Nr 4 KWIECIEŃ 1979 ROK XXXV

MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK, prof. dr Abdon STRYSZAK, prof. dr Stanisław WOŁOSZYN

Sekretarz naukowy: dr Elżbieta PEŁCZYŃSKA

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CĄKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, doc. dr Stefan JAKUBOWSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, prof. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, doc. dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Edward PINKIEWICZ, prof. dr Zbigniew SAMBORSKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Eustachy SZELIGOWSKI, doc. dr Krzysztof ŚWIEŻYŃSKI, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

PATOLOGIA I TERAPIA

LUDMIŁA BASSALIK-CHABIELSKA, ZOFIA RYNIEWICZ

Genetyczna odporność zwierząt na niektóre choroby zakaźne. Cz. I. Zarys stosowanych metod

Z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Wpływ czynników dziedzicznych na zdrowie zwierząt był znany od dawna. Przede wszystkim prowadzono badania nad dziedziczeniem wad rozwojowych a także zaburzeń fizjologicznych (7). Prace te są w dalszym ciągu rozwijane, znane są przykłady wyjaśnienia mechanizmu dziedziczenia chorób (protoporfiria u bydła) (13) oraz przykłady wyjaśnienia mechanizmu odporności na choroby (geeldikkop i enzootyczna żółtaczka u owiec) (10). Najwięcej uwagi poświęcono odporności zwierząt na choroby zakaźne. Wykazano, że może być ona cechą gatunkową, rasową lub szczepową. Pierwsze prace mające na celu uzyskanie szczepów drobiu odpornego na tyfus, ospodyfterię, białaczkę i guzy nowotworowe wymieniają w 1932 r. Asmudson i Biely (2) oraz Biely i wsp. (4). Cenne dane na temat wcześniejszych badań nad odpornością zwierząt na choroby zakaźne przytacza Hutt (7) i Zabłocki (16). Są to obserwacje dotyczące odporności rojów pszczelich na zgnilec złośliwy wywołany przez *Bacillus larvae*, względnej odporności niektórych rodów świnek morskich i królików na zakażenie *Mycobacterium tuberculosis*, odporności wyselekcjonowanej rasy królików na myksomatozę. Wzmiankowane są również badania nad odpornością na choroby dużych zwierząt. Dotyczyły one między innymi brucelozy, różycy i dyzenterii u świń, zakaźnego zapalenia płuc o owiec, zapaleń wymion, gruźlicy i pryszczycy u bydła. Wielkie osiągnięcia naukowe w pracach hodowlanych, w badaniach genetycznych i immunologicznych bieżącego stulecia wykorzystywane są obecnie do opracowania programów wprowadzania do praktyki selekcji szczepów lub linii zwierząt o zwiększonej odporności na określone choroby. W przypadku niektórych chorób, jak na przykład choroby Mareka u drobiu, ogromny rozwój badań doprowadził do opracowania szczegółowych pierwszych programów (5) a ich udoskonalenie wydaje się kwestią niedalekiej przyszłości. W przypadku chorób dużych zwierząt zagadnienie jest o wiele bardziej skomplikowane metodycznie i badania te nie są tak zaawansowane. Ponadto zdarza się, że względy ekonomiczne nie potwierdzają celowości tych prac. Porównywane są aktualne koszty leczenia zwierząt i koszty wprowadzenia nowego testu do zespołu cech, które już są brane pod uwagę w selekcji zwierząt gospodarskich. Rachunek

ten nie uwzględnia faktu, że zarówno u małych zwierząt jak i u dużych, choroby wirusowe mogą doprowadzić do zniszczenia populacji i jedynym rozwiązaniem jest hodowla zwierząt bardziej odpornych. Ponadto zbyt częste i nie zawsze uzasadnione stosowanie antybiotyków w leczeniu chorób bakteryjnych może spowodować zajęcie miejsca jednego drobnoustroju chorobotwórczego przez inny, często groźniejszy. Również więc i w tym przypadku zadaniem przyszłości jest podniesienie nieswoistej i swoistej odporności zwierząt (9).

Koniecznym warunkiem prowadzonych badań jest uzyskanie na drodze selekcji, czy selekcji połączonej z krzyżowaniem, nie tylko zwierząt bardziej odpornych na choroby, lecz również takich, które by nic nie straciły ze swoich korzystnych cech produkcyjnych. Wielu badaczy zajmujących się selekcją kurcząt mniej wrażliwych na chorobę Mareka wykazało, że można skutecznie prowadzić jednocześnie selekcję w kierunku podniesienia odporności na chorobę, podniesienia nieśności kur i innych równie ważnych cech (8). Natomiast duże wątpliwości wśród hodowców budzi prawdopodobieństwo otrzymania krów bardziej odpornych na *mastitis*, a zachowujących niezmienioną wydajność mleka i zdolność wydojową odpowiednio wysoką dla doju maszynowego. Jak się obecnie wydaje, zagadnienie to może być również rozwiązane pomyślnie (3). Natomiast w niektórych przypadkach hodowcy muszą się pogodzić z pewnymi stratami jakości produkcyjnej zwierząt, zyskując ich wyższą odporność na pasożyty. Hodowcy bydła w Australii zostali zmuszeni stratami wynikającymi z inwazji pasożytów, do krzyżowania odpornego na kleszcze bydła zebu z bydłem europejskim, mimo większej wartości mięsnej bydła europejskiego (6).

Najtrudniejszym zadaniem podczas opracowywania programu selekcji zwierząt o podwyższonej odporności na badane schorzenie jest opracowanie metody oceny odporności. Dotyczy to oceny odporności pojedynczych osobników, szczególnie zaś oceny odporności populacji. W przypadku oceny odporności populacji zwierząt laboratoryjnych wprowadza się zarazek do organizmu i dokonuje obserwacji rozwoju choroby u wystarczającej statystycznie liczby osobników i grup osobników utrzymywanych w jednakowych warunkach. Zwierzęta o wartości gospodarskiej są również zakażane doświadczalnie, lub prowadzi się obserwacje częstości naturalnego występowania danej choroby w stadach, grupach półrodzeństwa, względnie rodzeństwa. W tym ostatnim wypadku dobiera się czasem specjalnie wysoko zakażone środowisko. Metodę doświadczalnego zakażania tysięcy, a nawet dziesiątków tysięcy osobników stosowano u drobiu. Ważnym problemem naukowym w tym postępowaniu jest opracowanie optymalnych parametrów, z których najważniejszymi wydają się: odpowiednio przygotowane *inoculum*, sposób wprowadzenia zarazka, wiek zwierzęcia i warunki środowiska nie powodujące dodatkowych stresów i zapewniające zwierzętom kontrolnym dobry wzrost i rozwój. Jakie trudności mogą być związane z przygotowaniem wystandaryzowanego *inoculum* widać z dotychczasowych badań nad chorobami wirusowymi u kurcząt. U podstawy tych badań leży szczegółowa charakterystyka wirusów, względnie zespołów wirusów, będących przyczyną choroby. Z prac prowadzonych zarówno na drobiu jak i na myszach wiadomo, że genomy silnie rakotwórczych wirusów typu C są identyczne z normalną genetyczną informacją komórkową, z tą różnicą, że wskutek procesu rekombinacji, występują one w odmiennej formie. Większa część genomu wirusów mięsaka Rousa jest wspólna z genomem wirusów białaczki typu C, ten zaś występuje w utajonej, podlegającej indukcji postaci w kwasie dezoksyrybonukleinowym normalnej komórki. W genomie wirusów mięsaka występują ponadto rekombinowane z genami wirusa białaczki sekwencje komórkowego kwasu rybonukleinowego. Wirusy białaczki są słabo onkogeniczne, ich okres utajenia w warunkach *in vivo* poprzedzający zainicjowanie nowotworu jest długi, ponadto są one przeważnie niezdolne do przekształcania komórek w warunkach *in vitro*. Wirusy mięsaka typu C łatwo transformują komórki w hodowli *in vitro*, szybko indukują formowanie się guzów w warunkach *in vivo* i przenoszą przynajmniej jeden gen transformujący (1). *Inoculum* powinno zawierać znany zestaw wirusów lub określonego pojedyńczego wirusa w odpowiednio dobranym mianie. Mimo opracowania prawie doskonałych metod zakażania drobiu, wprowadzenie ich do praktyki w celach selekcji osobników, następnie szczepów bardziej odpornych na choroby, napotyka na duże trudności. Trudność ta polega na tym, że selekcję należy powtarzać ze względu na często spotykaną heterozygotyczność odpornych linii w stosunku do genów decydujących o odporności. Hodowcy natomiast nie chcą akceptować wielokrotnych kontrolowanych zakażeń. Ocenę częstości występowania naturalnych zakażeń stosuje się obecnie przede wszystkim w badaniach nad dużymi zwierzętami. Pierwszym warunkiem prawidłowości stosowania metody jest zmniejszenie różnic we wpływach środowiska i wyrównanie prawdopodobieństwa zetknięcia się wszystkich zwierząt z badanym zarazkiem. Pomimo, że czynnik genetyczny leży u podstawy licznych przyczyn, od których zależy rozwój choroby, ujawnienie się odziedziczonej właściwości zależy od warunków. Wielokrotnie podkreślano, że warunki decydują czy dany gen jest korzystny, niekorzystny, czy obojętny. Powszechnie są znane trudności wyodrębnienia tła genetycznego od wpływów środowiska.

Środowisko wywiera ogromny wpływ na cały system immunologiczny. Zagadnieniu temu poświęcono sesję na 60 Zjeździe Federacji Amerykańskich Towarzystw Biologii Doświadczalnej, który się odbył w Kalifornii w 1976 r. Parker (11) omawiając zewnętrzne środowisko człowieka, wymienia takie bodźce jak kurz, pyłki, zarodniki grzybów, nieprzyjemne zapachy, związki chemiczne, z którymi styka się skóra, żywność i wiele innych. Bardzo ważnymi bodźcami są drobnoustroje, zarówno saprofityczne, jak i chorobotwórcze oraz pasożyty widzialne okiem nieuzbrojonym. Bodźce te oddziaływują jako antygeny i indukują pojawienie się przeciwciał lub odczynów typu komórkowego. Niektóre bodźce mogą powodować nieswoistą aktywację mediatorów immunologicznych i tą drogą wpływać na odporność. Zmienna jest jakość i nasilenie tych bodźców, przy czym znaczenie mają zarówno różnice między strefami geograficznymi, jak i różnice między mikrośrodowiskami. Zwierzęta wykazują daleko idące przystosowanie do środowiska. W różnych środowiskach wyselekcjonowują się w sposób naturalny różne genotypy. Zmiany środowiska zewnętrznego zwierząt, spowodowane przez człowieka, powodują zmiany bodźców i często odbijają się ujemnie na ich odporności. Zmiany środowiska zewnętrznego są ponadto przyczyną zakłóceń równowagi środowiska wewnętrznego, które ma ogromne znaczenie dla odporności organizmów. Przykładem tego mogą być zmiany w układzie obejmującym gospodarza i mikroflorę przewodu pokarmowego. Zmiany składu dawki żywieniowej, szczególnie zaś wprowadzenie antybiotyków do pasz zmienia wzajemne stosunki między drobnoustrojami przewodu pokarmowego. Drobnoustroje autochtoniczne przewodu pokarmowego ssaków i ptaków indukują wytwarzanie przeciwciał należących przede wszystkim do sekrecyjnych immunoglobulin klasy A (IgA). Przeciwciała te mają duże znaczenie w odporności zwierząt na liczne drobnoustroje potencjalnie chorobotwórcze, związane z błoną śluzową nabłonka. Przeciwciała działają synergistycznie z mechanizmami interferencyjnymi własnej saprofitycznej mikroflory, która z drugiej strony chroni je przed rozkładem przez enzymy trawienne (15). W badaniach, w których stosuje się metodę określania występowania choroby w naturalnych warunkach liczba wszystkich obserwowanych osobników jest zwykle duża. Wyniki tych badań są wykorzystywane dla oceny współczynników odziedziczalności odporności na daną chorobę. Wysokość współczynnika odziedziczalności wydawała się mieć duży wpływ na wprowadzenie cechy odporności na daną chorobę do selekcji bardziej wartościowych zwierząt. Okazało się jednak, że różni badacze uzyskiwali różne współczynniki odziedziczalności dla tej samej cechy. Typowym przykładem mogą być wartości współczynników odziedziczalności po ojcach odporności krów na *mastitis*. Dane na ten temat przytacza Ryniewicz (14). Rozbieżności między wynikami były spowodowane prowadzeniem badań w różnych środowiskach, gdzie wpływ środowiska na ujawnienie się odporności był różny, ponadto zaś niejednakowymi kryteriami diagnozy choroby. Diagnoza jest specjalnie trudna do ujednolicenia, gdy tak jak w *mastitis*, choroba jest powodowana przez różne drobnoustroje, występujące w różnym nasileniu, często dotyczy tylko jednej lub dwóch ćwiartek gruczołu mlekowego i może być testowana różnymi zmianami chemicznymi zachodzącymi w mleku. W ostatnich latach większą uwagę zaczęto poświęcać współczynnikom korelacji pomiędzy odpornością na chorobę a innymi cechami zwierząt. Wysokie współczynniki korelacji są podstawą do ustalenia wskaźników selekcji. Selekcję można by wtedy prowadzić bez doświadczalnego zakażania zwierząt, uniknęłoby się również ekspozycji zwierząt na zakażenie naturalne.

Właściwości, które brane są pod uwagę, to przede wszystkim budowa antygenowa krwinek i polimorfizm białek enzymatycznych i nieenzymatycznych, występujących w płynach ustrojowych. Szereg interesujących korelacji już znaleziono (12). Znaczenie korelacji zależy od tego, w jakim stopniu geny odpowiedzialne za występowanie cechy wskaźnikowej są sprzężone z genami decydującymi o reakcjach czy właściwościach bezpośrednio wpływających na odporność. Jest to teoretycznie tym trudniejsze do osiągnięcia, im więcej genów znajduje się u podstawy rozważanych cech. Znanym jest faktem, że odporność na choroby jest cechą poligeniczną. Przezwyciężenie tych trudności byłoby możliwe, gdyby wskaźnikami selekcji były cechy bezpośrednio decydujące o odporności. Jak wiadomo, mechanizm odporności może obejmować prócz odporności wrodzonej odporność nabytą (czynną i bierną). Odporność może być typu humoralnego i komórkowego.

Dotychczasowe badania wykazały, że nawet w przypadku jednej choroby często są jednocześnie czynne różne mechanizmy odporności. Największe osiągnięcia ostatnich lat polegają na wyjaśnieniu, które elementy układu obronnego zwierzęcia stoją u podstawy jego genetycznej odporności na określoną chorobę oraz które geny są za nie odpowiedzialne.

Wyniki badań w rozwiązywaniu kilku konkretnych problemów przedstawione będą w następnych częściach pracy.

Piśmiennictwo

1. *Anderson G. R., Matovcik L. M.*: Science. 197, 1371, 1977.
2. *Asmundson V. S., Biely J.*: Can. J. Res. 6, 171, 1932.
3. *Bassalik-Chabielska L., Ryniewicz Z.*: Proc. Inter. Symp. Machine Milking, Louisville, Kentucky, USA, 301, 1978.
4. *Biely J., Palmer E., Asmundson V. S.*: Can. J. Res. 6, 374, 1932.
5. *Cole R. K.*: Avian Dis. 12, 9, 1968.
6. *Dowling D. F.*: Aust. vet. J. 54, 47, 1978.
7. *Hutt F. B.*: Genetyczna odporność zwierząt na choroby. PWRL 1964.
8. *Hutt F. B., Cole R. K.*: J. Am. vet. med. Ass. 131, 491, 1957.

9. *Jeliaszewicz J.*: Posiedzenie Oddziału Warszawskiego Tow. Farmak., Polskiego Tow. Mikrobiol. i Działu Inf. Nauk. Tarchomińskich Zakładów Farmaceut. Polfa, 1978.
10. *Osterhoff D. R.*: Anim. Blood Grps biochem. Genet. 2, 181, 1971.
11. *Parker C. W.*: Fedn. Proc. 36, 1725, 1977.
12. *Przytulski T., Porzeczkowska D.*: Theor. Appl. Genetics. 48, 237, 1976.
13. *Ruth G. R., Schwartz S., Stephenson B.*: Science, 198, 199, 1977.
14. *Ryniewicz Z.*: Biul. IGHZ PAN 26, 87, 1972.
15. *Savage D. C.*: Microbial Ecology of the Gut. Acad. Press 1977.
16. *Zabłocki B.*: Podstawy współczesnej immunobiologii. PWN 1973.

Adres autora: prof. dr Ludmiła Bassalik-Chabielska, ul. Brzozowa 10 m. 3, 00-286 Warszawa.

ELIGIUSZ MADEJ, ADAM STEC, JÓZEF FILAR, WACŁAW PATYRA

Ocena testu do wykrywania stanu niedoboru magnezu u bydła

Z Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie
Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Hipomagnezemia krów mlecznych występuje na pewnych terenach dość często i stanowi istotny problem dla służby weterynaryjnej (2, 3, 15, 17, 20, 24, 25). Może być przyczyną manifestującej się ciężkimi objawami i trudnej do leczenia tężyczki lub też przebiega w formie utajonej bez wyraźnych objawów klinicznych, powodując obniżenie mleczności i ogólnej odporności oraz gorszą kondycję zwierząt. Magnez spełnia bowiem szereg ważnych funkcji w ustroju i odpowiedni jego poziom jest konieczny dla prawidłowego przebiegu przemiany materii (1).

Ponieważ problem hipomagnezemii jest aktualny także na terenie Polski (5, 6, 27, 30), wczesne wykrywanie tego stanu i niedopuszczanie do rozwoju objawów klinicznych oraz powstawania innych pośrednich strat ekonomicznych wydaje się być zagadnieniem bardzo ważnym. Powstało zapotrzebowanie na prosty test diagnostyczny, umożliwiający szybkie rozpoznanie deficytu Mg w warunkach terenowych. Dlatego z zainteresowaniem podjęliśmy się oceny przydatności testu do szybkiego wykrywania niedoboru magnezu u bydła, opracowanego w Instytucie Zootechniki, Zootechnicznym Zakładzie Doświadczalnym w Grodźcu Śląskim (14).

Zasada i sposób przeprowadzania testu

Autorzy pomysłu wykorzystali zjawisko dużej różnicy stężeń Mg w moczu w zależności od zaopatrzenia organizmu w ten pierwiastek. Przyjęli zgodnie z piśmiennictwem (9, 11, 12), że u krów dobrze zaopatrzonych w magnez, jego stężenie w moczu jest wyższe niż 10 mg/100 ml, natomiast w przypadku niedoboru spada poniżej 5 mg/100 ml.

Test wykonuje się w specjalnie do tego celu skonstruowanej, wyskalowanej probówce, do której najpierw odmierza się 1,5 ml odczynnika A, następnie 10 ml odczynnika B, a po ich wymieszaniu dodaje się 5 ml moczu. Całość miesza się ponownie i pozostawia na okres jednej godziny. W wyniku reakcji związków zawartych w odczynnikach (głównym składnikiem jest 8-hydroksychinolina) z moczem powstaje osad, którego ilość odczytana po 1 godzinie ma świadczyć o stężeniu Mg w moczu i pośrednio o stanie zaopatrzenia ustroju w ten pierwiastek. Brak osadu lub ilość nie przekraczająca 20 µl ma wskazywać na niedobór lub niepełne pokrycie zapotrzebowania a wartości wyższe o wystarczającym lub obfitym zaopatrzeniu.

Badania własne

Celem badań własnych była ocena proponowanego testu poprzez określenie swoistości i sugerowanej dokładności wynikających z założeń teoretycznych. Staraliśmy się więc ustalić czy ilość osadu pozostaje w prostym związku z faktycznym stężeniem Mg w moczu, a równocześnie w jakim stopniu stężenie w moczu odzwierciedla aktualny stan wysycenia organizmu w Mg oceniany na podstawie poziomu w surowicy.

Dodatkowym ale nie mniej ważnym celem była ocena możliwości stosowania testu w warunkach terenowych poprzez analizę techniki wykonywania testu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 250 sztukach bydła, głównie krowach mlecznych w okresie wiosny i jesieni 1977 r. Zwierzęta były w wieku od 6 miesięcy do 18 lat i w różnych okresach fizjologicznych oraz pozostawały w okresie badań na zróżnicowanej diecie, której podstawowym składnikiem były zielonki z traw, roślin motylkowych i kukurydzy.

Podstawową grupę stanowiło 189 krów i 20 bukatów nie wykazujących klinicznych objawów choroby (z wyjątkiem 2 z objawami tężyczki), pochodzących z 9 gospodarstw zespołowych oraz 48 indywidualnych woj. lubelskiego i chełmskiego.

Dodatkowo przebadano 41 krów leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych Wydz. Wet. w Lublinie. Zwierzęta tej grupy wykazywały różne objawy chorobowe, najczęściej ograniczenie lub zupełny brak apetytu a dość często zmiany w moczu w postaci zmętnienia lub tylko białkomoczu i niskiego ciężaru właściwego.

Mocz do badań pobierano rano najczęściej przed udojem i karmieniem w 3/4 przypadków w czasie samoistnego oddawania a w 1/4 przy użyciu kateteru. Równocześnie z moczem pobierano krew z żyły jarzmowej (od krów chorych przed zastosowaniem leków).

Poziomy Mg w moczu i surowicy oznaczono spektrofotometrem absorpcji atomowej i met. Langego.

W celu wykluczenia wpływu niektórych czynników dodatkowych przeprowadzono badania testowe z próbami moczu o sztucznie podwyższonym i obniżonym pH. Sprawdzono także zachowanie się testu po upływie różnego czasu od chwili pobrania moczu do momentu przeprowadzania badania oraz po dodatkowym wzbogaceniu moczu związkami magnezu i wapnia.