

MICHAŁ STOSIK  
Krosno Odrz.

## Aktywność mieloperoksydazy granulocytów obojętnochłonnych u karpia w czasie naturalnej infekcji bakteryjnej

### Summary

#### The activity of myeloperoxidase in carp neutrophils in the course of bacterial infection

The studies have been carried out on healthy and naturally infected carp with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. Diseased fish were divided into four groups on the basis of clinical changes. The activity of myeloperoxidase (MPO) was determined by Graham's method and expressed as a total activity of myeloperoxidase (CAMPO) and a relative index of the enzyme activity (WAMPO). The experiments showed a statistical significant increase of CAMPO and WAMPO in carp infected in comparison with the findings in normal fish.

Finco-Kent i Thune (3) wykazali, że fagocytujące granulocyty obojętnochłonne (komórki PMNL) charakteryzują się, poza innymi cechami, obecnością dużej ilości granul peroksydazo-dodatnich. Wcześniej obecność mieloperoksydazy (MPO) w ziarnistościach lizosomalnych granulocytów obojętnochłonnych ryb wykazali Cannon i wsp. (1), Ferguson (2), Hine i wsp. (4), Kanner i Kinsella (5), Mori (6) oraz Sopińska (9). Oznaczanie tego enzymu, w dotychczasowych badaniach, służyło przede wszystkim identyfikacji krwinek białych ryb. Brak jest natomiast badań i obserwacji dotyczących aktywności MPO w czasie infekcji bakteryjnych u ryb, w tym także u karpia oraz jej wykorzystania w diagnostyce lekarskiej.

W pracy badano aktywność MPO w kolejnych stadiach rozwoju choroby o nazwie *erythrodermatitis*, wywoływanej przez bakterie *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*, jednocześnie też próbowano określić możliwości bójcze komórek PMNL związane z enzymami tleno-zależnymi.

Wybór tej choroby do badań jest uzasadniony podstawową rolą enzymów bójczych komórek PMNL u ssaków w schorzeniach bakteryjnych oraz poważnymi stratami gospodarczymi, związanymi z długotrwałymi śnięciami karpia przy jednoczesnych dużych trudnościach rozpoznawczych wczesnych stadiów rozwoju tej choroby.

### Materiał i metody

Badaniem objęto 250 karpia (*Cyprinus carpio* L.) podzielonych na pięć grup doświadczalnych po 50 ryb, które w okresie przeprowadzania badań nie były poddawane zabiegom leczniczym i profilaktycznym. Grupę I (kontrolną) stanowiły karpie zdrowe, wolne od *erythrodermatitis*, zaś grupę II—V ryby pochodzące ze stawów, w których stacjonarnie występowało to schorzenie. Podziału tych ostatnich ryb na grupy dokonano uwzględniając kolejne stadia rozwoju choroby i tak; grupę II — stanowiły ryby nie wykazujące klinicznych objawów choroby — okres inkubacji choroby, grupę III — ryby, u których stwierdzono na skórze wybroczyny i przekrwienia — ostry proces chorobowy, grupę IV — karpie z rozległymi owrzodzeniami skóry — stadium przejściowe, między ostrym a chronicznym procesem chorobowym, zaś grupę V — karpie, u których obserwowano proces gojenia i bliznowacenia ran — chroniczny proces chorobowy.

Rozpoznanie *erythrodermatitis* przeprowadzono metodami rutynowymi, biorąc pod uwagę obraz zmian klinicznych, anatomopatologicznych oraz wyniki badań bakteriologicznych.

Aktywność mieloperoksydazy w komórkach PMNL krwi obwodowej ryb, pobranej jednokrotnie, określano metodą cytochemiczną według Grahama opisaną przez Zawistowski (12). Preparaty sporządzano z krwi obwodowej pobranej na heparynę (50 j/m na 1 ml krwi), utrwalono mieszaniną 40% formaliny (1 część) i 96% alkoholu (9 części), a następnie po upływie 3 minut płukano wodą destylowaną i zalewano, na okres 4 minut, odczynnikiem peroksydazowym (10 ml 40% alkoholu, kilka kryształków benzodiny i 0,02 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Rozmazy po splukaniu wodą destylowaną barwiono metodą Pappenheima i odczytywano pod mikroskopem świetlnym. Kryterium oceny stanowiła intensywność zabarwienia ziarnistości lizosomalnych komórek PMNL, przyjmując następującą skalę ocen; — 3 punkty (granule ciemnobrązowe), — 2 punkty (granule jasnobrązowe), — 1 punkt (granule żółte) i 0 punktów (brak wybarwionych granul).

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1 w postaci całkowitej aktywności mieloperoksydazy (CAMPO) tzn. sumy punktów według przyjętej skali ocen oraz względnego wskaźnika aktywności mieloperoksydazy (WAMPO), wyliczonego z ilorazu CAMPO komórek PMNL krwi ryb chorych i średniej aktywności tego enzymu u ryb zdrowych (7). Uzyskane rezultaty poddano analizie statystycznej według testu t-Studenta, przy istotności różnic między grupą ryb zdrowych i chorych  $p = 0,05$  i przedstawiono w postaci średnich ( $\bar{x}$ ) oraz odchylenia standardowego ( $\pm s$ ).

### Wyniki i omówienie

Jak wynika z danych tab. 1 średnia i całkowita aktywność mieloperoksydazy (CAMPO) u karpia zdrowych (grupa I — kontrolna) wynosiła 97, natomiast względny wskaźnik aktywności tego enzymu (WAMPO)  $1,00 \pm 0,26$ . Badania wykonane u karpia w II—V grupie (tab. 1) wykazały wzrost CAMPO i WAMPO w porównaniu z grupą I. Stwierdzono, że u ryb z grupy II, będących w okresie inkubacji choroby, CAMPO i WAMPO są wysokie i wynoszą kolejno  $233 \pm 37$  i  $2,40 \pm 0,34$ . U ryb z grupy III z ostrym procesem chorobowym i z grupy IV, to jest tych, które znajdowały się w stadium przejściowym rozwoju choroby, między ostrym a chronicznym procesem, obserwowano dalszy wzrost tych wskaźników. Wynosiły one odpowiednio, CAMPO  $259 \pm 35$  i  $272 \pm 24$ , zaś WAMPO  $2,67 \pm 0,32$  i  $2,80 \pm 0,19$ . Niższe wartości, chociaż statystycznie wyższe niż u ryb klinicznie zdrowych, występowały u karpia będących w fazie chronicznej rozwoju *erythrodermatitis* i wynosiły dla CAMPO  $141 \pm 41$ , natomiast dla WAMPO  $1,45 \pm 0,38$ .

Wydaje się, że obserwowany obraz wartości CAMPO i WAMPO w komórkach PMNL krwi obwodowej ba-

Tab. 1. Aktywność mieloperoksydazy u ryb zdrowych i chorych ( $\bar{x} \pm s$ )

Grupa ryb	Całkowita aktywność MPO (CAMPO)		Wskaźnik aktywności MPO (WAMPO)	
I	97	28	1,00	0,26
II	233	37*	2,40	0,34*
III	259	35*	2,67	0,32*
IV	272	24*	2,80	0,19*
	141	41*	1,45	0,38*

Objaśnienie: \* — różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,05$ .

danych karpki jest efektem reakcji immunologicznej u ryb, gdyż według wielu autorów (cyt. za 11) do czynników nieswoistej odporności humoralnej, także u ryb, zalicza się między innymi MPO. Według Kanner i Kinsella (5) ekstrahowana z granulocytów obojętnochnych pstrąga tęczowego MPO posiada, podobnie jak u zwierząt stałocieplnych, bardzo silne właściwości bójcze i spełnia rolę podstawowego faktora odporności przeciwwakazyjnej. Obserwowana zatem, w badaniach własnych, zwiększona aktywność mieloperoksydazy u karpki chorych na *erythrodermatitis* (grupa II—V), świadczy o stymulującym oddziaływaniu bakterii wywołujących tę chorobę na komórki PMNL; dowodzi także, że układ mieloperoksydaza — nadtlenek wodoru spełnia u karpki istotną rolę w likwidowaniu czynników patogennych. Wyniki te potwierdzają w pełni istnienie, w komórkach PMNL ryb, bardzo sprawnego systemu bójczego zależnego od tlenu, na który zwrócono uwagę wcześniej, oceniając go w teście redukcji błękitu nitrotetrazolowego (8, 10).

Uzyskane wyniki badań dowodzą, że oznaczanie MPO granulocytów obojętnochnych karpki stwarza możliwość śledzenia dynamiki zmian w aktywności komórek

PMNL, a przez to oceny systemu immunologicznego karpki. Dowiedziano także, że zastosowana metoda badań uwidacznia rolę i udział komórek PMNL w procesie obronnym u ryb w przebiegu naturalnej infekcji bakteryjnej i może być wykorzystana do wczesnego diagnozowania *erythrodermatitis*, a najprawdopodobniej także innych zakażeń bakteryjnych u ryb.

#### Piśmiennictwo

1. Cannon M. S., Mollenhauer H. H., Cannon A. M., Eurell T. E., Lewis D. H.: *Can. J. Zool.* 58, 1139, 1980.
2. Ferguson H. W.: *J. Fish Biol.* 8, 139, 1976.
3. Finco-Kent D., Thune R. L.: *J. Fish Biol.* 31 (Supplement A), 41, 1987.
4. Hine P. M., Wain J. M., Dunlop D. M.: *J. Fish Biol.* 29, 711, 1986.
5. Kanner J., Kinsella J. E.: *J. Agric. Food Chem.* 31, 370, 1983.
6. Mori M.: *Fish Pathology* 16, 91, 1981.
7. Sanokowska E., Chomiak-Stachura E., Turowski G.: *Diagn. Lab.* 22, 49, 1986.
8. Stwiński A., Studnicka M., Ryka B.: *Bamidgch* 37, 123, 1985.
9. Sopińska A.: *Medycyna Wet.* 43, 519, 1987.
10. Stosik M., Deptuła W.: *Proc. IV Symp. Vet. Lab. Diagn.* (Amsterdam), 1986, s. 436.
11. Stosik M., Deptuła W.: *Postępy Mikrobiologii* 1990, w druku.
12. Zawistowski S.: *Technika histologiczna, podstawy histologii oraz histologia*, PZW, Warszawa 1975, s. 215.

Adres autora: dr Michał Stosik, ul. Poznańska 19d/6, 66-600 Krosno Odrzańskie

WIESŁAW DEPTUŁA, JAN BUCZEK \*

## Surowicze immunoglobuliny u buhajków zakażonych naturalnie wirusem IBR/IPV (Bovid herpesvirus 1 — BHV 1)

Zakład Mikrobiologii Wydziału Biologii i Nauk o Morzu Uniwersytetu Szczecińskiego,  
ul. Felczaka 3a, 71-417 Szczecin

\* Zakład Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

### Summary

#### Serum immunoglobulins in young bulls naturally infected with IBR/IPV (Bovid herpesvirus 1 — BHV 1)

Virologic examinations to detect the BHV 1 and serological studies to determine the titre of anti BHV 1 antibodies and the content of serum immunoglobulins were done on bulls aging 2—4 and 6—10 months naturally infected with BHV 1 and showing clinical symptoms of the respiratory tract inflammation. For control healthy animals uninfected were included. It was found that bulls infected with BHV 1 excrete the virus for a relatively long time (42—56 days). In some animals the SN titres 1:2—1:8 were noted only in some periods of studies. Irrespectively of the age of bulls serum content of IgG<sub>1</sub> and IgG increased and IgG<sub>2</sub> decreased. The level of IgM and IgA was stable and it was not related to the age of animals.

Dynamikę produkcji surowicznych immunoglobulin (Ig) badano u buhajków i jałówek zakażonych doświadczalnie wirusem IBR/IPV (12—14, 21). W infekcjach naturalnych spowodowanych przez wirus IBR/IPV, białka te oznaczono u krów (26, 27). U cieląt badano je w infekcjach narządu oddechowego wywołanych przez bliżej nie zidentyfikowane czynniki etiologiczne (2—4, 16, 25, 28).

W niniejszej pracy prześledzono odpowiedź immunologiczną buhajków zakażonych naturalnie BHV 1, oznaczając w surowicy miano przeciwciał i ilości Ig. Celem było poznanie reakcji obronnych młodego bydła zakażonego w warunkach naturalnych BHV 1.

### Materiał i metody

Badania wykonano na dwóch, różnych wiekowo grupach buhajków rasy ncb. Grupę „A” utworzono ze zwie-

rząt 2—4-miesięcznych (5 chorych i 5 klinicznie zdrowych), „B” (ilościowo jak „A”) z buhajków 6—10-miesięcznych.

Zwierzęta chore grupy „A” wybrano ze stada buhajków, w których stacjonarnie występowały zapalenia narządu oddechowego o łagodnym przebiegu klinicznym, buhajki chore grupy „B” z obór, w których zakażenie miało przebieg ciężki. Zwierzęta kontrolne (dla obu grup) pochodziły ze stad, w których zapalenia narządu oddechowego nie występowały.

Badania laboratoryjne zwierząt grupy „A” chorych i zdrowych przeprowadzono pięciokrotnie co 7 dni i dwukrotnie co 14 dni. Buhaje grupy „B” badano czterokrotnie co 14 dni. Stan kliniczny zwierząt określono metodami rutynowymi.

Badania wirusologiczne wymazów z błony śluzowej jamy nosowej i ze spojówek, zmierzające do izolacji oraz identyfikacji BHV 1, przeprowadzono w hodowli komórek nerek cieląt (HKNC), a także metodą immunofluorescencji bezpośredniej (IFb) — stosując koniugat „Gamakon IBR” Bioveta Nitra (Czechosłowacja). Miano przeciwciał dla BHV 1 w surowicy buhajków określono odczynem seroneutralizacji (SN) w HKNC. Ilość Ig klasy G, M, A oraz podklasy G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> oznaczono metodą immunodyszki radialnej (ID) wykorzystując standardy firmy Miles (USA).

Wyniki badań klinicznych i wirusologicznych przedstawiono opisowo, serologicznych i immunologicznych podano w tab. 1—3. Wyniki oznaczeń Ig poddano analizie statystycznej testem t-Studenta ( $p=0,05$ ), porównując ich ilości u buhajów chorych do ilości stwierdzonej u zwierząt zdrowych.

### Wyniki i omówienie

U buhajków chorych z grupy „A” objawy kliniczne utrzymywały się przez 42 dni obserwacji. Przez 14 dni manifestowały się podwyższoną do 40,5—41,5°C temperaturą, zapaleniem spojówek i błony śluzowej nosa oraz oswoiłością zwierząt. Wyciek z nosa, najpierw