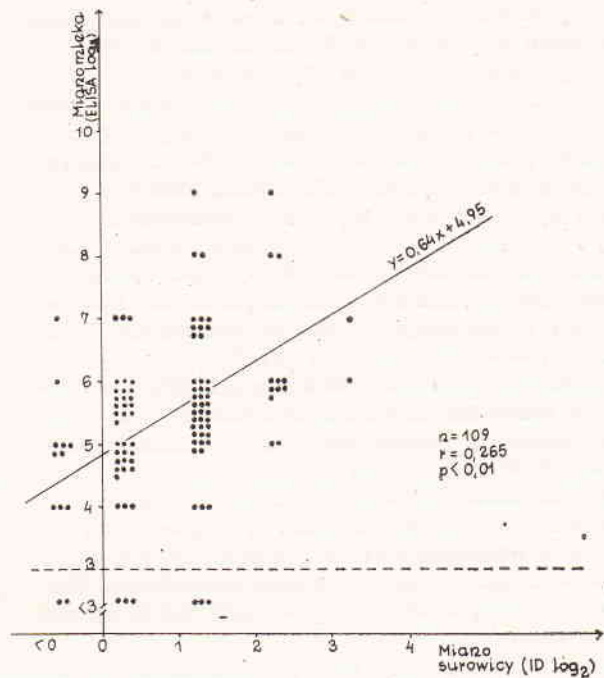
W celu określenia zależności między mianem przeciwciał w surowicy krwi i wydzielinie gruczołu mlekowego analizowano statystycznie otrzymane miana. Dla 109 prób surowicy krwi i mleka badanych testem ELISA (ryc. 2), przy współczynniku korelacji  $r=0,280$  ( $p=0,01$ ) otrzymano prostą regresji  $y=0,17x+9,65$ , która podaje wartość miana przeciwciał w surowicy krwi dla poszczególnego miana przeciwciał w mleku i wskazuje, że miano przeciwciał w surowicy krwi jest 32 razy wyższe od miana przeciwciał w mleku. U 8 krów, których mleko było ujemne, miano w surowicy obejmowało zakres od 256 do 4096. Zależność między mianem przeciwciał w mleku badanym testem ELISA i surowicy krwi badanej testem ID opisuje prosta regresji  $y=0,64x+4,95$  (ryc. 3). Przy współczynniku regresji  $r=0,265$  ( $p=0,01$ ) wskazuje, że miano przeciwciał w mleku badanym testem ELISA jest ponad 16 razy wyższe



Ryc. 1. Kształtowanie się miana przeciwciał w surowicy krwi i wydzielinie gruczołu mlekowego w kolejnych miesiącach przed i po porodzie



Ryc. 2. Zależność między mianem przeciwciał w surowicy krwi i mleku badanych testem ELISA

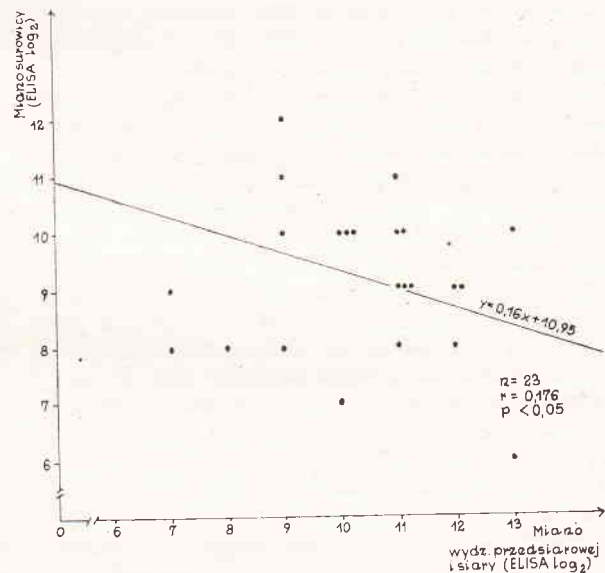


Ryc. 3. Zależność między mianem przeciwciał w surowicy krwi i mleku badanych testami ID i ELISA

od miana oznaczanego testem ID, obserwowanego w surowicy krwi. U 8 krów, których mleko było ujemne, surowica krwi w dwóch przypadkach wykazała taki sam odczyn, a w pozostałych niskie miana od 0 do 2. Określając zależność między surowicą krwi i wydzieliną przedsiarową lub siarą badaną testem ELISA (ryc. 4), otrzymano ujemną korelację ( $r = -0,176$ ,  $p = 0,05$ ). Prosta regresji  $y = -0,16x + 10,95$ , która podaje wartość miana przeciwciał w wydzielinie przedsiarowej lub w siarze wskazuje, że miano przeciwciał w tych wydzielinach jest około 1,5 raza wyższe od miana w surowicy krwi.

Zależności te odnoszą się do przeciwciał przeciw antygenowi gp51. Przeciwciała przeciw antygenowi p24 występowały znacznie rzadziej, stwierdzono je jedynie w kilkumiesięcznych odstępach. Okresowo występowały także w 6 próbach wydzieliny przedsiarowej i we wszystkich próbach siary. W stosunku do przeciwciał przeciw antygenowi gp51, miana ich były kilkakrotnie niższe.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, u krów zakażonych wirusem EBB miano przeciwciał w surowicy krwi nie jest stałe, ale ulega okresowym wahaniom. Nasilenie tego rodzaju odczynów jest szczególnie widoczne w okresie okołoporodowym, kiedy przeciwciała przemieszczają się z surowicy krwi do gruczołu mlekowego. Badania immunochemiczne immunoglobulin w siarze i surowicy krwi (14, 20) wskazują, że są to te same immunoglobuliny, które przed porodem są selektywnie transportowane do gruczołu mlekowego, gdzie osiąga ją wysoką koncentrację (6, 24). Zjawisko to ma



Ryc. 4. Zależność między mianem przeciwciał w surowicy krwi i wydzielinie przedsiarowej oraz siarze badanych testem ELISA

ściśle związek z obniżaniem się poziomu immunoglobulin w surowicy krwi już od 5—6 tygodnia przed porodem (4, 6, 12). Potwierdzeniem tego jest ujemna korelacja ( $r = -0,176$ ) między poziomem przeciwciał w surowicy krwi oraz w wydzielinie przedsiarowej i siarze. W następstwie obniżania się poziomu immunoglobulin w surowicy krwi dochodzi do powstawania rezultatów ujemnych, co było opisywane przez licznych autorów (2, 3, 5, 7). Według Schmidta (21), wpływ na występowanie tego

rodzaju odczynów ma miano przeciwciał w surowicy krwi, określane na 2--3 miesiące przed porodem. Z przedstawionych badań wynika, że niedogodność tę można wyeliminować stosując do badań wydzielinę przeciwiarową i siarę, gdzie przeciwciała osiągają kilkakrotnie wyższą koncentrację niż w surowicy krwi. Naturalna retencja przeciwciał w tych wydzielinach wydaje się być wystarczająca do otrzymania dodatniej reakcji w teście ID. U kilku zwierząt obserwowano serokonwersję z wyniku dodatniego na ujemny, nie związaną z porodem. Podobny fakt podkreślają w swych badaniach Kaaden (10) oraz Hugh-Jones (9).

W ocenie występowania zmiennych rezultatów w surowicy krwi zwraca uwagę zjawisko, że zwierzęta z takimi odczynami charakteryzują się niskim mianem przeciwciał i późniejszym okresem zakażenia niż zwierzęta ze stabilnymi rezultatami. Należy przypuszczać, że w grupie zwierząt świeżo zakazonych dochodzi do wykształcenia słabej odpowiedzialności immunologicznej i okresowych fluktuacji miana przeciwciał.

Serokonwersja z wyniku dodatniego na ujemny, obserwowana tuż po porodzie wynikać może z faktu drastycznego obniżania się poziomu immunoglobulin, głównie IgG<sub>1</sub>, w mleku w pierwszych miesiącach po wycieleniu. Guidry i wsp. (9) wykazali w tym okresie wysoką, ujemną korelację ( $r = -0,53$ ) między stężeniami IgG<sub>1</sub> w surowicy krwi i mleku.

Próba określenia zależności między mianem przeciwciał w surowicy krwi i mleku wykazała, że miano w surowicy krwi jest 32 razy wyższe od miana w mleku. Ban i wsp. (1) oraz Mammerickx i wsp. (15) w podobnych badaniach stwierdzili 15 i 27 krotnie wyższe miano przeciwciał. Tak duże różnice między mianem przeciwciał w surowicy krwi i mleku obserwowane przy stosowaniu czulego testu jakim jest ELISA, wyjaśniają brak dodatnich reakcji w próbach mleka badanego metodą ID. Według niektórych autorów (13, 19) testem ID można oznaczać przeciwciała w mleku nielicznych zwierząt. Niska korelacja ( $r = 0,28$ ) między mianem przeciwciał w surowicy krwi i mleku wiąże się z faktem znacznego rozrzutu uzyskanych mian, co spowodowane mogło być pobieraniem prób mleka w różnych fazach laktacji.

#### Piśmiennictwo

- Ban J., Zajac V., Altener C. Černy L.: Zentbl. Vet. Med. B. 29, 591, 1982.
- Bause J., Maas-Inderviesen F., Schmidt F. W.: Annls Rech. vet. 9, 765, 1978.
- Bause J., Schmidt F. W.: Tierärztl. Umsch. 35, 642, 1980.
- Brandon M. R., Watson D. L., Lascelles A. K.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 49, 613, 1971.
- Burridge M. J., Thurmond M. C., Miller J. M., Schmeer M. J. F., Van Der Maaten M. J.: Can. J. comp. Med. 46, 270, 1982.
- Butler J. E., Kiddy C. A., Pierce C. S., Rock C. A.: Can. J. comp. Med. 36, 234, 1972.
- Gentile G., Bergamini P. F., Poli G., Redaelli G., Vaccaro G.: Inter. Symp. on Bovine Leukosis, Tübingen, 345, 1982.
- Grundboeck M., Grundboeck J.: Instrukcja Nr 54 M. R. i G. Z. z 1983.02.20 (Nr Wet. 2. II 4411-4/83).
- Guidry A. J., Butler J. E., Pearson R. E., Weinland B. T.: Vet. Immunol. Immunopathol. 1, 329, 1980.

- Hugh-Jones M. E., Moorhouse P., Seger C. L.: Can. J. comp. Med. 48, 422, 1984.
- Kaaden O. R., Neth R., Frenzel B.: Annls. Rech. vet. 9, 771, 1978.
- Kiddy Ch. A., McCann R., Maxwell Ch., Rock Ch., Pierce C., Butler J. E.: J. Dairy Sci. 54, 1325, 1971.
- Kliementowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
- Larson B. L.: J. Dairy Sci. 41, 1033, 1958.
- Mammerickx M., Portetelle D., Burny A.: Zentbl. Vet. Med. B. 32, 526, 1985.
- Matthaeus W., Kaaden O. R., Frenzel B., Schlotterer E.: Int. J. Cancer 22, 166, 1978.
- Matthaeus W., Weinland F.: Vet. Microbiol. 1, 263, 1976.
- Miller J. M., Van der Maaten M. J.: Vet. Microbiol. 1, 195, 1976.
- Nougayrede Ph., Gayot G.: Rech. Med. vet. 157, 283, 1981.
- Pierce A. E., Feistein A.: Immunology 8, 106, 1965.
- Schmidt F. W.: Curr. Topics vet. Med. Animal Sci. 15, 130, 1982.
- Straub O. C., Fischer C. W., Frerking H.: Tierärztl. Umschau 33, 657, 1978.
- Wilesmith J. W.: Vet. Rec. 104, 107, 1978.
- Ziv G., Gordon S.: Zentbl. Vet. Med. B. 20, 285, 1973.

Adres autora: dr Jacek Kuźmak, ul. Kościuszki 12 m. 4, 24-100 Puławy

#### Кузьмак Я. — Энзоотический лейкоз скота (эле). I. Исследования взаимозависимости появления противотел для вируса эле в сыворотке крови и секрете молочной железы

Цель работы состояла в определении взаимозависимости появления противотел для вируса энзоотического лейкоза скота (эле) в сыворотке крови и секрете молочной железы. От 12 коров натурально инфицированных вирусом эле, 11 месяцев в месячных интервалах брались кровь и секрет молочной железы и определялись критериями ID и ELISA титры противотел. Исследования показали существенное понижение титра противотел в сыворотке крови в околородовой период с одновременным ростом титра в предмолочном секрете и молозиве. В критерии ELISA титр противотел в этих секретах был 1,5 раза выше чем в сыворотке крови. В 109 пробах молока, исследуемых критерием ID, не обнаружилось противотел. При применении критерия ELISA отметились в молоке периодически отрицательные результаты в околородовой период. В молоке, исследуемом критерием ELISA, титр противотел был 32 раза выше чем в сыворотке крови.

#### Kuźmak J. — Enzootic bovine leukaemia (EBL). I. The correlation between the presence of antibodies against EBLV in sera and lobular milk secretions

Blood and lobular milk secretions were being taken for 11 months at intervals of 1 month from 12 cows infected naturally with enzootic bovine leukaemia virus (EBLV). The titres were established by the AGID test and the ELISA. It was found a significant drop of titres in sera in the perinatal period and an increase of the titres in pre-colostral secretions and in colostrum. The titres determined by the ELISA were 1.5 fold higher in the secretions than in sera. In 109 samples of milk tested by the AGID test the presence of antibodies was not stated. Using the ELISA negative results were found in the postnatal period examining milk samples. The titres of antibodies in milk were 32 fold higher than in the serum using the ELISA test.