

12. *Mayr A., Himmer B., Baljer G., Saller J.*: Zbl. Bakt. Parasit. Kde I 244, 506, 1979.
13. *Mayr A., Raettig H., Stickl H., Alexander M.*: Fortschr. Med. 97, 1159 i 1205, 1979.
14. *Mayr A., Stickl H., Westhues M., Glüesberger W., Schwarz D., Bidrack B.*: Fortschr. Med. 95, 87 i 119, 1977.
15. *Mazurczak J.*: dane przedstawione na konferencji poświęconej chorobie pęcherzykowej, Dep. Wet. Min. Rol. 1973.
16. *Pasquinuci G.*: Lancet 1, 136, 1971.
17. *Podlewski J. K., Chwałibóg-Podlowska A.*: Leki współczesnej terapii. PZWL, 1974.
18. *Poradnik terapeutyczny.* PZWL, 1975.
19. *Pschyrembel W.*: Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin 1975.
20. *Stickl H., Mayr A.*: Fortschr. Med. 97, 1781, 1979.
21. *Thein P., Leistner W., Hechler H.*: Zbl. Vet.Med. B 27, 499, 1980.
22. *Wiesner E., Ribbeck R.*: Wörterbuch der Veterinärmedizin. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978.
23. *Wizigmann G.*: Tierärztl. Umsch. 32, 532, 1977.
24. *Wizigmann G.*: Prakt. Tierarzt 59, 765, 1978.
25. *Wizigmann G.*: Fortschr. Vet. Med. 51, 1978.

Adres autora: prof. dr Zdzisław Larski, Kortowo, bl. 37, 10-957 Olsztyn.

MARIAN GRUNDBOECK, JADWIGA GRUNDBOECK-JUŚKO

Serologiczne rozpoznawanie białaczki bydła w kraju.

I. Ocena metody i pierwszych wyników

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

Dla serologicznej diagnostyki enzootycznej białaczki bydła rok 1972 był przełomowy. Ukazały się wówczas dwie amerykańskie publikacje Miller i Olsona (11) o wykrywaniu swoistych dla białaczki przeciwciał odczynem immunodyszufuzji w żelu oraz praca Ferrera i wsp. (1) o wykorzystaniu do tego celu odczynu immunofluorescencji. Metoda użyta w pierwszej z wymienionych prac okazała się bardzo przydatna do badań rutynowych, toteż w ciągu kilku lat rozpowszechniła się na całym świecie oddając znaczne usługi w zwalczaniu białaczki i zapobieganiu tej chorobie. Czyniono również liczne próby zastosowania tu innych odczynów serologicznych: radioimmunologicznego, immunoperoksydazowego, inaktywacji wirusa, wiązania dopełniacza, a ostatnio odczynu ELISA. Metody te zostały scharakteryzowane w innych publikacjach dostępnych dla polskiego czytelnika (6, 7). Pomimo tego, że wymienione metody są w większym stopniu bardziej czułe od odczynu immunodyszufuzji w żelu, odczyn ten niezmiennie odgrywa czołową rolę w diagnostyce omawianej choroby.

Na międzynarodowej konferencji poświęconej rozpoznawaniu białaczki bydła, która odbyła się w Rotterdamie w 1977 r i w której uczestniczyła większość światowych autoritetów z zakresu tej choroby, wydano następujące zalecenie: „Odczyn immunodyszufuzji w żelu agarowym przy użyciu glikoproteidowego antygenu wirusa białaczki jest swoisty, czuły i bardzo prosty w wykonaniu. Zaleca się, by do czasu uzyskania bardziej praktycznej metody, każde laboratorium zajmujące się białaczką bydła dysponowało tym odczynem niezależnie od innej metody wykrywania przeciwciał dla BLV, w której to laboratorium się wyspecjalizowało.” (16).

Do odczynu immunodyszufuzji w żelu wprowadzono szereg modyfikacji, które bądź to zwiększyły jego czułość, bądź zmniejszyły pracochłonność, lub pozwalały na oszczędność zużycia antygeny. Początkowo za antygen służył etero-

wy ekstrakt z wirusa białaczki. Preparat tego rodzaju zawierał przede wszystkim swoiste białko o masie cząsteczkowej 24 000 d, określane symbolem p24. Później w powszechne użycie wszedł antygen glikoproteidowy. Przeciwciała dla tego antygenu występują u przeżywiającej liczby zwierząt zakażonych wirusem białaczki, podczas gdy przeciwciała dla antygenu p24 są spotykane znacznie rzadziej. W badaniach rutynowych używa się najczęściej tzw. antygenu podwójnego (dual antigen), który obok zasadniczego, glikoproteidowego komponentu związanego z otoczką wirusa, zawiera antygen p24 pochodzący z wnętrza wirionu. Antygen ten wykazuje podobne spektrum diagnostyczne jak sam antygen glikoproteidowy, ale jego produkcja jest znacznie prostsza niż uzyskanie immunologicznie czynnych białek wirusowych w czystej postaci.

Przystępując do rozpoznawania białaczki bydła przy użyciu serologicznych metod, badacze polscy korzystali z doświadczeń uzyskanych w USA i w niektórych państwach Europy. Doświadczenia te nie tylko ułatwiły wybór odpowiedniego odczynu serologicznego i metod produkcji antygenu. Stanowiły one nadto podstawę oceny pierwszych uzyskanych wyników.

Zgodnie z pismem Departamentu Weterynarii, Ministerstwa Rolnictwa, znak WETz.IV. 4411/b-15/80, Instytut Weterynarii w Puławach rozpoczął z dniem 1 czerwca 1980 r. prowadzenie serologicznych badań rozpoznawczych białaczki bydła. Badaniami tymi objęto hodowlane bydło importowane z zagranicy i eksportowane oraz część hodowli krajowej, zwłaszcza wielkostatnej. W części przypadków badano całe pogłowie stada. Częściej ograniczano się do badania tylko hematologicznie niepodjęrzanych zwierząt. W paru oborach przebadano natomiast tylko sztuki wykazujące limfocytozę celem zweryfikowania rozpoznania hematologicznego. W pierwszym roku akcji przebadano około 4500 sztuk bydła, głównie krów i jałówek.

Tab. 1. Porównanie częstości występowania limfocytozy (hem.+) oraz dodatnich odczynów serologicznych (immunodyfuzja w żelu) w stadach bydła, według piśmiennictwa

Autorzy	Liczba zwierząt	% zwierząt		Stosunek serol. +/hem. +	Uwagi
		hem. +	serol. +		
Paulsen i wsp. (15)	88	24	40	1,7	
Ressang i wsp. (17)	516	4	9	2,2	
Mammerickx i wsp. (10)	245	17	18	1,1	
Grandinaru i wsp. (5)	92	46	56	1,2	
Valichov i wsp. (20)	769	12	36	3,0	
"	2412	2	12	6,0	
Frenzel i wsp. (3)	220	5	4	0,9	antyg. p15
			1	0,2	" p24
			28	6,1	" gp69
			28	6,1	" BLV

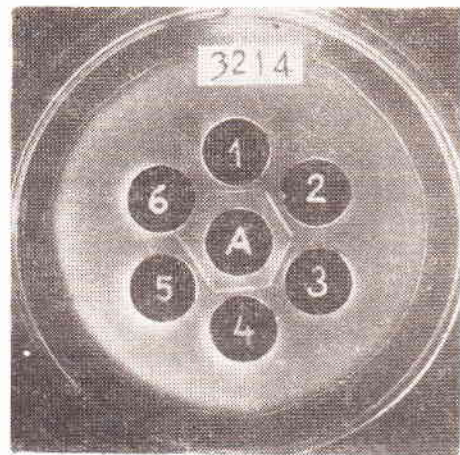
Tab. 2. Częstość występowania dodatnich odczynów serologicznych (immunodyfuzja w żelu) u bydła ze znaczną limfocytozą (hem.+), z mierną limfocytozą (hem.±) oraz z prawidłowym poziomem limfocytów (hem.-), według piśmiennictwa

Autorzy	Liczba zwierząt			% zwierząt serol.+	Uwagi	
	hem. +	hem. ±	hem. -			
Paulsen i wsp. (14)	107	37		87		
					65	
			2442	3		
Frenzel i wsp. (4)	68	55		51		
					14	
			245	2		
Frenzel i wsp. (2)	39	32		97		
					62	
			493	17	Stada białaczkowe	
			227	0	Stado wolne od biał.	

W pracy tej przedstawiono metody badań oraz część wyników, które poddano analizie uwzględniając: częstość występowania dodatnich i ujemnych odczynów serologicznych w poszczególnych stadach, zgodność odczynów serologicznych z wynikiem badania hematologicznego, czas inkubacji odczynu oraz częstość odczynów przy użyciu dwóch różnych preparatów antygenowych. Wyliczone na tej podstawie wskaźniki zestawiono z analogicznymi wartościami podanymi w zagranicznym piśmiennictwie.

Metody użyte do badań serologicznych w kraju

Rozpoznawanie białaczki bydła oparto na odczynie immunodyfuzji w żelu z zastosowaniem antygeny podwójnego. Antygen ten produkowano we własnym zakresie przy użyciu linii komórkowej FLK-BLV, którą uzyskano w Państwowym Laboratorium Chorób Zwierzęcych w Ames, Iowa, USA (21). Wytrącanie immunologicznie czynnych białek z hodowli oraz ich oczyszczanie i zagęszczanie przeprowadzano według metody podanej przez Miller i Van Der Maatena (12). Nadto przeprowadzono nie-liczne próby zastosowania antygeny eteroopor-



Ryc. 1. Odczyn immunodyfuzji w żelu. W środkowej studzienki (A) jest antygen glikoproteidowy. W studzienkach 2. i 5. jest surowica wzorcowa zawierająca przeciwciała dla wirusa białaczki. Studzienka 6 zawiera surowicę krwi, wolnej od wirusa białaczki. W pozostałych trzech studzienkach surowice zwierząt zakażonych

nego (p24), który uzyskiwano z krótkoterminowych hodowli limfocytów krwi białaczkowych krów przy użyciu metody Miller i Olsona (11). Metody uzyskiwania preparatów antygenowych oraz kontrolowania ich aktywności i swoistości serologicznej przedstawiono w osobnych publikacjach (8, 9).

Odczyn przeprowadzano w płytkach Petriego o średnicy 6 cm, z żelem agarozowym. Do studzienki centralnej dawano antygen, a do obwodowych badane surowice oraz surowicę standardową zawierającą przeciwciała swoiste dla białaczki. Wynik odczynu sprawdzano po upływie 24, 48 i 72 godzin. Gdy dodatni odczyn występował po 24 godzinach, oznaczano jego nasilenie +++, a dla odczynów występujących o dobę lub dwie później stosowano odpowiednio oznaczenia ++ i +.

Porównanie częstości występowania dodatnich odczynów serologicznych oraz limfocytozy w białaczkowych stadach bydła

Jak przedstawia tab. 3, przebadano dwa stada krów liczące 177 i 109 zwierząt oraz grupę 28 buhajów. Białaczkową limfocytozę wykaza-

Tab. 3. Zestawienie wyników badania hematologicznego i serologicznego w kierunku białaczki w dwu stadach krów i w grupie buhajów. Liczby odczynów hematologicznych i serologicznych podano w procentach

Liczba i rodzaj zwierząt	hematolog. +		hematolog. ±		hematolog. -		Razem		Stosunek ser.+ / hem.+
	ser. +	ser. -	ser. +	ser. -	ser. +	ser. -	ser. +	hem. +	
177 krów	6	2	1	1	29	61	36	8	4
109 ..	5	0	4	10	16	65	25	5	5
28 buhajów	0	0	7	4	14	75	21	0	—
Razem 314 zwierząt	5	1	2	4	23	64	30	6	5

Tab. 4. Częstość dodatnich odczynów serologicznych u jałówek i krów nie wykazujących limfocytozy, w stadach białaczkowych

Jałówki		Krowy	
liczba zwierząt	% odczynów dodatnich	liczba zwierząt	% odczynów dodatnich
36	56	134	60
32	9	68	31
92	7	107	49
9	0	28	50
13	0	87	54
448	5	—	—
21	20	—	—
170	13	—	—
—	—	47	17
—	—	30	43
Razem 821	9	501	47

lo w pierwszym stadzie 8% zwierząt, w drugim 5%, a buhaje były wszystkie hematologicznie ujemne. Dodatnie wartości serologiczne wykazało w poszczególnych grupach 36, 25 i 21% badanych zwierząt. A zatem dodatnie odczyny serologiczne były u krów 4 względnie 5 razy liczniejsze niż hematologiczne rozpoznania białaczki.

Zestawiając przedstawione wartości z analogicznymi liczbami uzyskanymi przez innych autorów (tab. 1) stwierdza się, że zagraniczni badacze posłużyli się materiałem zwierzęcym bardziej zróżnicowanym pod względem stopnia zakażenia wirusem białaczki. Dodatnie wyniki hematologiczne wahały się tu w zakresie 2—46%, a dodatnie wyniki serologiczne 9—56%. Pomijając wyniki uzyskane przy użyciu antygenów p15 i p24, stosunek dodatnich wyników serologicznych do dodatnich wyników hematologicznych w poszczególnych stadach pozostawał w zakresie 1,1—6,1. Oznacza to, że w niektórych pracowniach rozpoznawczych czułość metody serologicznej praktycznie nie różni się od czułości metody hematologicznej. Prawdopodobnie jest to wynikiem niskiej czułości użytego antygeny, jakkolwiek nie można tu wykluczyć, że pewne czynniki fizjopatologiczne spowodowały częściowe zahamowanie wytwarzania przeciwciał względnie były przy-

czyną szczególnie silnego wzrostu poziomu limfocytów w krwi.

Częstość dodatnich odczynów serologicznych u zwierząt z prawidłowym poziomem limfocytów, w stadach białaczkowych

Badaniami objęto bydło z 9 obór oraz grupę 448 jałówek pochodzących ze skupu (tab. 4). W pięciu oborach przebadano zarówno jałówki jak i krowy, w dwu oborach przebadano tylko jałówki, a w dwu pozostałych tylko krowy. Procent odczynów dodatnich w poszczególnych stadach wahał się wśród jałówek od 0 do 56, a u krów od 17 do 60. Procent ten obliczony łącznie dla wszystkich badanych jałówek wynosił 9, a dla wszystkich krów 47. A zatem jałówki wykazały 5-krotnie rzadsze występowanie swoistych przeciwciał niż krowy.

Autorzy zagraniczni wykazali u hematologicznie ujemnego bydła z białaczkowych stad stosunkowo niewielki poziom dodatnich odczynów serologicznych: 3, 2 i 17%. W stadzie wolnym od białaczki, dodatnich odczynów serologicznych nie zanotowano (tab. 2). Wykazane w tych badaniach zjawisko znacznie częstszego występowania dodatnich odczynów serologicznych u dorosłych zwierząt niż u młodych potwierdza liczne obserwacje autorów zagranicznych (10, 18, 19, 20).

Częstość dodatnich odczynów serologicznych u zwierząt wykazujących limfocytozę

Badania przeprowadzono w 3 stadach krów, które przebadano najpierw hematologicznie. Charakterystyczny dla białaczki poziom limfocytów stwierdzono przy pomocy europejskiego klucza białaczkowego łącznie u 126 zwierząt, które następnie poddano badaniu serologicznemu. Wartości procentowe dodatnich odczynów serologicznych wynosiły w tych stadach: 87, 100 i 97 (tab. 5). Analogiczny procent obliczony dla wszystkich zwierząt wynosił 94. Badacze zagraniczni stwierdzili w podobnych warunkach następujące wartości procentowe:

Tab. 5. Częstość dodatnich odczynów serologicznych u krów wykazujących limfocytozę, w stadach białaczkowych

	Liczba zwierząt		% zwierząt serolog.+
	badanych	serolog.+	
	38	33	87
	30	30	100
	58	56	97
Razem	126	119	94

87, 51 i 97 (tab. 2). A zatem, wyniki badań własnych i prac zagranicznych wskazują, że zwierzęta hematologicznie dodatnie można uważać z niewielkim ryzykiem błędu za zakażone wirusem białaczki.

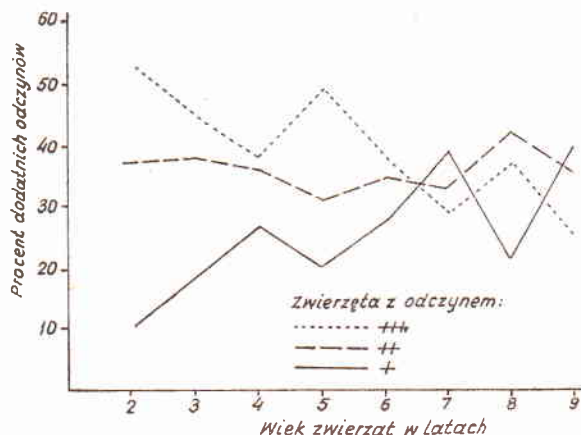
Badanie intensywności odczynów serologicznych

Do badań użyto 630 zwierząt z 5 stad, w których występowała białaczka. Za wskaźnik intensywności odczynu przyjęto czas wystąpienia prążków precypitacyjnych. Kryteria oceny wyników przedstawiono w rozdziale „Metody...”. Należy zaznaczyć, że odczyny wczesne, widoczne po 24 godzinach (+++) odznaczały się z reguły bardzo wyraźnymi prążkami, podczas gdy odczyny późne, widoczne dopiero po 72 godzinach (+), były delikatniejsze, a niekiedy trudno dostrzegalne.

Jak przedstawiono w tab. 6, odczyn o nasileniu +++ zanotowano u 17% zwierząt, odczyn ++ u 15%, odczyn + u 10%, a odczyn ujemny (—) u 58% zwierząt. Od tych wartości, obliczonych dla wszystkich badanych zwierząt, często różniły się analogiczne wskaźniki w poszczególnych stadach. Wśród dodatnich odczynów, w dwu stadach przeważały odczyny +++, w dwu innych odczyny ++, a tylko w jednym stadzie przeważały odczyny późne (+). Biorąc pod uwagę wiek zwierząt, stosunkowo najwięcej odczynów +++ zanotowano u sztuk młodych w wieku do 5 lat. W późniejszym okresie życia częstości występowania dodatnich odczynów o różnym nasileniu są bardzo zbliżone (ryc. 2).

Tab. 6. Występowanie ujemnych odczynów serologicznych (—) oraz odczynów dodatnich o różnym nasileniu (+, ++, +++) w pięciu białaczkowych stadach bydła

Liczba zwierząt	Odsetek odczynów serologicznych			
	—	+	++	+++
173	40	11	27	21
108	72	2	17	9
210	68	5	10	17
102	54	32	0	14
37	62	0	14	24
Razem 630	58	10	15	17



Ryc. 2. Intensywność dodatnich odczynów serologicznych u bydła w zależności od wieku zwierząt

Porównanie odczynów serologicznych przy użyciu różnych antygenów

Do badań użyto antygeny eteroopornego (p24) oraz antygeny podwójnego, którego głównym czynnym komponentem jest glikoproteid. Z tego względu antygen ten oznaczono symbolem gp.

Tab. 7. Zastosowanie antygeny gp i p24 do odczynu immunodiffuzji w żelu

Liczba badanych krów	Liczba dodatnich wyników		Stosunek gp/p24
	z antyg. gp	z antyg. p24	
32	31	14	2,2
236	34	9	3,7
10	10	5	2,0
14	14	4	3,5
37	32	5	6,4
16	1	0	—
Razem 345	122	37	3,3

W tab. 7 przedstawiono porównanie części odczynów dodatnich z antygenem gp i antygenem p24. Stwierdzono, że odczyny z antygenem gp były 2,2 do 6,4 (średnio 3,3) razy liczniejsze niż z antygenem p24. Frenzel i wsp. (3) przebadali 220 sztuk bydła przy użyciu 4 antygenów wirusa białaczki: p15, p24, gp69 i BLV. Liczby dodatnich odczynów z tymi antygenami wynosiły: 9, 2, 61 i 61. Wartości procentowe odpowiadające tym liczbom podano w tab. 1. Podobnym badaniem poddali autorzy japońscy (13) 34 sztuki bydła, u których stwierdzono anatomopatologiczne i histopatologiczne zmiany białaczkowe. Użyto tu trzech różnych antygenów oznaczonych symbolami: gp-45/55, p23 i IAG (wewnętrzny antygen).

Częstość dodatnich odczynów wyrażona w procentach wynosiła kolejno: 12, 56 i 62%. Przedstawione badania wskazują, że na wynik odczynu serologicznego ogromny wpływ wywiera rodzaj antygeny i sposób jego uzyskania.

Wnioski

1. Badania wykazały, że dodatnie wyniki serologiczne pojawiają się w białaczkowych stadach bydła 5-krotnie częściej niż dodatnie wyniki hematologiczne (limfocytoza). Świadczy to, że odczyn odznacza się znaczną czułością i może oddać wielkie usługi w akcji uwalniania stad od białaczki, jak również zabezpieczania ich przed tą chorobą.

2. Stwierdzono, że w białaczkowych stadach około 10% jałówek i 50% krów hematologicznie ujemnych wykazuje dodatni odczyn serologiczny. Wynika stąd, że ujemny wynik badania hematologicznego nie może być podstawą uznania zwierzęcia za wolne od białaczki, zwłaszcza jeśli pochodzi ono ze stada białaczkowego lub nie rozpoznanego pod względem epizootologicznym.

3. U 90—100% krów hematologicznie dodatnich stwierdzono dodatni wynik badania serologicznego. Wynika stąd wniosek, że dodatnich wyników badania hematologicznego nie trzeba weryfikować badaniem serologicznym w stadach, gdzie bezspornie białaczka występuje. Weryfikacja taka jest niezbędna, jeśli w stadach dotychczas wolnych od białaczki pojawiają się pierwoczas przypadki limfocytozy, lub gdy okoliczności wskazują, że limfocytoza może być wywołana innymi niż białaczka czynnikami.

4. Potwierdzono, że odczytanie wyniku odczynu immunodyfuzji w żelu winno być dokonywane po 24, 48 i 72 godzinach. Biorąc pod uwagę, że znaczna część (około 25%) dodatnich odczynów serologicznych uwidacznia się dopiero po upływie 72 godzin byłoby wskazane zbadanie części pojawiających się późnych odczynów (po 96 i 120 godz.) oraz określenie ich wartości diagnostycznej.

5. Badania potwierdziły pogląd, że wartość diagnostyczna odczynu immunodyfuzji w żelu zależy w znacznej mierze od jakości preparatów antygenowych. Dlatego też produkcja antygenów winna być scentralizowana, a wszystkie serie antygeny winny być poddawane ujednocnionej kontroli na aktywność i swoistość serologiczną. Główny nacisk winien być tu położony na wykrywanie zanieczyszczeń nieswoistymi komponentami antygenowymi.

Piśmiennictwo

1. Ferrer J. F.: Cancer Res. 32, 1864, 1972.
2. Frenzel B., Kaaden O. R., Mussgay M.: Dt. tierärztl. Wschr. 85, 45, 1978.
3. Frenzel B., Kaaden O. R., Mussgay M.: Adv. vet. Med., No. 28, 164, 1978.

4. Frenzel B., Kaaden O. R., Mussgay M., Dietzschold B., Straub O. C., Weiland F.: Comp. Leukemia Res. 1975, Bibl. Haemat. No. 43, 368, 1976.
5. Grandinaru D. A., Paltineanu D., Gugiu I., Vior C., Tetu M., Avram N., Moldovan G.: Revta Crest. Animal, Rumun. Nr 11, 30, 1977.
6. Grundboeck M.: Medycyna Wet. 33, 527, 1977.
7. Grundboeck M.: Rozpoznawanie i zwalczanie enzootycznej białaczki bydła. PWRiL 1980.
8. Grundboeck M., Grundboeck-Juško J., Wilczyńska-Ciemiega K., Rulka J.: Uzyskanie swoistych antygenów wirusa enzootycznej białaczki bydła. Pol. Arch. wet., w druku.
9. Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Bull. vet. Inst. Pulawy, 23, 105, 1979.
10. Mammierickx M., Burny A., Dekegel D., Ghysdael J., Kettmann R., Portetelle D.: Zentbl. Vet.Med. B. 24, 349, 1977.
11. Miller J. M., Olson C.: J. natn. Cancer Inst. 49, 1459, 1972.
12. Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: Vet. Microbiol. 1, 195, 1976.
13. Ohshima K., Miura S., Numakunai S., Yasuda Y., Takahashi K., Izawa F., Ozai Y., Omi K.: Jap. J. vet. Sci. 40, 87, 1978.
14. Paulsen J., Bertelsmann K. F., Schliesser Th.: Zentbl. Vet.Med. B. 22, 596, 1975.
15. Paulsen J., Kuwilsky S., Schliesser Th.: Zentbl. Vet.Med. B. 20, 696, 1973.
16. Ressang A. A.: The serological diagnosis of enzootic bovine leukosis. A workshop in the EEC program of coordination of research on bovine leukosis. Aug. 29-30, 1977. Rotterdam, Commission of the European Communities, Luxembourg, 1978.
17. Ressang A. A., Ellens D. J., Mastenbroek N., Quak J., Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: Zentbl. Vet.Med. B. 23, 566, 1976.
18. Robertsson J. A., Karlsson K. A., Hugoson G.: Seminar in the EEC Programme „Bovine leukosis: Various methods of molecular virology”, Bruxelles 1976, p. 191. CEC Inform. Centre, Kirchberg, Luxembourg, 1976.
19. Straub O. C., Fischer W., Frerking H.: Tierärztl. Umsch. 33, 457, 1978.
20. Valchov A. F., Burba L. G., Nachmanson B. M., Zinewics L. A., Kozin A. F., Golovtzenko A. P., Gulubin M. F., Eroshin N. B., Borodin A. G.: Veterinarija, Moskwa, Nr 3, 40, 1978.
21. Van Der Maaten M. J., Miller J. M., Boothe A. D.: J. natn. Cancer Inst. 52, 451, 1972.

Adres autora: prof. dr Marian Grundboeck, ul. 22 Lipca 3/18, 24-100 Puławy.

Грундбек М., Грундбек-Юсько Я. — Серологическое распознавание лейкоза крупного рогатого скота в стране. I. Оценка метода и первых результатов.

Для серологических исследований по распространению вируса лейкоза крупного рогатого скота в стране использовали реакцию иммунодиффузии в геле. Реакцию выполняли, применяя гликопротеидовый антиген (gp), выпущенный в Ветеринарном институте в Пулавах. Первые исследования показали, что серологическая техника показывает в 5 раз больше положительных реакций чем гематологический метод, применяемый в настоящее время в Польше. В лейкомических стадах коровы, отличающиеся характерной для этой болезни картиной крови, показывали противотела для вируса лейкоза скота в 90—100% случаев. У гематологических отрицательных животных из этих же стад эти противотела появлялись только в 50%. Появление рассматриваемых противотел у телок было в 5 раз реже чем у взрослых коров. Отметили также, что преципитационные линии в геле появлялись раньше и были отчетливее у молодых животных. Дополнительно выполнили некоторое число опытов с антигеном р24. Положительные реакции с этим антигеном были в 3 раза реже чем реакции с антигеном gp.

Grundboeck M., Grundboeck-Juško J. — Serological diagnosis of bovine leukosis in Poland. I. Evaluation of the method and preliminary results.

The gel immunodiffusion test has been applied to examine the incidence of bovine leukaemia virus (BLV) infection in Poland. The test was performed using the glycoproteine (gp) antigen, prepared at the

Veterinary Institute in Pulawy. Preliminary examinations indicated that by the serological method five times more positive reactions were obtained than by means of haematological procedure currently accepted in the country. In the herds affected with leukosis the cows with a leukotic blood picture exhibited antibodies against BLV in 90—100 per cent. However, the haematologically negative animals of these herds had specific antibodies only in 50 per cent. The

appearance of antibodies against BLV in heifers occurred five times less frequently than in adult cows. It was also found that the precipitation lines in gel appeared earlier and they were more distinct in the test with sera of young animals. In addition, a number of examinations was carried out with the antigen p24. Positive reactions occurred three times less frequently than those with the antigen gp.

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK, JANUSZ WIERCIŃSKI, IRENA BARCZ, BOGUMIŁ ROKOSZ

Beztlenowce niesporulujące w zakażeniach jamy ustnej i racic cieląt

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin
Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Centralne Laboratorium Aparaturowe AR, ul. Akademicka 13, 20-033 Lublin

Beztlenowce niesporulujące (bn) stanowią ważny, chociaż ciągle za mało poznany i stąd niedoceniany czynnik etiologiczny endogennych zakażeń różnych gatunków zwierząt, w tym także cieląt (19, 23, 31, 33). Wymienione bakterie wywołują między innymi dyfteroid (19) i zanokcicę cieląt (1, 7). Opisy właściwości tych beztlenowców, badanych zwykle dawniej przy użyciu klasycznych metod identyfikacyjnych, mogą budzić — z dzisiejszego punktu widzenia — szereg wątpliwości. W ostatnich bowiem latach dokonał się ogromny postęp w metodach diagnostyki bn. Opracowane zostały nowe zasady tzw. metabolicznej identyfikacji, uwzględniającej analizę składu lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) i kwasów dwukarboksylowych (DK). Metody te, przy badaniu zwierzęcych szczepów niesporulujących (bn), były stosowane tylko wyjątkowo przy zanokcicy bydła (7). Poza tym w dostępnym piśmiennictwie nie napotkano żadnych opisów bn, identyfikowanych w ten sposób, w przypadkach dyfteroidu cieląt.

Metody hodowli beztlenowców niesporulujących posiadają różną wartość praktyczną (29). Spośród zaproponowanych systemów namnażania bn zwykle są używane metody anerostatowe (2, 6) i pyrogallolowe (3, 28). Dotychczas jednak nie były one porównywane w aspekcie efektywności wyosabniania zwierzęcych szczepów bn.

Celem pracy było: a) zdiagnozowanie schorzenia cieląt z objawami zakażenia jamy ustnej i racic, b) określenie składu występujących beztlenowców niesporulujących oraz identyfikacja ich metodą metaboliczną, tj. z uwzględnieniem rodzaju wytwarzanych lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) i kwasów dwukarboksylowych (DK), c) określenie efektywności izolacyjnej metody anerostatowej i pyrogallolowej oraz poznanie składu, diagnozowanej w sposób rutynowy, mikroflory tlenowej.

Materiał i metody

Badane cielęta. Schorzenie wystąpiło w stadzie cieląt, w wieku 4—6 miesięcy i dawało objawy zakażeń sugerujących dyfteroid i zanokcicę. Do badań laboratoryjnych pobrano próbki tkanek ze zmian chorobowych w jamie ustnej i racicach od poddanych ubojowi 2 cieląt.

Hodowla i izolacja. Z pobranych próbek dokonywano wysiewów na podłoże agarowe z dodatkiem 10% surowicy końskiej oraz na pożywkę VL z 5 mcg/ml witaminy K, 5 mg/ml heminy i 5% hemolizatu krwi owczej. Posiane podłoża inkubowano w 37°C przez okres 4—5 dni metodą anerostatową, wcześniej opisaną w pracach własnych (6, 7), oraz metodą pyrogallolową według Pestiego (28). Wycięte wraz z agarem podejrzane kolonie namnażano w półpłynnym podłożu Wrzoska w modyfikacji Cygana i wsp. (5).

Identyfikacja. Metabolizm wszystkich wyosobnionych szczepów bn badano przez określenie rodzaju lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), a z kwasów dwukarboksylowych (DK) — kwasu bursztynowego z zastosowaniem, jako metody identyfikacyjnej — chromatografii gazowej według Ottensteina i Bartleya (27). Przy badaniu LKT dodawano 20 µl 10% eterowego roztworu kwasu heptanowego (C7 — standard wewnętrzny) do 2 ml hodowli na podłożu Beerensa (czas inkubacji w anerostacie 7 dni). Następnie 1 µl tej mieszaniny wstrzykiwano do kolumny chromatografu gazowego Perkin Elmera F 30 (USA). W celu zidentyfikowania kwasu bursztynowego (poszukiwany w badanej hodowli po wprowadzeniu dodatku kwasu laurynowego C12 — jako standardu wewnętrznego) stosowano estryfikację z użyciem 14% BF₃ w propanolu według Daenensa i Laruelle (8). Uzyskane estry wysalano wodnym, nasyconym roztworem NaCl i próbkę w objętości 1 µl, pobraną z górnej warstwy estrowej, wprowadzano do kolumny chromatograficznej SCOT (aparatu Perkin-Elmera F 30, USA). Wyniki oznaczeń wyliczano przy pomocy programowanego integratora Perkin-Elmera M-1 (USA). W dalszej fazie diagnostycznej sprawdzano aktywność fermentacyjną, beztlenowych szczepów, w stosunku do niektórych cukrów i alkoholi oraz działanie proteolityczne wobec mleka, żelatyny i ściętej surowicy. Natomiast tlenowce identyfikowano w sposób rutynowy wykorzystując podłoża różnicujące (Kliglera, SS itp.).

Właściwości chorobotwórcze. Patogenność wszystkich szczepów bn określano na zakażonych dootrzewnowo białych myszach (dawka 48-godzinnej hodowli