

# Ocena przydatności antygenu FLK/BLV w teście PLA przy rozpoznawaniu enzootycznej białaczki bydła

EWA BUZAŁA, JAN RUŁKA

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Buzała E., Rułka J.

## Diagnostic value of FLK/BLV antigen in PLA test for the detection of bovine leukosis

### Summary

The aim of our study was to improve the diagnostic value of PLA by determining the optimal number of FLK/BLV cells and ABTS substrata in an enzymatic reaction. Three negative and three positive anti-BLV reference sera and 598 sera from 6 farms with cows infected with bovine leukemia virus, as well as 138 sera from farm K with non infected cows were used in our experiments. The OD value of positive reference sera in conjugate dilutions from 1:2000 to 1:10 000 in a group of 10 000 cells/well were 0.021 to 0.089, in a group of 15 000 cells 0.005 to 0.101, and in a group of 20 000 cells from 0.114 to 0.079. The best results were obtained with 1:5000 conjugate dilution and 10 000 cells. The sera from 6 farms showed 64.2%, 73.0%, 75.9% positive results in ID, ELISA and PLA, respectively. The diagnostic value of PLA was consistent with that of ELISA in farms A, B, G and K but a 2.9% difference occurred in the remaining farms. The storage of sera in  $-20^{\circ}\text{C}$  for at least a year disadvantageously effected the PLA results.

**Keywords:** bovine leucosis, diagnosis, PLA

Enzootyczna białaczka bydła występuje głównie u bydła wysokomlecznego i cechuje się rozwojem zmian proliferacyjnych układu limfatycznego, przewlekłą limfocytozą typu B i długim okresem latencji. Diagnostyka zakażeń bydła wirusem białaczki – BLV (Bovine Leukemia Virus) opiera się obecnie na dwu testach serologicznych – immunodyfuzji (ID) i ELISA (11, 12, 14, 15, 17). Niezależnie od wymienionych testów, wykrywanie przeciwciał swoistych czy wirusa BLV jest możliwe przy użyciu seroneutralizacji (19), RIA (5) czy też testu PLA – Peroxidase Linked Assay (21). Osiągnięcia biologii molekularnej dodatkowo pozwoliły na wykorzystanie metody łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR w diagnostyce białaczki bydła (3, 4, 13, 18, 20). Wstępne, pozytywne wyniki badań nad przydatnością metody PLA do diagnostyki zakażeń bydła wirusem BLV (21) stały się inspiracją do dalszych badań nad wykorzystaniem testu w kontroli serologicznej surowic krów pochodzących z dużych gospodarstw hodowlanych.

Celem badań było doskonalenie wartości diagnostycznej testu PLA poprzez wykorzystanie w nim jako antygenu komórek FLK/BLV, określenie optymalnej ich liczby oraz ocena przydatności substratu ABTS w reakcji immunoenzymatycznej.

## Material i metody

**Hodowla komórek FLK/BLV.** Antygen do testu PLA stanowiły komórki płodu owcy – FLK (Foetal Lamb Kidney) zakażone permanentnie wirusem białaczki bydła. Zawiesinę hodowli komórek o koncentracji  $10^3$ ,  $15^3$  i  $20^3/\text{ml}$  rozlewano do baseników mikropłytki (NUNCLON) o objętości 100  $\mu\text{l}$  w płynie wzrostowym RPMI 1640 (GIBCO), z dodatkiem 8% płodowej surowicy cielęcej i antybiotyków (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycyny i 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fungizonu). Jednowarstwowy wzrost hodowli komórek uzyskiwano zwykle po 24 godzinach namnażania w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  i w 5% atmosferze  $\text{CO}_2$ , po czym używano ich do testu PLA.

**Utrwalanie komórek.** Po namnożeniu komórek na mikropłytkę zlewano supernatant, przepłukiwano buforem PBS (150  $\mu\text{l}$ /basenik), utrwalano zimnym roztworem acetonu (40% aceton w PBS w ilości 150  $\mu\text{l}$ ), po czym ponownie nalewano 100  $\mu\text{l}$  ww. buforu i wstawiano na 10-15 minut do zamrażarki  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po usunięciu buforu płytkę osączano na bibule filtracyjnej i suszono przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Tak przygotowanych mikropłytek używano bezpośrednio do testu PLA lub przechowywano je w zamrażarce w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania badania.

**Wykonanie reakcji enzymatycznej PLA.** Do wszystkich baseników mikropłytki z komórkami FLK/BLV nalewano 100  $\mu\text{l}$  ciepłego buforu PBST i wstawiano do termo-

statu w temp. 37°C na 15 min. Po usunięciu buforu mikropłytkę dokładnie osączało i dodawano po 100 µl/basenik referencyjnej bądź badanej surowicy rozcieńczonej 1 : 100 w PBST, po czym inkubowano 1,5 godz. w temp. 37°C, płukano 3 x 5 min. w buforze PBST i dokładnie osączało. Następnie do wszystkich baseneków dodawano 100 µl koniugatu rozcieńczonego 1 : 5000, inkubowano 1,5 godz. w temp. 37°C, płukano 3 x 5 min. buforem PBST i ponownie osączało. Do tak przygotowanych komórek dodawano po 100 µl substratu ABTS, po czym po 1,5 godz. inkubacji w temp. 37°C odczytywano wynik reakcji enzymatycznej.

**Bufory i odczynniki:** Bufor PBS – stosowano bufor Dulbecco's Phosphated Buffered Saline (SIGMA); Bufor PBST (995 ml PBS + 5 ml Tween 20) lub PBS Tween tabletes (GIBCO) – 1 tabletkę ad 500 ml H<sub>2</sub>O; Bufor do rozcieńczania surowic i koniugatu – PBST + 20% surowicy końskiej (SIGMA); Bufor do utrwalania komórek – 40% aceton w PBS (nie zawierający jonów Ca<sup>++</sup> i Mg<sup>++</sup>); Substrat ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzathiazoline-6-sulfonic acid) – SIGMA) – 1 tabletkę 10 mg rozpuszczono w 10 ml buforu boranowego: (3,25 ml 100 mM NaBO<sub>3</sub> × 4H<sub>2</sub>O, 39,8 ml 100 mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> × H<sub>2</sub>O, 30 ml 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O red. ad 100 ml), pH 4,4-4,5. Koniugat – surowica królicza anty IgG bydła (SIGMA) znakowana peroksydazą, dodawana do wszystkich baseneków w ilości 100 µl z rozcieńczenia 1 : 5000.

**Odczyt wyników.** Pojawienie się wyraźnego niebiesko-zielonego zabarwienia w basenkach z dodatnią surowicą wskazywało na obecność immunologicznych kompleksów antygen/przeciwciała i po 1,5 godz. dokonywano odczytu reakcji enzymatycznej. Odczyt ten prowadzono w czytniku ELISA Stat Fax 2100 przy długości fali 405 nm i 630 nm. Przy obliczaniu rzeczywistej wartości liczbowej ekstynkcji (OD) surowicy badanej, odliczano od jej wartości OD próby ślepej (blank). W oparciu o uzyskane wyniki surowic ujemnych i dodatnich w reakcji immunoperoxydazowej za minimalną wartość odczytu OD dla surowic dodatnich przyjęto liczbę 0,100. Wszystkie wartości OD mieszczące się poniżej liczby 0,100 przyjęto jako wartości surowic ujemnych.

**Odczyn immunodyszufji w żelu agarozowym (ID).** Test wykonywano wg obowiązującej instrukcji (6).

**Test ELISA.** Przeciwciała anty BLV wykrywano przy użyciu zestawu ELISA produkcji Biovet Ivanovice, ČR, ściśle wg instrukcji producenta.

**Surowice.** Do badań użyto 3 ujemnych, 3 dodatnich surowic referencyjnych dla wirusa BLV, 598 surowic krów pochodzących z 6 gospodarstw hodowlanych zapowietrzonych

**Tab. 1. Wyniki kontroli serologicznej zakażeń bydła wirusem BLV przy użyciu testu PLA**

Gospodarstwo	Liczba zwierząt badanych	Wynik	Test serologiczny		
			ID	ELISA	PLA
A	46	+	34 (73,9%)	39 (84,7%)	39 (84,7%)
		-	12	7	7
B	10	+	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
		-	0	0	0
C	99	+	81 (81,8%)	91 (91,9%)	92 (92,9%)
		-	18	8	7
D	88	+	72 (81,8%)	78 (88,6%)	88 (100%)
		-	16	10	0
F	100	+	44 (44,0%)	54 (54,0%)	56 (56,0%)
		-	56	46	54
G	110	+	50 (45,4%)	59 (53,6%)	59 (53,6%)
		-	60	51	51
Razem	453	+ -	291 (64,2%)	331 (73,0%)	344 (75,9%)
C I	49	+	26 (53,0%)	38 (77,5%)	29 (59,2%)
		-	23	11	20
C II	96	+	19 (19,8%)	35 (36,4%)	9 (9,4%)
		-	77	61	87
K <sup>k</sup>	138	-	138	138	138
Liczba zwierząt badanych ogółem	734	+	336 (56,2%)	404 (67,5%)	382 (63,8%)
		-	400	332	354

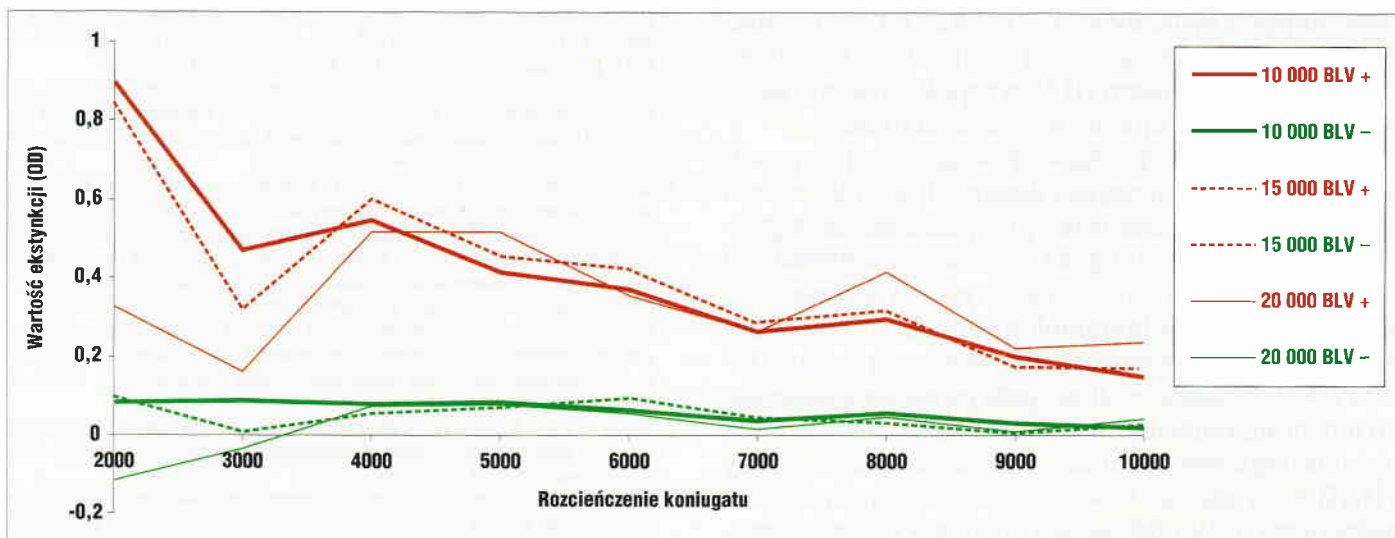
Objaśnienia: I – surowice badano testem PLA w rok i 3 tyg. po kontroli ELISA, II – surowice badano testem PLA w 1,5 roku po kontroli ELISA, k – surowice krów z gospodarstwa, gdzie od wielu lat nie notowano dodatnich wyników kontroli serologicznej dla BLV

nych od wielu lat wirusem enzoptycznej białaczki bydła oraz 138 surowic z gospodarstwa K wolnego od białaczki. Wszystkie surowice referencyjne badano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej. Ogółem w gospodarstwie A zbadano 46 próbek, w B – 10, w C – 99, w D – 88, w F – 100 i w G – 110 próbek. W przypadku gospodarstwa C badanie testem PLA przeprowadzono z użyciem 49 surowic przechowywanych przez rok w temp. -20°C (grupa C I) oraz na 96 surowicach po 1,5 roku przechowywania w ww. temperaturze (grupa C II).

## Wyniki i omówienie

Otrzymane rezultaty ilustruje tab. 1 i ryc.1. Wyniki testu PLA porównano z wynikami odczynu ID oraz ELISA. Wartości liczbowe OD przy koncentracji 10 000 komórek w baseniku dla referencyjnych dodatnich surowic anty-BLV, wahały się od 0,149 do 0,898, przy użyciu 15 000 komórek – od 0,168 do 0,840, zaś przy 20 000 – od 0,161 do 0,518 (ryc. 1).

Wartości liczbowe OD dla referencyjnych surowic ujemnych przy rozcieńczeniach koniugatu 1 : 2000 – 1 : 10 000 wynosiły: w grupie 10 000 komórek – od 0,021 do 0,089, w grupie 15 000 – od 0,005 do 0,101



Surowice referencyjne	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10 000	Koncentracja komórek
BLV+	0,898 <sup>x</sup>	0,471	0,548	0,415	0,371	0,263	0,295	0,200	0,149	10 000
BLV-	0,094 <sup>z</sup>	0,089	0,081	0,084	0,065	0,038	0,057	0,032	0,021	10 000
BLV+	0,840	0,321	0,603	0,457	0,423	0,284	0,320	0,175	0,168	15 000
BLV-	0,101	0,009	0,056	0,071	0,081	0,046	0,035	0,005	0,028	15 000
BLV+	0,327	0,161	0,518	0,517	0,355	0,263	0,416	0,221	0,237	20 000
BLV-	-0,014	0,033	0,075	0,079	0,056	0,016	0,047	0,011	0,044	20 000

Ryc. 1. Średnie wartości ekstynkcji (OD) dla referencyjnych surowic ujemnych i dodatnich anti-BLV

Objaśnienia: x – wartość liczbową średniej arytmetycznej dla 3 surowic referencyjnych BLV+, z – wartość liczbową średniej arytmetycznej dla 3 surowic ujemnych (surowice referencyjne badano 3-krotnie)

i w grupie 20 000 komórek – od -0,114 do 0,079. Biorąc pod uwagę, że wartości liczbowe OD zarówno dla surowic ujemnych, jak i dodatnich anti-BLV były najbardziej rozbieżne przy rozcieńczeniu koniugatu 1 : 2000 i 1 : 3000, za robocze jego rozcieńczenie przyjęto 1 : 5000. Trudna jest obiektywna ocena tzw. „szarej strefy wyników”, jednakże w oparciu o wstępne wyniki badań najlepszą powtarzalność rezultatów uzyskano przy rozcieńczeniu koniugatu 1 : 5000 i liczbie 10 000 komórek/baseniek. W pozostałych rozcieńczeniach koniugatu (1 : 7000-1 : 10 000) wartości liczbowe OD dla surowic dodatnich były jednak znacznie zaniżone i zbliżały się do 50% wartości OD dla rozcieńczeń 1 : 4000/1 : 6000.

Kontrolę serologiczną surowic krów pochodzących z 6 gospodarstw hodowlanych zapowietrzonych od wielu lat wirusem enzoptycznej białaczki była przeprowadzona równocześnie testem ID, ELISA i PLA. Wszystkie wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z dwu próbek odczytu w teście ELISA i PLA. Uzyskane rezultaty ilustruje tab. 1. Ogółem w gospodarstwach A-G zbadano 453 próbek surowic nie mrożonych, badanych w okresie do 2 tygodni od czasu pobrania. W przypadku surowic krów gospodarstwa C badanie testem PLA powtórzono na 49 surowicach po roku przechowywania w temp. zamrażarki

-20°C (grupa C I) oraz na 96 surowicach po 1,5 roku przechowywania (grupa C II). Ogółem w badaniach powtórzonych użyto 145 surowic badanych.

W kontroli serologicznej 453 surowic świeżych, nie mrożonych stwierdzono 291 (64,2%) dodatnich wyników w odczynie ID, 331 (73,0%) w ELISA i 344 (75,9%) w teście PLA. Niebieskozielone zabarwienie zawiesiny surowicy badanej w poszczególnych baseniach jest wyraźnym wskaźnikiem obecności swoitych kompleksów antygen BLV – przeciwciała. Właściwym wskaźnikiem swoistej reakcji jest jednak wartość liczbową ekstynkcji (OD) powyższej reakcji serologicznej. Należy stwierdzić, że wartość diagnostyczna testu PLA pokrywała się z kontrolą surowic testem ELISA w gospodarstwach A, B i G, zaś w pozostałych notowana różnica wynosiła 2,9%. Znacznie gorsze rezultaty testu PLA odnotowano przy kontroli surowic przechowywanych przez okres 1 i 1,5 roku w warunkach temperatury -20°C. Ogółem w grupie C I uzyskano 26 (53,0%) dodatnich wyników w odczynie ID, 38 (77,5%) w ELISA i 29 (59,2%) w teście PLA, zaś w grupie C II liczba dodatnich wyników w ID wynosiła 19 (19,8%), w ELISA – 35 (36,4%), a w teście PLA tylko 9 (9,4%). Ogółem spośród 598 zwierząt badanych dodatni wynik odczynu ID stwierdzono u 336 (56,2%) sztuk, ELISA – u 404 (67,5%) sztuk i testu



immunoperoksydazowego – u 382 (63,8%) sztuk. W gospodarstwie K, gdzie od wielu lat nie notowano zakażeń bydła wirusem BLV, wszystkie badane surowice wykazywały ujemny wynik testu PLA.

Trudno na obecnym etapie stwierdzić, co jest powodem tak dużej rozbieżności dodatnich wyników testu ELISA i PLA. Można tylko przypuszczać, że wytrącone ujemną temperaturą przeciwciała (krioglobuliny) dla BLV zmieniają swoje właściwości tworzenia swoistych kompleksów immunologicznych, co w decydujący sposób mogło wpłynąć na ostateczną wartość testu PLA. Uzyskane rezultaty pokrywają się z sugestiami innych autorów (cyt. 15), którzy zaznaczają, że kri-immunologiczne techniki z użyciem peroksydazy i DAB prowadzą do powstawania znacznych strąków nieswoistych. W efekcie, w badaniach własnych mogło mieć miejsce wytrącenie globulin odpornościowych w roztworze, powstanie dużych konglomeratów przeciwciał, co mogło spowodować zmniejszenie się ilości miejsc receptorowych i powstawanie wyników fałszywie ujemnych. Badania wielu autorów wykazały, że test PLA jest przydatny nie tylko do wykrywania przeciwciał (8-10, 16), ale i białek wirusowych (21). Szczególną jego przydatność wykazano w diagnostyce pomoru świń (1, 7, 10), zakaźnej biegunki bydła (2), herpeswirusa kotów FHV-1 (22).

Przeprowadzone badania wykazały, że średnie wartości liczbowe ekstynkcji (OD) zarówno dla badanych surowic ujemnych, jak i dodatnich były rozbieżne przy rozcieńczeniu 1 : 2000 i 1 : 3000, w związku z czym za robocze rozcieńczenie koniugatu przyjęto 1 : 5000. Najbardziej optymalne wyniki testu PLA uzyskano również przy 10 000 komórek/basenik. Kontrola 453 surowic badanych w krótkim czasie po pobraniu, w powyższych warunkach, wykazała porównywalne wyniki z wynikami uzyskanymi przy pomocy testu ELISA. Ogółem w kontroli tych surowic stwierdzono 291 (64,2%) dodatnich rezultatów w odczynie ID, 331 (73,0%) – w ELISA i 344 (75,9%) – w immunoperoksydazowym teście PLA. Przechowywanie surowic w stanie zamrożenia w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  przez okres co najmniej 1 roku miało zdecydowanie ujemny wpływ na ostateczny wynik kontroli serologicznej testem PLA.

Reasumując należy stwierdzić, że immunoperoksydazowy test PLA jest prostym, swoistym i czułym testem diagnostycznym do wykrywania zakażeń bydła wirusem enzoptycznej białaczki.

## Piśmiennictwo

1. Afshar A., Dulac G., Bouffard A.: Application of peroxidase labeled antibody assays for detection of porcine IgG antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhoea viruses. *J. Virol. Methods* 1989, 23, 253-261.
2. Elahi S., Harpin S., Corneglia E., Talbot B., Elazhary Y.: Antigenic variation among bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains and the role of different cell fixation methods in immunoassays. *Can. J. Vet. Res.* 1997, 61, 34-38.
3. Fechner H., Kurg A., Geuel L., Blancenstein P., Mowes G., Ebner D., Beier D.: Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med. B* 1996, 43, 621-630.
4. Gaudi S., Ponti W., Agresti A., Meneveri R., Malcovati M., Bonizzi L., Poli G., Amato A., Ginelli E.: Detection of bovine leukemia virus (BLV) infection by DNA probe technology. *Molec. Cell Probes* 1990, 4, 163-174.
5. Graves D., Mc Qude M., Weibel K.: Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay with an early polycaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 960-966.
6. Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Instrukcja serologicznego rozpoznawania enzoptycznej białaczki bydła przy użyciu testu immunodiffuzji w żelu (ID). Nr 54. *Min. Roln. i Gospod. Żywn. Dep. Wet.* z dnia 29 lutego 1983 r.
7. Hergarten G., Hürter K., Hess R.: Nachweis der Infektion mit dem Virus der klassischen Schweinepest bei Schwarzwild: ein Vergleich verschiedener labor-diagnostischer Methoden. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 2001, 108, 51-54.
8. Hyera J., Dahle J., Liess B., Moening V., Frey H.: Gewinnung hochtitiger Antisera gegen BVD-Virus aus Schweinen und ihre Verwendung für direkte Immunofluoreszenz- und Immunoperoxidase Techniken. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 1987, 94, 576-580.
9. Hyera J., Liess B., Frey H.: A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Med.* 1987, 34, 227-239.
10. Jensen M. H.: Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Vet. Scand.* 1981, 22, 85-98.
11. Kita J., Kowalski B., Bienkowski J.: Możliwość uwalniania stad od enzoptycznej białaczki bydła metodą izolacji przy stosowaniu testu immunodiffuzji w żelu agarowym. *Medycyna Wet.* 1987, 43, 93-96.
12. Kozaczyńska B.: Diagnostic value of different ELISA kits for the determination of antibodies against bovine leukemia virus (BLV). *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1999, 43, 133-138.
13. Kuźmak J., Grundboeck J., Kozaczyńska B.: Wykrywanie prowirusowego DNA wirusa białaczki bydła metodą polymerase chain reaction (PCR). *Medycyna Wet.* 1993, 49, 312-315.
14. Łosieczka K., Klimentowski S.: Epizootiologiczne aspekty zwalczania enzoptycznej białaczki bydła (EBB) w hodowli wielkostadnej. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 205-207.
15. Martin D., Arjona A., Soto J., Bargino N., Viana M., Gomez-Lucia E.: Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J. Vet. Med. B.* 2001, 48, 97-106.
16. Pejsak Z.: Zastosowanie testu immunoperoksydazowego do wykrywania obecności wirusa pomoru klasycznego świń. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 265-267.
17. Portetelle D., Bruck C., Mammerickx M., Burny A.: Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *J. Virol. Methods* 1983, 6, 19-29.
18. Rola M., Kuźmak J.: The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Methods* 2002, 99, 33-40.
19. Rutka J., Buzala E.: Diagnostyka enzoptycznej białaczki bydła przy użyciu testu seroneutralizacji. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 708-711.
20. Rutka J., Kubiś P., Dereń W., Buzala E.: Evaluation of the nested-PCR methods for the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2001, 45, 11-19.
21. Rutka J., Wójcik J., Buzala R.: Test immunoperoksydazowy w diagnostyce zakażeń wirusem białaczki bydła. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 738-740.
22. Wójcik J.: Zastosowanie testu IMPA do wykrywania przeciwciał dla herpeswirusa kotów (FHV-1) w Polsce. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 40-420.
23. Zabel M.: Immunocytochemia. PWN, Warszawa 1999, s. 171.

Adres autora: inż. Ewa Buzala, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## MUELLER R. S., BETTENAY S. V.: Skuteczność selamektyny w leczeniu cheyletiellozy psów. (Efficacy of selamectin in the treatment of canine cheyletiellosis). *Vet. Rec.* 151, 773, 2002 (25)

W trzech hodowlach psów zarażonych roztoczem *Cheyletiella yasguri* zastosowano selamektynę w odstępach tygodniowych w ogólnej dawce zalecanej w 4 powtórzeniach, wynoszącej od 6 do 12 mg/kg masy ciała. Zeskrobinę pochodzącą z powierzchniowych warstw skóry, preparaty sporządzane z taśm naklejanych na skórę, włośny i łuszczący się naskórek badano mikroskopowo przed przystąpieniem do pierwszego cyklu leczenia oraz po zakończeniu ostatniego cyklu leczenia. U części chorych psów występował świąd i silne złuszczenie naskórka. Po zakończeniu ostatniego cyklu leczenia wynik badania mikroskopowego zeskrobiny skóry, taśm przyklejonych i włośny był negatywny. Po leczeniu ustąpił świąd skóry.