

# Wpływ czasu i warunków przechowywania surowic na stabilność miana swoistych przeciwciał przeciw wirusowi enzoptycznej białaczki bydła

Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Summary

**The influence of time and sera storage conditions on the titers of specific antibodies against enzootic bovine leukaemia virus**

The influence of time and storage conditions on the stability of specific antibodies against EBLV was determined. The titer of antibodies was tested by use of the immunodiffusion test and ELISA. The sera in the lyophilized form with the addition of 0.01% sodium azide and 0.01% merthiolate were stored at +4°C, -20°C and at -20°C after freezing and thawing. Sera with the above preparations stored at +4°C were tested every three days for three weeks and the remaining sera every months for one year. The titers of the specific antibodies did not change their values in sera stored at +4°C for 21 days, at -20°C for 6 months. The most significant changes in serum titers were observed after several thawings and refrigerations.

genem S-445 wyprodukowanym w Instytucie Weterynarii w Puławach, zaś studzienki obwodowe kolejnymi rozcieńczeniami badanej surowicy (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). Odczytywanie i interpretację wyników wykonano zgodnie z Instrukcją Min. Rol. Nr 54.

Test ELISA. W badaniach stosowano handlowe zestawy ELISA firmy Bioveta (CSRS). Przy określaniu miana przeciwciał badaną surowicę rozcieńczano 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096. Wartość ekstynkcji odczytywano w spektrofotometrze Titertek Uniskan I. Miano przeciwciał określano jako odwrotność ostatniego rozcieńczenia surowicy, przy którym występowała jeszcze dodatnia reakcja testu zgodnie z interpretacją wyników zawartą w instrukcji do zestawu.

## Wyniki i omówienie

Wyniki przeprowadzonych badań ilustrują ryc. 1 i 2. Miano przeciwciał przeciw wirusowi ebb w surowicach przechowywanych w temp. 4°C przez 21 dni zmieniło się nieznacznie. W zdecydowanej większości badanych surowic (90% surowic badanych testem ELISA i 95% surowic badanych testem ID) miano przeciwciał w ostatnim badaniu miało taką samą wartość jak w badaniu pierwszym. W pierwszej surowicy (5%) badanej testem rozcieńczenia (np. miano przeciwciał 64 obniżyło wartość do 32). Również testem ELISA stwierdzono obniżenie się miana przeciwciał o wartość jednego rozcieńczenia w pierwszej surowicy (4,8%) oraz o wartość dwóch rozcieńczeń również w pierwszej surowicy (4,8%). Przechowywanie surowic w zamrażarce (temp. -20°C) przez 12 miesięcy powodowało wyraźne obniżenie się miana

Diagnostyka enzoptycznej białaczki bydła (ebb) polega na wykrywaniu w surowicy krwi swoistych przeciwciał przeciwwirusowych. Wykrywanie tych przeciwciał możliwe jest przy użyciu różnych technik, jednak w badaniach rutynowych stosuje się odczyn immunodyfuzji w żelu (ID). Obok testu ID w diagnostyce laboratoryjnej coraz częściej stosuje się metodę immunoenzymatyczną (ELISA), za stosowaniem której przemawiają liczne argumenty: wysoka czułość (1, 3), wczesne wykrywanie przeciwciał, obiektywna ocena wyników przy odczynie spektrofotometrycznym.

Poważnym utrudnieniem masowo przeprowadzanych badań, na co wskazują obserwacje licznych laboratoriów, jest konieczność weryfikacji wyników i związana z tym potrzeba gromadzenia i przechowywania surowicy krwi. Celem badań było określenie wpływu czasu i warunków przechowywania surowic na stabilność miana swoistych przeciwciał przeciw wirusowi ebb.

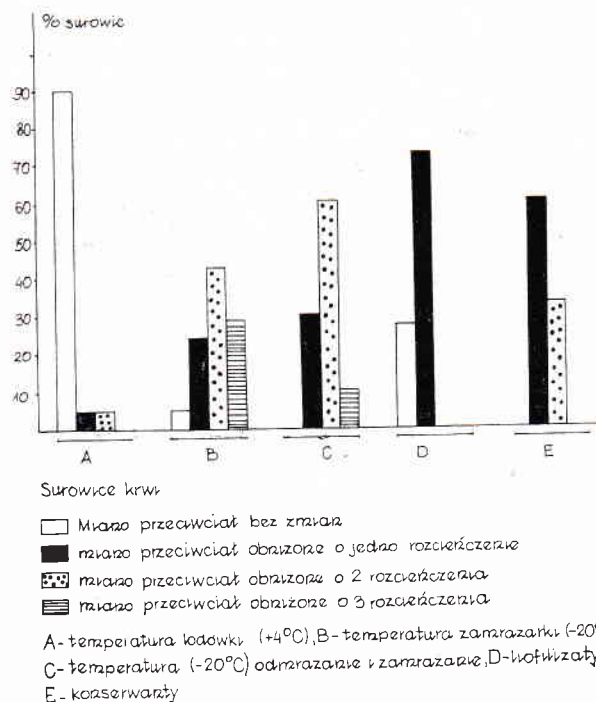
## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na surowicach krwi bydła pochodzącego ze stada o wysokim stopniu zakażenia białaczką. W zależności od sposobu przechowywania surowice te podzielono na grupy:

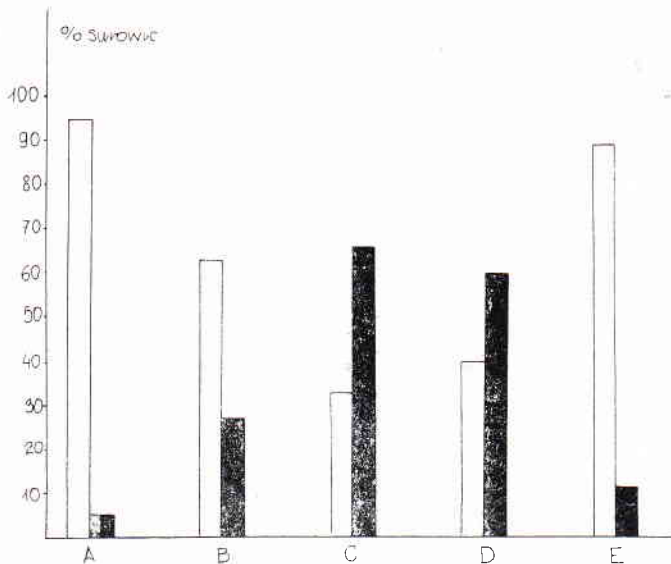
- surowice przechowywane w temp. lodówki (+4°C); badano 21 surowic w odstępie 3 dni do 21 dnia przechowywania,
- surowice przechowywane w temp. zamrażarki (-20°C); badano 21 surowic w odstępie 1 miesiąca przez 1 rok,
- surowice przechowywane w temp. zamrażarki (-20°C) odmrażane przed każdym badaniem i zamrażane ponownie; badano 10 surowic w odstępie 1 miesiąca przez 1 rok,
- surowice przechowywane w postaci liofilizowanej; badano 11 surowic w odstępie 1 miesiąca przez rok,
- surowice konserwowane 0,01% azydkiem sodu i 0,01% mertiolatem; badanie 9 surowic przeprowadzono po 22 dniach przechowywania w temp. lodówki (+4°C).

Miano przeciwciał dla wirusa ebb oznaczano testem ID oraz testem ELISA.

Test ID. Wykonano go zgodnie z Instrukcją Ministerstwa Rolnictwa nr 54 (2). Studzienkę środkową wypełniano anty-



Ryc. 1. Wpływ warunków przechowywania surowic krwi badanych testem ELISA na miano swoistych przeciwciał



Ryc. 2. Wpływ warunków przechowywania surowic krwi badanych testem ID na miano swoistych przeciwciał

przeciwciał. Tylko w około 5% surowic badanych testem ELISA miano przeciwciał przez cały okres przechowywania surowic nie zmieniło swojej wartości. W pozostałych surowicach miano przeciwciał obniżyło się o wartość jednego rozcieńczenia (23,8%), dwóch rozcieńczeń (42,9%), a nawet trzech rozcieńczeń (28,5%). Obniżanie się wartości miana przeciwciał obserwowano od 6 miesięcy przechowywania surowic.

Badanie tych samych surowic testem ID nie wykazało tak dużych różnic w zachowaniu się miana przeciwciał, co wynika z mniejszej czułości testu. W 63% surowic badanych miano przeciwciał nie zmieniło się a w pozostałych surowicach (27%) uległo obniżeniu o wartość jednego rozcieńczenia.

We wszystkich surowicach przechowywanych w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  odmrażanych przy każdym badaniu i zamrażanych ponownie, stwierdzono obniżenie się wartości miana przeciwciał oznaczanego testem ELISA. Spadek wartości miana był różny. W większości badanych surowic (60%) stwierdzono obniżenie się miana przeciwciał o dwa rozcieńczenia; spadek miana o jedno rozcień-

czenie wystąpił w 30% badanych surowic, a obniżenie miana o trzy rozcieńczenia zaobserwowano w niewielkim procencie badanych surowic (10%). Równoległe przeprowadzone badania surowic testem ID nie wykazały takiej zmienności w zachowaniu się miana przeciwciał. W 33% badanych surowic miano przeciwciał przez cały okres przechowywania nie zmieniło wartości, natomiast w 66% surowic uległo obniżeniu o wartość jednego rozcieńczenia.

Miano przeciwciał przeciw wirusowi ebb w surowicach liofilizowanych utrzymywało stałą wartość do 8 miesięcy przechowywania surowic. Po tym okresie w znacznej części surowic (72,7% surowic badanych testem ELISA i 60% surowic badanych testem ID) miano przeciwciał obniżyło się o wartość jednego rozcieńczenia. W pozostałych surowicach (27,3% surowic badanych testem ELISA i 40% surowic badanych testem ID) miano przeciwciał nie zmieniło się.

Test ELISA wykonany z surowicami konserwowanymi (0,01%  $\text{NaN}_3$  i 0,01% mertiolat) wykazał, że miano przeciwciał we wszystkich badanych surowicach było niższe: o wartość jednego rozcieńczenia (66,6% surowic) lub o wartość dwóch rozcieńczeń (33,3% surowic) w porównaniu z mianem przeciwciał w tych surowicach nie zawierających konserwantów.

Badanie tych surowic testem ID wykazało, że w zdecydowanej większości surowic (89%) miano przeciwciał nie zmieniło się (4). Jedynie w pierwszej surowicy (11%) obniżyło się o wartość jednego rozcieńczenia.

#### Wnioski

1. Miano swoistych przeciwciał nie ulega zmianie przy przechowywaniu surowicy krwi w temperaturze lodówki przez 21 dni, zamrażarce ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) przez 6 miesięcy i w surowicy liofilizowanej przez 8 miesięcy.

2. Największy wpływ na zmienność miana przeciwciał ma kilkakrotne odmrażanie i zamrażanie surowicy.

#### Piśmiennictwo

- Behrens F., Ziegelmaier R., Toth T., Keyserlingk M., Forschner E.: Tierärztl. Wschr. 92, 429, 1979.
- Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Instrukcja Min. Rol. Nr 54, 1983.
- Jankowski M.: Post. Mikrobiol. 21, 85, 1982.
- Lorenz R. J., Straub O. C.: Tierärztl. Umschau 35, 9, 1980.

Adres autora: lek. wet. Bożena Kozaczyńska, ul. Kościuszki 19/10, 24-100 Puławy

**YASUDA J., TATEYAMA K., SYUTO B., TOO K.:** Izoenzymy dehydrogenazy mleczanowej i fosfokinazy kreatyny w tkankach zwierząt laboratoryjnych. (Lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase isoenzymes in tissues of laboratory animals). Jpn. J. Vet. Res. 38, 19—29, 1990 (1)

Przebadano rozmieszczenie izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i fosfokinazy kreatyny (CKP) w wątrobie, trzustce, odcinku sercowym i oddźwiernikowym żołądka, jelicie cienkim, przedsionku serca, mięśni uduowym, macicy, korze nerek, śledzionie, mózgu, rdzeniu kręgowym i krwinkach czerwonych myszek ICR, szczurów rasy Wistar, świnek morskich i królików. Izoenzymy LDH i CKP wyosobniono z tkanek metodą elektroforezy dyskowej w poliakrylamidzie. W tkankach myszek, świnek morskich i chomików syryjskich izoenzymy LDH tworzyły 5 odrębnych pasm, u szczura występowały 4 frakcje. Natomiast izoenzymy CKP tworzyły trzy pasma. Jeden z prążków rozdzielał się przy tym w niektórych gatunków na dwie podfrakcje. Uzyskane wyniki są bardzo przydatne w analizie enzymów krwi zwierząt laboratoryjnych i człowieka ponieważ są one często wykorzystywane jako biochemiczne markery chorób organicznych.

G.

**HUNGLIND A., WIEDEMANN V., KÜHLMANN R., ERHARD M., SCHMIDT P., LOSCH U.:** Zastosowanie przeciwciał z żółtka jaja kurzego w profilaktyce i leczeniu chorób zakaźnych przewodu pokarmowego IV. Badania in vitro nad działaniem ochronnym przed adhezją enterotoksynogennej *Escherichia coli* do wyizolowanych enterocytów. (Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. IV. In vitro studies on protective effects against adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated enterocytes). J. Vet. Med. B. 38, 373—381, 1991 (5)

Enterotoksynogenne szczepy *Escherichia coli* (ETEC) są najczęstszą przyczyną u ssących i odsadzonych prosiąt. Istotne znaczenie w zjadliwości odgrywa adhezja zarazka do komórek nabłonka jelit cienkich i wytwarzanie endotoksyny. Fimbrie odgrywają najważniejszą rolę jako czynnik adhezji. Stosując przeciwciała ekstrahowane z żółtka jaja kur uodpornionych *E. coli* prześledzono ich rolę w hamowaniu adhezji ETEC do enterocytów świni. Znamienne obniżenie adhezji ETEC obserwowano pod wpływem przeciwciał specyficznych dla *E. coli* pochodzących z żółtek jaja kurzego. Nie wszystkie enterocyty cechują się jednakże właściwością adhezji ETEC. Tą właściwość posiadają enterocyty wyposażone w receptory dla fimbrii.

G.