

MICHAŁ KONOPA, JOANNA BROMIRSKA *, JERZY NOWACKI

Zastosowanie testu NBT w badaniach nad patogenezą ronień owiec na tle listeriozy

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

* Instytut Pediatrii AM, ul. M. Skłodowskiej-Curie 50, 50-369 Wrocław

Spośród zwierząt gospodarskich listerioza najczęściej występuje u owiec. Pierwsze zachorowania u tych zwierząt opisano w latach trzydziestych i czterdziestych naszego stulecia w Nowej Zelandii, Stanach Zjednoczonych i Niemczech (2). W Polsce po raz pierwszy rozpoznano listeriozę u owiec w 1955 r. (5). U owiec przebiega ona w formie sporadycznych zachorowań lub częściej jako enzootia albo epizootia. Klinicznie u owiec dorosłych spotyka się najczęściej listeriozę centralnego układu nerwowego. W niektórych przypadkach występują objawy ze strony narządu rodnego — zapalenie macicy, zatrzymanie łożyska i zapalenie wymienia. Zakażenie następuje zwykle w drugiej połowie ciąży i prowadzi z reguły do poronień.

Patogeneza ronień owiec na tle listeriozy nie została dotychczas jednoznacznie wyjaśniona. Trwają jednocześnie badania nad mechanizmem wzbudzenia i dynamiką odporności po zakażeniu pałeczkami listerii, pasożytującymi wewnątrzkomórkowo (9, 11, 17). Po zakażeniu organizmu zarazek zostaje pochłonięty przez komórki posiadające zdolność do fagocytozy. Wewnątrz komórek makrofagowych nie ulega on jednak zniszczeniu i może nawet doprowadzić do destrukcji makrofaga (4). Stwierdzono jednak, że ustrój gospodarza jest zdolny wzmocnić skuteczność swoich mechanizmów obronnych aktywując makrofagi do takiego stanu, w którym drobnoustroje zostają zniszczone (6, 7, 10). W dalszych etapach obrony organizmu przed zakażeniem następuje pełny rozwój odporności typu komórkowego, a nieco później, jak się wydaje, odporności typu humoralnego (19).

Granulocyty obojętnochłonne wykazują najsilniejszą aktywność fagocytarną wśród granulocytów krwi. Zauważono, że komórki te posiadają jednocześnie zdolność redukcji barwnika NBT (Nitro Blue Tetrazolium). Po zredukowaniu barwnika NBT powstaje nierozpuszczalny w wodzie formazan, który jest wykrywalny w cytoplazmie komórki przy użyciu odpowiedniej techniki badawczej.

Celem pracy było określenie za pomocą testu NBT aktywności fagocytarnej u owiec ciężarnych zakażonych doświadczalnie *L. monocytogenes*.

Material i metody

Do badań użyto 16 owiec rasy merynos polski w wieku od 2 do 3 lat. Pierwszą grupę stanowiło 12 owiec zakażonych na początku drugiej połowy ciąży

zjadliwym szczepem *L. monocytogenes*, serotyp 5 (Ivanov — Bułgaria) hodowanym na bulionie w temp. 23°C przez 48 godzin. Owce zakażano doustnie zawiesiną bakterii o gęstości 10⁸/ml w ilości 5 ml/kg m.c. W drugiej grupie (kontrola) znajdowały się 4 owce ciężarne, nie zakażone.

Test NBT wykonywano wg Parka i wsp. (14) oraz badania hematologiczne przeprowadzano w 1, 4, 16 i 29 tygodniu drugiej ciąży po zakażeniu. Krew żylną pobierano na heparynę (10 j w 1 ml krwi) do strzykawek jednorazowego użytku. Następnie 0,1 ml krwi inkubowano z taką samą objętością mieszaniny zbuforowanego fosforanami płynu fizjologicznego o pH 7,2 i 0,2% roztworu NBT w wilgotnych komorach. Po inkubacji przez 15 min. w temp. 37°C oraz po dalszych 15 min. w temp. pokojowej sporządzano rozmazy i barwiono je metodą Pappenheima. W rozmazach liczono odsetek granulocytów NBT dodatnich. Uzyskane dane liczbowe poddano analizie statystycznej przy użyciu analizy wariancji w układzie jedno- i wieloczynnikowym oraz nowego, wielokrotnego testu rozstępu.

Wyniki i omówienie

Wszystkie owce wykocily się w terminie. Wśród jagniąt pochodzących od owiec zakażonych padło po pierwszej ciąży 47%, a po drugiej (14 mies. od zakażenia) 69%. Padnięcia wystąpiły w pierwszych dniach po urodzeniu wśród objawów posocznicy.

W badaniach wykonanych u owiec ciężarnych zakażonych zjadliwym szczepem *L. monocytogenes* nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy średnimi odsetkami komórek zawierających formazan w cytoplazmie w poszczególnych tygodniach (tab. 1). Natomiast u zwierząt nie zakażonych różnica pomiędzy wartościami uzyskanymi w 4 i 20 tyg. była zbliżona do istotnej. Jednocześnie w 20 tyg. ciąży różnica średniego odsetka granulocytów NBT dodatnich u owiec zakażonych i nie zakażonych była istotna, zaś w 16 tyg. zbliżona do istotnej. W porównaniu do wyników otrzymany u ludzi można stwierdzić, że zarówno w ostrych, jak i przewlekłych stanach choro-

Tab. 1. Średni odsetek granulocytów zawierających w cytoplazmie formazan u owiec ciężarnych zakażonych i niezakażonych *L. monocytogenes*

Tydzień ciąży	Grupy owiec	
	zakażone	nie zakażone
1	27,7 ± 8,71 ^a	21,3 ± 6,11
4	28,4 ± 8,79	22,0 ± 5,10
16	27,4 ± 10,87	18,7 ± 4,16
20	25,7 ± 10,32 ^a	15,3 ± 2,08 ^b

Objaśnienie: wartości w rzędach oznaczone symbolami a, b — różnią się istotnie przy P < 0,05.

bowych otrzymywano u nich większe ilości granulocytów z formazanem; np. Wojciechowski i Przyboś-Fabiszewska (20) stwierdzili u dzieci w przypadkach ostrych zakażeń bakteryjnych od 8% do 75% (średnio 34%) komórek formazanowych w rozmazach wykonanych z krwi obwodowej,

Reasumując można stwierdzić, że u owiec ciężarnych zakażonych pałeczkami *L. monocytogenes* granulocyty obojętnochłonne wykazywały większą aktywność fagocytarną niż u owiec ciężarnych nie zakażonych.

Obecnie ważną rolę w odporności nieswoistej przypisuje się granulocytom obojętnochłonnym. Uważa się je za pierwszą komórkową linię obronną organizmu przed zakażeniem. Pojawiają się one najwcześniej w miejscu uszkodzenia tkanek i są przystosowane przede wszystkim do fagocytozy drobnoustrojów i innych obcych cząsteczek (1, 15). Od sprawności fagocytarnej pewnych grup komórek zależy dalszy rozwój procesów odpornościowych. W efekcie, w normalnie działającym systemie obronnym organizmu, nastąpić powinna degradacja sfagocytowanego antygeny. W ostrych zakażeniach obserwuje się zwiększenie liczby granulocytów obojętnochłonnych i nasilenie aktywności niektórych enzymów. W przewlekłych zaś zakażeniach przy braku znaczących zmian ilościowych tych komórek następuje pobudzenie lub zahamowanie metabolizmu wewnątrzkomórkowego, wzrost lub zahamowanie aktywności fagocytarnej i zdolności do migracji leukocytów. Wydaje się, że w tych stacjach organizmu określenie jedynie ilości granulocytów obojętnochłonnych nie odzwierciedla dokładnie jego stanu odpornościowego. Celem jest w tym przypadku określenie sprawności biologicznej tych komórek. Temu zadaniu może służyć test NBT i można go wykonywać na granulocytach w stanie spoczynku, jak i po stymulacji czynności komórki np. żywymi bakteriami (16).

Test NBT w medycynie ludzkiej znalazł już zastosowanie w badaniach nad chorobami układu krwiotwórczego, w transplantologii, a także w chorobach zakaźnych (3, 8, 20, 21). Dla ułatwienia i przyspieszenia wykonania testu liczni autorzy wprowadzili modyfikację klasycznej jego formy wykonania, co utrudnia jednak porównanie otrzymanych przez nich wyników. W medycynie weterynaryjnej test NBT mógłby znaleźć szersze zastosowanie przy uproszczeniu jego wykonania (12, 18).

Piśmiennictwo

1. Aleksandrowicz J., Lisiewicz J.: Hematologia chorób zakaźnych. PZWL, 1975.
2. Borowski J., Furowicz J., Kędzia A., Tomaszewski R., Zaremba M.: Listerioza. PZWL, 1974.
3. Cocchi P., Mori S., Becanthin A.: Lancet 2, 1426, 1969.
4. Collins F. M.: Bacteriol. Rev. 33, 371, 1974.
5. Dąbrowski T., Meresta L.: Medycyna Wet. 11, 135, 1955.
6. Emmerling P., Finger H., Bockenmühl J.: Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A. 235, 142, 1970.

7. Faure R. M., Delaunay A.: Annals Inst. Pasteur 112, 458, 1967.
8. Kował E., Tarasiewicz F.: Pol. Tyg. lek. 20, 1175, 1977.
9. Lane F. C., Unanue E. R.: J. exp. Med. 135, 1104, 1972.
10. Lane F. C., Unanue E. R.: J. Immunol. 119, 829, 1973.
11. North R. J.: J. exp. Med. 138, 342, 1973.
12. Nikolaiczuk M.: Medycyna Wet. 35, 604, 1979.
13. Mitsuyama M., Takeya K., Nomoto K., Shimotori S.: J. Gen. Microb. 106, 165, 1973.
14. Park B. H., Fikring S. M., Smithwick E. M.: Lancet 2, 532, 1968.
15. Ptak W.: Podstawy immunologii. PZWL, 1976.
16. Raman U., Poland R. L.: Ped. Res. 9, 334, 1975.
17. Ratzan K. R., Musher D. M., Keusch G. T., Weintein L.: Infect. Immunol. 5, 499, 1972.
18. Sychłowy A., Lukas A.: Pol. Tyg. lek. 2, 45, 1978.
19. Wachnik Z., Przymus J., Kromolowski W.: Medycyna Wet. 37, 224, 1981.
20. Wojciechowski T. H., Przyboś-Fabiszewska R.: Pol. Tyg. lek. 29, 191, 1974.
21. Wollman M. R., David D. S., Breunan B. S., Lewy J. E., Stenzel K. H., Rubin A. L., Miller D. R.: Lancet 2, 7772, 1972.

Adres autora: dr Jerzy Nowacki, ul. Reja 42 m 14, 50-338 Wrocław.

Копопа М., Бромирская И., Новацкий Е. — Применение теста НВТ в исследованиях патогенеза абортів овец на фоне листериоза

Cель исследований состояла в определении при помощи теста NBT фагоцитарной активности у беременных овец, экспериментально зараженных *L. monocytogenes*. Для исследований использовали 12 беременных овец, зараженных вирулентным штаммом *L. monocytogenes* (серотип 5), а также 4 незараженные беременные овцы. Показали, что у зараженных беременных овец нейтрофильные гранулоциты отличаются большей фагоцитарной активностью по сравнению с незараженными овцами. Кажется, что тест NBT мог бы пригодиться для потребностей ветеринарной диагностики.

Konopa M., Bromirska J., Nowacki J. — Use of NBT test at the examinations on the pathogenesis of abortions in sheep caused by *Listeria monocytogenes*

The aim of the work was to determine by NBT test phagocytic activity in pregnant sheep infected with *L. monocytogenes* experimentally. There were used 12 pregnant sheeps infected with a virulent strain of *L. monocytogenes*, serotype 5. Four animals served as the control. It was found that neutrophils of the pregnant animals infected artificially had an increase phagocytic activity. The authors suggest that NBT test may be useful in the veterinary diagnostics.

OJENIYI A. A.: Doświadczenie zakażenie *Salmonella typhimurium* i leczenie tetracykliną. (Experimental infection with *Salmonella typhimurium* and tetracycline therapy). Br. vet. J. 138, 264—270, 1982 (3).

Porównano przebieg zakażenia *Salmonella typhimurium*, typ fagowy W282 u kurcząt rasy rodajlندی i lokalnej rasy nigeryjskiej. U rodajlندی biegunka wystąpiła po 24—48 godzinach po zakażeniu, przy czym dodatek tetracykliny do paszy nie wpływał na obniżenie odsetka chorych ptaków. U kurcząt rasy nigeryjskiej objawy chorobowe były słabiej zaznaczone i występowały po 72 godzinach po zakażeniu. Dodatek tetracykliny do paszy obniżał okres wydalania salmoneli z kałem. Badania hodowlane wykazały, że *S. typhimurium* występuje najczęściej w treści jelit ślepych. Uzyskanie dodatnich wyników hodowlanych z treści jelit ślepych jest miarodajnym wskaźnikiem występowania zakażeń wywołanych przez *S. typhimurium*.

G.