

2. Ellsaesser C. F., Cllem L. W.: J. Fish Biol. 28, 511, 1986.
3. Kajita Y., Sakai M., Atsuta S., Kobajashi M.: Fish Path. 25, 93, 1990.
4. Kitao T., Yoshida Y.: Vet. Immunol. Immunopath. 12, 287, 1986.
5. Mock A., Peters G.: J. Fish Biol. 37, 873, 1990.
6. Muona M., Soivio A.: Aquacult. 106, 75, 1992.
7. Olivier G., Evelyn T. P. T., Lallier R.: Dev. Comp. Immunol. 9, 419, 1985.
8. Peters G., Delventhal H., Klinger H.: Arch. Fisherei. 30, 157, 1980.
9. Peters G., Faisal M., Lang T., Ahmed I.: Dis. Aquat. Org. 4, 83, 1988.
10. Prost M., Sopińska A.: Medycyna Wet. 45, 603, 1989.
11. Sankeran K., Shanto G.: Indian. Biochem. Biophys. 9, 162, 1972.
12. Siwicki A. K.: J. Fish Biol. 31, 45, 1987.
13. Siwicki A. K., Anderson D. P., Dixon O. W.: Vet. Immunol. Immunopath. 23, 195, 1989.
14. Siwicki A. K., Anderson D. P., Dixon O. W.: Dev. Comp. Immunol. 14, 231, 1990.
15. Sniieszko S. F.: J. Fish Biol. 6, 197, 1974.
16. Sopińska A.: Acta Ichtiol. Pisc. 13, 59, 1983.
17. Sopińska A.: Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
18. Sopińska A.: Efekt immunostymulacji w przebiegu działania czynników osłabiających aktywność komórkowych procesów obronnych karpia. Praca hab. AR Lublin, 1991.
19. Studnicka M., Siwicki A., Ryka B.: Bamiđegh 38, 22, 1986.
20. Sychtówy A., Łukas A.: Pol. Tyg. Lek. 33, 45, 1978.
21. Walters G. R., Plumb J. A.: J. Fish Biol. 17, 177, 1980.
22. Yao T., Matsuyama H., Mangindaan R. E. P.: J. Fish Dis. 14, 577, 1991.
23. Zeeman M.: Vet. Immunol. Immunopath. 12, 235, 1986.

Adres autora: dr hab. Antonina Sopińska, Al. Lotników Polskich 42/25, 21-040 Świdnik

JAN RUŁKA, MICHAŁ REICHERT, JAN STEC

## Dynamika replikacji wirusa BLV i PI<sub>3</sub> w hodowli komórek FLK

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

### Summary

#### Dynamics of BLV and PI<sub>3</sub> virus replication in FLK cells

The influence of non-cytopathic and cytopathic strains of M-PI<sub>3</sub> parainfluenza virus on bovine leukaemia virus (BLV) replication was assessed. It was found that enzymatic activity of BLV revertase from FLK cells was 21 471 cpm, 23 127 cpm, 12 406 cpm and 2506 cpm after 24, 48, 72 and 96 hours, respectively. In FLK cells infected additionally with the cytopathic strain M-PI<sub>3</sub>, the number of cpm was lower than in that of control cells (FLK uninfected with M-PI<sub>3</sub>) and was 16 367, 17 329, 20 987 and 4637 after 24, 48, 72 and 96 hours, respectively. The highest activity of BLV revertase from FLK cells infected also with the non-cytopathic strain of M-PI<sub>3</sub> was obtained after 24 and 48 h; the findings were: 26 451 cpm and 28 319 cpm, respectively. This activity after 72 h was 18 952 cpm and after 96 h 3421 cpm. The yield of BLV from FLK cells infected additionally with the non-cytopathic strain M-PI<sub>3</sub> was higher by 37,9 per cent after 24 h p.i. and by 38,8 per cent after 48 h p.i. than in that received from FLK control cells. The results have indicated the synergetic activity of BLV and non-cytopathic M-PI<sub>3</sub> viruses cultivated in FLK cells.

Mieszane zakażenia wirusowe badało wielu autorów (m. in. 3, 7, 9, 10, 19, 20, 24—28, 30, 31). Wykazano, że wirusy mogą wnikać do komórek równocześnie lub też jeden z nich dostaje się tam później, a więc już uprzednio zakażonej (1, 25, 30, 31).

Z uwagi na stacjonarne występowanie zakażeń pogłowia bydła w Polsce wirusem parainfluenzy (2, 5, 15) oraz łatwość jego wykrywania (8, 11, 23), do badań nad dynamiką replikacji wirusa BLV w hodowli komórek FLK użyto wirusa PI<sub>3</sub>.

Celem pracy było określenie aktywności enzymatycznej odwrotnej transkryptazy wirusa enzoptycznej białaczki bydła namnożonego w stacjonarnej hodowli komórek nerki jagnięcia, zakażonej dodatkowo wirusem parainfluenzy bydła — PI<sub>3</sub>.

### Materiał i metody

Komórki FLK (Fetal Lamb Kidney). Komórki nerki płodu jagnięcia zakażone permanentnie wirusem BLV. Namnażano je w warunkach hodowli rotacyjnej stosując płyn RPMI 1640 z dodatkiem 6% inaktywowanej surowicy cielęcej, wolnej od przeciwciał dla wirusa BLV. Badania przeprowadzono stosując wyjściową zawiesinę o koncentracji  $3,4 \times 10^5$  komórek na 1 ml. Próbkę do określania ilości wirusa BLV w supernatancie z nad komórek FLK nie zakażonych i zakażonych dodatkowo wirusem PI<sub>3</sub>, pobierano po 24, 48, 72 i 96 godzinach.

Komórki MDBK (Madine Darby Bovine Kidney). Komórki tych używano jako podłoża do określania koncentracji wirusa PI<sub>3</sub> namnożonego w hodowli komórek FLK. Podłoże utrzymujące stanowił płyn Eagle'a z dodatkiem 0,5% normalnej surowicy cielęcej.

Wirus parainfluenzy bydła — PI<sub>3</sub>. Materiał wyjściowy stanowił wirus M/PI<sub>3</sub>. Jako szczepu cytopatycznego użyto wirusa M/PI<sub>3</sub> namnożonego w hodowli komórek MDBK, zaś jako szczepu niecytopatycznego — VI pasażu wirusa M/PI<sub>3</sub> namnożonego w hodowli komórek FLK. Miano TCID<sub>50</sub> szczepu cytopatycznego określano efektem cytopatycznym na MDBK, zaś szczepu niecytopatycznego — metodą hemadsorpcji, stosując 0,75% krwinki gęsi. Dawką zakaźną dla komórek FLK były 2 ml zawiesiny wirusa M/PI<sub>3</sub> o koncentracji  $10^{5,33}$  TCID<sub>50</sub>.

Aktywność odwrotnej transkryptazy (rewertazy) wirusa BLV. Obecność wirusa BLV w hodowli komórek FLK kontrolowano stosując metodę podaną przez Reicherta i wsp. (22). Miarą ilości wirusa BLV w badanym materiale była aktywność enzymatyczna odwrotnej transkryptazy wyrażona ilością inkorporowanego <sup>3</sup>H monofosforanu tymidyny

Wirusowy charakter enzoptycznej białaczki bydła został udowodniony po raz pierwszy w 1969 r. przez Miller i wsp. (21). Badania Van Der Maatena i wsp. (29) pozwoliły na zaadaptowanie wirusa białaczki bydła — BLV (Bovine Leukemia Virus) do warunków hodowli komórek. Namnażanie wirusa BLV w hodowli komórek nerki jagnięcia stworzyło nowe możliwości w diagnostyce wirusologicznej, serologicznej i profilaktyce enzoptycznej białaczki bydła. Powszechne stosowanie odczynów serologicznych — immunodyfuzja, ELISA (12, 13, 14, 16, 17, 21) wymaga użycia antygeny przygotowanego z hodowli komórek wolnej od innych, dodatkowych zakażeń.

do polimeru tworzonego na matrycy kwasu poliadenylowego przy udziale primera oligo dT. Wyniki oznaczeń podawano zawsze po zakończeniu reakcji enzymatycznej i po odjęciu wartości próby ślepej. Aktywność rewertazy wyrażano liczbą impulsów/min. mierzonych w liczniku scyntylacyjnym.

### Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty przedstawiono w tab. 1. Jak stwierdzono liczba impulsów aktywności enzymatycznej rewertazy wirusa BLV w hodowli komórek FLK nie zakażonej wirusem M/PI<sub>3</sub>, wykazała ich wzrost w czasie pierwszych dwu dni namnażania: po 24 godz. — 21 417, po 48 — 23 127. Po 72 godz. liczba impulsów/min. wynosiła — 12 406, a po 96 godz. po pasażu komórek FLK gwałtownie spadła do 2506 /min. Aktywność rewertazy wirusa BLV namnożonego w obecności szczepu cytopatycznego M/PI<sub>3</sub> była niższa w porównaniu z jej aktywnością dla hodowli komórek FLK wolnej od dodatkowego zakażenia i wynosiła odpowiednio: 16 367, 17 329, 20 987 i 4637 impulsów/min. Wyniki badań, własnych pokrywają się w zasadzie z rezultatami Reicherta i wsp. (22), jednakże najwyższą aktywność rewertazy stwierdzono w 72 godz. po pasażu, zaś w badaniach wymienionych autorów obserwowano ją 4 i 5 dnia namnażania komórek FLK. Przyczyną powstałych różnic wydaje się być ilość komórek FLK użytych do pasażu hodowli. Badania aktywności rewertazy wirusa BLV w komórkach FLK zakażonych dodatkowo szczepem niecytopatycznym wirusa M/PI<sub>3</sub> wykazały, że liczba impulsów/min. po 24 godz. wynosiła 26 451, po 48 — 28 319, po 72 — 18 952 i po 96 — 3421. Wykazały one również, że plon wirusa BLV z komórek FLK zakażonych dodatkowo niecytopatycznym szczepem M/PI<sub>3</sub> był wyższy o 37,9% po 24 godz. namnażania i o 38,8% po 48 godz., od plonu wirusa BLV zebrane z komórek FLK nie zakażonych. Podobnych zależności nie notowano po 72 i 96 godz. od zakażenia. Kontrola wirusa M/PI<sub>3</sub> w czasie określania aktywności rewertazy dla BLV nie wykazała obecności szczepu cytopatycznego w 24 godz. po zakażeniu. Efekt cytopatyczny notowano dopiero po 48 godz. Miano TCID<sub>50</sub> po 48 godz. wynosiło 10<sup>6,66</sup>, zaś po 72 godz. — 10<sup>6,66</sup> i po 96 godz. — 10<sup>7,5</sup>/0,2 ml. Analogiczne badania szczepu M/PI<sub>3</sub> niecytopatycznego przy użyciu testu hemadsorpcji wykazały, że miano TCID<sub>50</sub> po 24 godz. wynosiło — 10<sup>4,5</sup>, a po 48, 72 i 96 godz. odpowiednio: 10<sup>4,33</sup>, 10<sup>6,5</sup> i 10<sup>6,5</sup>/0,2 ml.

Wspomagający wpływ dodatkowego zakażenia wirusowego w hodowli komórek wykazał Sokolow i wsp. (25). Autorzy ci stwierdzili, że wirus *herpes simplex* (HSV) lepiej namnaża się w fibroblastach zarodka kurzego po dodatkowym ich zakażeniu wirusem grypy. Chany i wsp. (4) nie notowali takiej zależności. Wykazali oni, że w przypadku mieszane zakażenia hodowli fibroblastów zarodka kurzego herpeswirusem indyków i wirusem choroby Gumboro otrzymano taki sam zbiór obu wirusów, jak w przypadku oddzielnego zakażenia komórek obu wirusami. Podobne wyniki niezależnego namnażania się szczepu *Montana* wirusa choroby Newcastle i wirusa zakaźnego laryngotracheitu (LTV) wykazał Sharma i wsp. (27). Badania Wesslena i wsp. (31) wykazały typowy przykład interferencji wirusowej po zakażeniu hodowli komórek nerki małpy wirusem grypy typu A szczepu *Singapur* i wiru-

Tab. 1. Wyniki aktywności enzymatycznej rewertazy wirusa BLV w warunkach dodatkowego zakażenia komórek FLK wirusem parainfluenzy bydła — szczep M/PI<sub>3</sub>

Test	Liczba komórek FLK/BLV użyta do pasażu	Wirus	Aktywność rewertazy w czasie (godz.)			
			24	48	72	96
Inkorporacja <sup>3</sup> H-TTD	3,4 × 10 <sup>6</sup> /ml.	FLK + M/PI <sub>3</sub> (cytopat.)	16367*	17329	20987	4637
		FLK + M/PI <sub>3</sub> (niecytopat.)	26451	28319	18952	3421
		FLK	21471	23127	12406	2506
TCID <sub>50</sub>		FLK + M/PI <sub>3</sub> (cytopat.)	0,0	3,66**	6,66	7,5
		FLK + M/PI <sub>3</sub> (niecytopat.)	1,5	4,33	6,5	6,5

Objaśnienia: \* liczba impulsów/min., \*\* wykładnik potęgi log<sub>10</sub>

sem *poliomyelitis*. Najwyższy plon wirusa *polio* uzyskiwano w przypadku, gdy czas pomiędzy zakażeniem wirusem grypy a cytopatycznym szczepem *polio* nie przekraczał 24 godzin. Komórki zakażone wirusem grypy w 24 lub 48 godz. przed dodatkowym zakażeniem wirusem *poliomyelitis*, chronione były przed cytopatycznym działaniem wirusa *polio*. Równoczesne zakażenie wymienionych komórek obu wirusami powodowało zupełną ich degenerację wirusem *polio* w ciągu 48 godzin. Van Der Noorda i wsp. (30) z kolei stwierdzili wzrost oporności embrionalnych komórek chomika transformowanych wirusem SV<sub>40</sub> na dodatkowe zakażenie wirusem *herpes simplex*. Wzrost rezystencji komórek nie był tu związany ani z właściwościami adsorpcyjnymi wirusa HSV, ani ze wzrostem ilości interferonu. Autorzy sugerują, że wirus SV<sub>40</sub> obecny w genomie transformowanych komórek chomika blokuje syntezę wirusa HSV. Znacznie zróżnicowane są następstwa mieszanych zakażeń wirusowych u zwierząt. Wykazano, że myszy zakażone wirusem krowianki i wirusem HSV łatwiej ulegają zakażeniu wirusem białaczki (20). Zakażenie myszy wirusem choroby Newcastle równocześnie z komórkami chłoniaka wymaga ich oporność na rozwój tego nowotworu (6). W przypadku zakażenia myszy wirusem *Coxsackie* i wirusem *polio* obserwowano zaostrzenie się procesu chorobowego (18). Autor tłumaczy ten synergizm uszkodzającym działaniem jednego wirusa na barierę krwionózgową, co ułatwia drugiemu wirusowi dotarcie do ośrodkowego układu nerwowego. Wzajemne oddziaływanie wirusa enzootycznej białaczki bydła i wirusa parainfluenzy obserwowali Rułka i Grundboeck (24). Wykazali oni, że odpowiedź immunologiczna cieląt 6—8-miesięcznych dla wirusa BLV (test ELISA) była dwukrotnie silniejsza w przypadku zakażenia mieszanego niż po zakażeniu tylko wirusem BLV. Badania Mammerickxa i wsp. (17) nie wykazały immunosupresyjnego efektu zakażenia wirusem BLV po dodatkowym zakażeniu bydła wirusem BVD, IBR, czy *Adeno* 3 i 7.

Przedstawione badania własne wykazały, że jak-

kolwiek w przypadku zakażenia hodowli komórek FLK cytopatycznym szczepem M/PI<sub>3</sub> uzyskano niższe wartości aktywności enzymatycznej rewertazy, które można wiązać z degeneracją znacznej liczby komórek FLK na skutek zakażenia wirusem parainfluenzy, to w przypadku szczepu M/PI<sub>3</sub> niecytopatycznego, taką możliwość należy wykluczyć. Wyniki aktywności rewertazy wirusa BLV po dodatkowym zakażeniu komórek FLK szczepem niecytopatycznym są znacznie wyższe w porównaniu z wynikami dla szczepu cytopatycznego i wskazują na synergistyczne współdziałanie obu wirusów. Wyjaśnienie tego zjawiska jest trudne na obecnym etapie i ostatecznej odpowiedzi należy szukać stosując techniki badań biologii molekularnej. Można przypuszczać, że istotną rolę w replikacji cząstek wirusa BLV mogą odgrywać pewne frakcje glikoproteidowe wirusa parainfluenzy. Badania takie będą przedmiotem dalszych analiz i pozwolą wyjaśnić wpływ zakażenia wirusem PI<sub>3</sub> na dynamikę namnażania się wirusa enzootycznej białaczki bydła zarówno w hodowli komórek FLK, jak i w organizmie zwierząt.

## Piśmiennictwo

1. Bibrack B.: Zntbl. Vet. Med. 178, 195, 1970.
2. Buczek J., Deptuła W., Deptuła D., Lisowski K.: Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin 2, 472, 1983.
3. Channock R. M.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 379, 1955.

4. Chany C., Brailovsky C.: Comp. Rend. Acad. Sci. 261, 4282, 1965.
5. Deptuła W., Rułka J., Deptuła D.: Mat. VII Kongresu PTNW, Warszawa 2, 106, 1987.
6. Eaton M. D., Scala A. R.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 132, 20, 1959.
7. Fletcher R. D., Javvasu C.: Arch. ges. Virusforsch. 38, 105, 1972.
8. Fischman H. R., Bang F. B.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 969, 1936.
9. Hatano M., Yoshie Ch.: Arch. ges. Virusforsch. 23, 314, 1957.
10. Kaleta E. F., Bankowski R. A.: J. natn. Cancer Inst. 48, 1303, 1972.
11. Kita J., Norcross N., Gillespie J. H.: Cornell Vet. 43, 431, 1968.
12. Kita J., Kowalski B., Bieńkowski J.: Medycyna Wet. 43, 93, 1987.
13. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
14. Kuźmak J., Grundboeck-Jusko J.: Medycyna Wet. 42, 217, 1986.
15. Larecki Z., Wiśniewski J.: Medycyna Wet. 38, 454, 1972.
16. Mammerickx M., Portetelle D., Kettman R., Ghysdel J., Burny A., Dekegel D.: Vet. Microbiol. 1, 293, 1976.
17. Mammerickx M., Antoine O., Burny A., Desmecht M., Kerkhofs P., Palm R., Portetelle D., Wellemans G., Wyffels R.: Ann. Med. Vet. 133, 115, 1989.
18. McNair Scott T. F.: Adv. Vir. Res. 3, 165, 1931.
19. Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 34, 779, 1973.
20. Merekalova Z. I., Jakovleva L. S., Mazurenko N. P., Orekhova N. M.: Vop. Virus. 33, 428, 1988.
21. Miller J. M., Miller J. D., Olson C., Gillette K. G.: J. natn. Cancer Inst. 43, 1297, 1969.
22. Reichert M., Grundboeck-Jusko J.: Medycyna Wet. 44, 14, 1988.
23. Rułka J.: Medycyna Wet. 43, 18, 1990.
24. Rułka J., Grundboeck M.: Mat. VII Kongresu PTNW, Warszawa 4, 53, 1987.
25. Sokolov M. J., Podčernejeva R. J.: Vop. Virus. 15, 57, 1970.
26. Szanto J., Lesso J.: Acta Virol. 15, 17, 1971.
27. Sharma J. M., Ragci L. G.: Am. J. vet. Res. 26, 935, 1965.
28. Thomssen R., Suhrkamp E., Bonk S.: Arch. ges. Virusforsch. 37, 02, 1972.
29. Van Der Maaten M. J., Miller J. M., Bothe A. D.: J. natn. Cancer Inst. 52, 491, 1974.
30. Van Der Noordda T., Enders J. F., Diamandopoulos G. T.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 122, 915, 1968.
31. Wesslen T., Hermodsson S., Philipson L.: Arch. ges. Virusforsch. 9, 31, 1959.

Adres autora: dr Jan Rułka, ul. Lubelska 17/6, 24-100 Puławy

TADEUSZ KOŚLA, MARIA ROGA-FRANC, ELIGIUSZ ROKICKI

## Poziom Ca, Cu, Mg, Zn i P nieorganicznego w surowicy krwi krów a środowiskowe skażenie kadmem

Katedra Higieny Zwierząt Wydziału Zootechnicznego SGGW,  
ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

## Summary

The level of Ca, Cu, Mg, Zn and inorganic P in blood sera of cows in an environment polluted with Cadmium

The concentration of Ca, Cu, Mg, Zn and inorganic P in sera of cows in a natural environment polluted with Cd (Warsaw region) was examined. Samples of blood were collected 6 times from 66 dairy cows from the Warsaw region in the years 1986—1989. The content of Cd, Ca, Mg, Cu and Zn and inorganic P was determined by the ASS method according to Bagiński and coworkers (3) on the basis of the Cd content the results were divided into three groups: 1 below 0,27  $\mu\text{mol Cd/l}$ , 2 from 0,27 to 0,53  $\mu\text{mol Cd/l}$ , 3 more than 0,53  $\mu\text{mol Cd/l}$ , and the results were analyzed in relation to the Cd content. Cadmium did not affect the content of the examined elements in blood. The concentration of Ca, inorganic P and Mg was at normal levels whereas the content of Zn was high and of Cu low.

Toksyczne działanie kadmu polega na wiązaniu wolnych grup sulfhydrylowych, a przez to hamowaniu aktywności enzymów lub zmianie konformacji białek (5, 9). Jony Cd współzawodniczą ponadto z jonami Ca o białka wiążące wapń w procesach wchłaniania w enterocytach (7, 8). Przy dużej podaży kadmu w treści jelit białko to łączy się z tym pierwiastkiem zwiększając jego wchłanianie i przez

to stężenie kadmu w surowicy krwi rośnie. Obniżenie zawartości wapnia w paszy powoduje wzrost koncentracji Cd w wątrobie i nerkach o 50 do 300% (4). W przypadku niedoboru wapnia w diecie, kadm może nasilać zmiany osteoporozyjne i indukować wtórną nadczynność przytarczyc (8). Kadm działa antagonistycznie na wchłanianie miedzi, współzawodnicząc z tym pierwiastkiem o miejsce wiązania w metalotioneinie jelitowej i wątrobowej, a mniejsza trwałość połączeń miedzi z metalotioneiną umożliwia wypieranie tego metalu z kompleksu przez kadm (7, 10, 14). Niedobór cynku w diecie zwiększa koncentrację kadmu w wątrobie (6). Enzymy, które zawierają cynk, mogą z łatwością zastępować ten metal kadmem, co wpływa na ich częściową lub całkowitą inhibicję (2). Uwzględniając antagonistyczne działanie Cd wobec Ca i innych pierwiastków podjęto badania w celu poznania wpływu kadmu, występującego w naturalnych warunkach okolic Warszawy na zawartość Ca, P- nieorganicznego, Mg, Cu i Zn w surowicy krwi krów.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 66 krowach mlecznych rasy ncb pochodzących z ferm bydła Łomna i Parzniew oraz z 3 gospodarstw rodzinnych w gminie Czosnów i 3 gospodarstw w gminie Leszno. Wybrane obory położone były 10—20 km od północnej granicy Warszawy i w takiej sa-