

MARIA PROST, ANTONINA Sopińska

Ocena stanu zdrowotnego karpia na podstawie badań hematologicznych podczas inwazji pijawek oraz po leczeniu Neguvonem i zastosowaniu preparatu immunostymulacyjnego

Niekorzystne oddziaływanie inwazji pijawek na ryby posiada dwa aspekty: bezpośredni — objawiający się osłabieniem ryb i uszkodzeniami na powierzchni ciała oraz pośredni — kiedy uszkodzenia mogą być przyczyną miejscowych lub ogólnych infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Szkodliwość pijawek polega również na niepokojeniu ryb w kresie zimowania. Dlatego też poleca się w warunkach hodowlanych zwalczanie tych pasożytów przy użyciu środków profilaktycznych i leczniczych. Najskuteczniejszymi preparatami stosowanymi w terapii pijawczyc są związki fosforoorganiczne podawane w kąpeli (2). Zaleca się stosowanie tego zabiegu po odłowach jesiennych przed zimowaniem ryb.

Celem pracy była ocena zdrowotności karpia dotkniętych inwazją pijawek oraz leczonych przeciwko tej inwazji przy pomocy określenia stanu odporności komórkowej oraz jej stymulacji mogącej wspomóc powrót do prawidłowego stanu zdrowotności.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły karpie w wieku dwóch lat (K_2) o masie 250—400 g. Ryby z inwazją pijawek w ilości 30 sztuk pochodziły z gospodarstwa rybackiego w Dębicy, zaś ryby kontrolne w ilości 10 sztuk pochodziły z gospodarstwa rybackiego w Podłodowie. Intensywność inwazji u ryb chorych wynosiła kilkadziesiąt pijawek na jednej rybie. Opadnięte pasożytami karpie były osłabione, na skórze widoczne były liczne uszkodzenia z odczynem zapalnym.

Ocenę stanu zdrowotności ryb wolnych od pasożytów w przebiegu inwazji pijawek, a także po zastosowaniu środków leczniczych określano na podstawie liczby krwinek czerwonych i białych, a także aktywności metabolicznej granulocytów przy użyciu testu NBT oraz liczby limfocytów T na podstawie testu rozetowego E i badania cytochemicznego służącego do wykrywania α -naftyloesterazy. Spośród środków leczniczych wybrano do zwalczania pijawek preparat fosforoorganiczny Neguvon, który zastosowano w kąpeli trwającej 5 dni w stężeniu 1 ppm (2). Temperatura wody w czasie kąpeli ryb wynosiła 13°C. Do immunostymulacji użyto preparatu hormonalnego będącego wyciągiem z grasicy cieląt o nazwie TFX. Środek ten podano karpom w iniekcji domięśniowej w dawce 1 mg/rybę oraz w kąpeli w dawce 500 mg/100 l wody trwającej 72 godziny (wg nieopublikowanych badań własnych).

Ryby podzielono na następujące grupy doświadczalne:

- I — kontrolna, obejmowała ryby zdrowe z Podłodowa
- II — ryby z inwazją pijawek z Dębicy, na powierzchni ciała których występowały liczne uszkodzenia i stany zapalne
- III — ryby z inwazją pijawek leczone Neguvonem

IV — ryby stymulowane preparatem TFX podanym w iniekcji po 24 godzinach od leczenia Neguvonem

V — ryby stymulowane preparatem TFX podanym w kąpeli po 24 godzinach od leczenia Neguvonem

Liczbę krwinek białych oraz czerwonych obliczano w sposób rutynowy. Bezwzględna liczba neutrocytów w 1 ml krwi oceniano na podstawie odsetka neutrocytów obliczanego z rozmazu, zabarwionego odczynnikiem May-Grünwalda-Giemzy. Aktywność metaboliczną granulocytów obojętnochłonnych karpia oceniano metodą opisaną w badaniach własnych (3). Celem uzyskania dokładnych wyników przeliczono ilość zredukowanego przez neutrocyty formazanu NBT. W tym celu wykonano krzywą standardową dla różnych stężeń formazanu NBT rozpuszczonego w DMF. Przyrost ekstynkcji wynikający z powstałego podczas inkubacji w komórkach formazanu NBT porównywano z krzywą standardową i odczytywano ilość odpowiadającego formazanu NBT. Następnie przeliczano tę wartość uzyskując ilość μg formazanu NBT/10⁶ neutrocytów.

W celu wykonania testu rozetowego E oraz badań cytochemicznych wykrywających enzym α -naftyloesterazę w błonie komórkowej limfocytów T izolowano limfocyty z krwi obwodowej karpia. Izolację tę przeprowadzono na Lymphoprepie (firmy Nyegard). Test rozetowy wykonano wg metody opisanej w badaniach własnych (4). Liczbę rozetek E oceniano w komorze Bürkera biorąc pod uwagę zawsze 500 limfocytów.

Barwienie cytochemiczne wykonywano na limfocytach utrwalonych na szkiełkach podstawowych. Preparaty te zalewano płynem inkubacyjnym wg metody Muellera (1, 5). Następnie po ich wybarwieniu obliczono procent komórek barwiących się pozytywnie (ANAE +).

Z uzyskanych wyników obliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki (tab. 1) wskazują, że inwazja pijawek wywołuje wyraźne zmiany badanych parametrów hematologicznych. Liczba krwinek czerwonych w 1 mm³ krwi uległa obniżeniu, zaś liczba krwinek białych znacznie wzrosła. Na podstawie obrazu białokrwinkowego stwierdzono również wzrost liczby neutrocytów. Przy pomocy testu NBT aktywność metaboliczną tych komórek oceniono jako bardzo niską (grupa II).

Zastosowanie preparatu leczniczego Neguvonu spowodowało dalszy spadek liczby erytrocytów (grupa III). Aktywność metaboliczna neutrocytów utrzymywała się na tym samym poziomie jak w grupie II. Liczba limfocytów tworzących rozetki E oraz procent limfocytów ANAE+ uległy obniżeniu w porównaniu z grupą doświadczalną I oraz grupą II.

Tab. 1. Wyniki badań hematologicznych uzyskane od karpki kontrolnych (grupa I) oraz z inwazją pijawek (grupa II), a także po leczeniu Neguvonem (grupa III) i stymulacji preparatem TFX (grupa IV i V) ($\bar{x} \pm s$)

Badane wskaźniki zdrowotności	Grupy doświadczalne									
	I		II		III		IV		V	
Liczba krwinek czerwonych w 1 mm ³ × 10 ⁶	1,417	0,25	1,108	0,16	0,733	0,20	1,330	0,18	1,230	0,26
Liczba krwinek białych w 1 mm ³ × 10 ⁸	31,925	1,16	56,675	2,20	43,650	1,80	41,250	2,40	46,250	4,60
Liczba neutrocytów w próbce 0,1 ml krwi × 10 ⁶	0,108	0,02	0,453	0,06	0,371	0,07	0,508	0,04	0,801	0,06
Wartość ekstynkcji NBT	0,390	0,02	0,230	0,03	0,190	0,01	0,570	0,02	0,890	0,04
μg formazanu NBT 10 ⁶ neutrocytów	45,370	1,25	7,28	0,42	7,54	0,38	13,18	1,16	12,35	1,18
Liczba rozetek E na 500 limfocytów	5,75	0,22	8,4	0,21	2,60	0,12	20,35	1,09	23,24	0,98
% limfocytów ANAE+	48,5	2,56	51,3	3,28	39,2	2,46	61,50	5,20	70,20	4,26

Podanie preparatu grasiczego TFX grupie ryb uprzednio leczonej Neguvonem, zarówno w iniekcji, jak i w kąpeli, spowodowało wyraźne uaktywnienie układu czerwono- jak i białokrwinkowego (grupa IV, V). Wzrosła liczba krwinek czerwonych, aktywność metaboliczna neutrocytów, liczba rozetek E oraz procent limfocytów ANAE+.

Należy podkreślić również, że ubytki skóry obserwowane u ryb w grupie II i III znacznie szybciej goiły się w grupie V.

Wnioski

1. Inwazja pijawek *Piscicola geometra* wywołuje u karpki wyraźne zmiany liczby białych i czerwonych krwinek, aktywności metabolicznej granulocytów oraz liczby limfocytów T.

2. Zastosowanie środka leczniczego Neguvonu znacznie obniża wszystkie badane wskaźniki zdrowotności ryb.

3. Podanie preparatu hormonalnego TFX zarówno w iniekcji, jak i w kąpeli wykazało działanie stymulujące na układ odpornościowy karpki.

4. Podanie preparatu TFX w kąpeli wywiera korzystny wpływ na przyspieszenie procesu gojenia ubytków skóry powstałych po przebytej inwazji.

Piśmiennictwo

- Mueller J., Brun G., Buerk H., Keller U., Hess M. W., Cottler H.: Eur. J. Immunol. 5, 270, 1975.
- Prost M., Studnicka M.: Medycyna Wet. 22, 644, 1966.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 42, 230, 1986.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 43, 519, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Maria Prost, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Prost M., Сопинская А. — Оценка состояния здоровья карпов на основе гематологических исследований и во время инвазии пиявок, а также после лечения Neguvon и применения иммуностимуляционного препарата

Цель работы состояла в оценке состояния здоровья карпов, подвергшихся инвазии пиявок и лечению против нее при помощи определения состояния клеточного иммунитета, а также его стимуляции, которая могла бы помочь вернуться к правильному состоянию здоровья.

Исследования выполняли на 40 карпах (K₂), разделенных на 5 подопытных групп. Оценка состояния здоровья рыб, свободных от паразитов (группа I) и в ходе инвазии пиявок (группа II), а также по применению лечебного купания в растворе Neguvon (группа III) и иммуностимуляционного препарата TFX (группа IV и V) определяли на основе числа эритроцитов и лейкоцитов, метаболической активности гранулоцитов при применении теста NBT, а также числа лимфоцитов T, оцениваемого на основе розеточного теста E и цитохимического исследования.

На основе полученных результатов отметили, что инвазия пиявок вызывает у карпов отчетливые изменения в исследуемых показателях состояния здоровья рыб. После лечебного купания эти величины значительно понизились. Ввод препарата TFX показал стимулирующее действие на иммунную систему карпа.

Prost M., Sopińska A. — Evaluation of a healthy state of the carp on the basis of haematological examinations during invasion of leech and after the treatment with Neguvone and after application of an immunostimulant

The objective of the work was to evaluate a healthy state of the carp parasitized by leech and antiparasitically treated on the basis of cellular immunity and after its stimulation to acquire a normal healthy state. The experiments have been done on 40 two years aged carps divided in 5 experimental groups. A healthy state of the carps in the first group (I) free of parasites, invaded (II), after washing-bath treat-

ment with Neguvone (III) and after immunostimulation (IV and V) was determined on the basis of the number of red and white blood cells, metabolic activity of granulocytes in the NBT test and the number of T-lymphocytes (rosette test, cytochemical analysis). It

was found that invasion of leech affects significantly the immune parameters examined. After treatment with Neguvone the values of these parameters clearly decreased. A preparate TFX exerted a stimulatory effect on the immune system of the carp.

BOGDAN DĘBSKI

Wpływ niedoboru oraz nadmiaru selenu na stan zdrowia i produktywność świń

Katedra Biochemii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

Toksyczne działanie selenu (Se) znane było od dawna, ale dopiero w 1957 r. dzięki badaniom Schwarza i Foltza (22) selen został zaliczony do mikroelementów niezbędnych dla życia ssaków. W późniejszych latach stwierdzono, że niedobór Se występuje w wielu krajach m.in. w Polsce, a jego następstwem jest wiele schorzeń występujących u ludzi i zwierząt. Jednym z nich jest wykryta u dzieci w ChRL kardiomiopatia Keshana (Keshan disease) (4). Zarówno u dorosłych, jak i dzieci odżywianych przez długi okres parenteralnie płynami ubogimi w selen, zaobserwowano uszkodzenie mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych (13). U zwierząt domowych niedobór tego pierwiastka jest przyczyną wielu schorzeń m.in. pokarmowej dystrofii mięśni (owce, bydło, konie, świnię), toksycznego zwyrodnienia wątroby u świń oraz skazy wysiękowej u drobiu (27). Noworodki i młode szybko rosnące organizmy są szczególnie wrażliwe na niedostateczną ilość Se w pokarmie i u takich właśnie zwierząt najczęściej występują objawy jego niedoboru. Może wówczas dochodzić do zahamowania wzrostu, wychudzenia, a nawet charłactwa. Stan zdrowia chorych zwierząt ulega radykalnej poprawie po uzupełnieniu podaży selenu.

Biologiczna rola selenu u ssaków wynika z obecności Se-cysteiny w każdym z 4 miejsc katalitycznych peroksydazy glutationowej (E.C. 1.11.19). Enzym ten katalizuje redukcję nadtlenu wodoru oraz organicznych hydroksykwasów. Dzięki temu peroksydaza glutationowa (GSH-Px) pełni doniosłą rolę w ochronie tłuszczów, białek i kwasów nukleinowych przed działaniem utleniaczy (26). Przeciwuutleniaczą funkcją Se powoduje, że zapotrzebowanie na ten mikroelement zależy z jednej strony od obecności w organizmie czynników utleniających, a z drugiej strony od działania systemów zapobiegających powstawaniu nadtlenu. Spożywanie dużych ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzi do powstawania wolnych rodników zapoczątkowujących utlenianie tłuszczów. Żelazo i niektóre metale ciężkie przyczyniają się do wzmożonego utleniania tłuszczów. Procesom tym zapobiega działanie wita-

miny E niszczącej wolne rodniki oraz działanie enzymów takich jak GSH-Px i dysmutaza ponadtlenkowa. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej ulega obniżeniu w stanach niedoboru cynku, miedzi i manganu. Aktywność zaś GSH-Px zależna jest od ilości Se w organizmie. W wyniku konkurencji z takimi pierwiastkami jak: siarka, arsen, kadm, rtęć, srebro, miedź, przyśwajalność Se i jego retencja w organizmie ulega obniżeniu (1, 5).

Obserwowano korelację między ilością Se w diecie a jego poziomem w osoczu i wątrobie (24). Podobna zależność została stwierdzona między ilością spożytego Se a aktywnością GSH-Px we krwi. U świń około 85% aktywności tej peroksydazy występuje w erytrocytach. Odzwierciedla ona stan gospodarki selenem sprzed kilku tygodni, gdy krwinki znajdowały się jeszcze w szpiku kostnym, albowiem dojrzałe erytrocyty nie posiadają zdolności syntezy białka. Stosunkowo niska aktywność GSM-Px w osoczu jest natomiast dobrym miernikiem aktualnego spożycia selenu. Aktywność GSH-Px jest proporcjonalna do spożycia Se tylko wtedy, gdy jego zawartość w paszy jest niższa od 0,1 mg/kg s.m. (2), zatem jej określanie może być pomocne przy diagnozowaniu niedoboru tego pierwiastka. W przypadku jednak jego nadmiaru w paszy wzrost aktywności GSH-Px w organizmie jest niewielki i nieproporcjonalny do stężenia Se.

Określanie niezbędnego dla świń poziomu Se w paszy napotyka znaczne trudności z powodu braku jednoznacznych kryteriów oceny. Od 1979 r. według NRC (16) w żywieniu świń do 60 kg m.c. uznano za niezbędne stężenie 0,15 mg/kg s.m. paszy, a dla świń o większej masie ciała 0,1 mg/kg s.m. W USA i Australii od 1982 r. zezwala się na uzupełnianie poziomu Se w paszach (w postaci premiksów) od stężenia 0,3 mg/kg s.m. dla prosiąt poniżej 23 kg m.c. i do 0,15 mg/kg s.m. dla prosiąt cięższych (8).

Niedobór selenu

Długotrwałe spożywanie przez świnię paszy z niedostateczną zawartością Se powoduje ob-