

Miano przeciwciał HI w surowicach szczepionych zwierząt wahało się od 20 do powyżej 640. Po zakażeniu kontrolnym samic ciężarnych, średnia liczba młodych, urodzonych od jednej samicy, wynosiła 9,7, podczas gdy w grupie kontrolnej wartość ta była równa 5,4 (19, 22). Dane te pochodzą z ferm, w których jedyną udokumentowaną przyczyną stanów patologicznych ciąży i okresu okołoporodowego, było zakażenie parwowirusowe.

Bliskie pokrewieństwo antygenowe parwowirusa lisów niebieskich z parwowirusem kotów i norek (18, 19), uzasadniało celowość użycia wirusów heterologicznych do sporządzenia krajowych szczepionek doświadczalnych. Badania własne wykazały obecność przeciwciał poszczepiennych u immunizowanych lisów i norek, przy czym najwyższe miana stwierdzono w surowicach zwierząt szczepionych preparatami zawierającymi parwowirus norek. Wyniki uzyskane po zastosowaniu szczepionki doświadczalnej były porównywalne z otrzymanymi w przypadku użycia szczepionek referencyjnych Biovac D i Nordent, używanych w Skandynawii do immunoprofilaktyki zakażeń parwowirusowych u lisów. Skuteczność szczepionek doświadczalnych może być jedynie oceniona w szerokich doświadczeniach terenowych, które zostaną zakończone latem 1995 r. i będą przedmiotem kolejnej publikacji.

Piśmiennictwo

1. Ackerman O., Schubert H. J., Loliger H. C. H.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 84, 223, 1971.
2. Appel M. J. G., Scott F. W., Carmichael L. E.: Vet. Rec. 105, 156, 1979.
3. Arciuch B., Górski J.: Bull. vet. Inst. Pulawy 28-29, 94, 1985.
4. Gordon J. C., Rogers W. A.: J. Vet. med. Ass. 180, 1429, 1982.
5. Górski C.: Problemy doskonalenia technologii produkcji i metod stosowania krajowej szczepionki przeciwko nosowce. Praca hab., Lublin 1982.
6. Górski J., Zwierzchowski J., Mizak B., Daniel A.: Acta Microbiol. Pol. 42, 157, 1993.
7. Górski J., Daniel A., Mizak B., Zwierzchowski J.: Bull. vet. Inst. Pulawy 38, 59, 1993.
8. Kariatsumari T., Horiuchi M., Hama E., Yaguchi K., Ishiguro N., Goto H., Shinagawa M.: J. Gen. Virol. 72, 867, 1991.
9. Kramer J. M., Meunier P. C., Pollock R. V. H.: Vet. Med. small Anim. Clin. 75, 1541, 1980.
10. Mizak B.: Bull. vet. Inst. Pulawy, 38, 98, 1994.
11. Mizak B., Górski J.: Medycyna Wet. oddano do druku
12. Moraillon A.: Recl. Med. Vet. 158, 687, 1982.
13. Moraillon A., Moraillon R.: Recl. Med. Vet. 158, 799, 1982.
14. Pollock R. V. D., Carmichael L. E.: Cornell Vet. 72, 16, 1982.
15. Reed A. P., Jones E. V., Miller T. J.: J. Virol. 62, 266, 1988.
16. Rivera E., Karlson K. A., Bergman R.: Vet. Microbiol. 13, 371, 1987.
17. Thompson H., Mc Candlish I. A. P., Cornwell H. J. C., Macartney N. S., Weipers A. F., Wills J. R. W., Black J. A. C., Mackenzie A. C.: Vet. Rec. 122, 378, 1988.
18. Veijalainen P.: Acta vet. scan. 27, 159, 1986.
19. Veijalainen P.: Raccoon Dog and Blue Fox Parvoviruses. Praca dokt., National Veterinary Institute, Helsinki, 1987.
20. Veijalainen P.: Vet. Microbiol. 16, 219, 1988.
21. Veijalainen P., Neuvonen E., Kangas J.: 3-rd Intern. Sci. Congress Fur Animal Production, Versailles, 1984, s. 58.
22. Veijalainen P., Smeds E.: Am. J. vet. Res. 49, 1941, 1988.
23. Wierup M., Olson P., Hedhammar A., Klingeborn B., Karlson K. A.: Am. J. vet. Res. 43, 2183, 1982.
24. Winans R. E., Marty E. W.: Nat. Fur News 40, 28, 1968.

Adres autora: dr Beata Mizak, ul. Sieroszewskiego 21/27, 24-100 Puławy

KRZYSZTOF KOSTRO, STANISŁAW WOŁOZYN

Porównanie wybranych parametrów odporności u lisów srebrzystych i polarnych

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Summary

Comparison of selected immunological parameters in silver and polar foxes

The aim of the work was to compare selected nonspecific immunological parameters in silver and polar foxes. It was found that out of three mitogens (Con A, La and PWM) only Con A stimulated the strongest lymphocyte proliferation in both species of foxes. Mean stimulation indices and the absolute values of incorporated thymidine were significantly higher in polar foxes. The average percentages of phagocytes and the fatal indices of neutrophils were comparable in both species of foxes, while the mean value of the phagocyte index was much higher in the silver fox. However, in polar foxes a higher concentration of lysozyme in the blood serum was found. The differences in the parameters may influence the susceptibility of these foxes to some infections already at the level of nonspecific primary response.

W hodowli lisów od szeregu lat prowadzona jest stała selekcja mająca na celu uzyskanie najbardziej pożądanых cech użytkowych lub nowych odmian. W selekcji tych zwierząt nie brano dotychczas pod uwagę wrodzonej i nabytej odporności na choroby zakaźne. Rozwój biologii i genetyki molekularnej umożliwił wykazanie polimorfizmu białek surowicy krwi lisów różnych odmian (4, 7, 10). Białka te uważane są jako jeden z wielu genetycznie uwarunkowanych czynników wpływających na podatność lub odporność na zakażenia (17).

Celem pracy było porównanie wybranych parametrów odpowiedzi humoralnej i komórkowej u lisów srebrzystych i polarnych, u których w wcześniejszych badaniach wykazano polimorfizm niektórych białek surowicy krwi (4, 10).

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Do badań użyto 12 lisów srebrzystych i 12 polarnych w wieku 1-2 lat, w okresie przedubojowym, tj. w pierwszej połowie listopada. Zwierzęta były żywione według norm skandynawskich z uwzględnieniem dodatków

mineralno-witaminowych oraz miały stały dostęp do wody. Pochodziły z ferm wolnych od chorób zakaźnych i inwazyjnych.

Izolacja limfocytów i granulocytów. Krew w ilości 5 ml pobierano z żyły dostopowej do jałowych strzykawkę z dodatkiem heparyny, wolnej od środków konserwujących, w ilości 20 j/ml. Izolacji leukocytów dokonywano poprzez wirowanie krwi w gradiencie jednostopniowym według metody opisanej przez Ferrante i Thong (6). Nierozcieńczone próbki krwi nakładano na gradient fikolu (Ficoll 400, Pharmacia, Uppsala, Sweden) z uropoliną (Uropolinum 75%, Polfa) o gęstości 1,095 g/cm³ i osmolalności 400 mm Os/kg i wirowano przez 30 minut przy 400×g w temperaturze pokojowej. Dokładny opis izolacji leukocytów z krwi lisa podano we wcześniejszych pracach (11, 12, 15). Po przepłukaniu komórki jednojądrzaste zawieszano w płynie Eagle'a z dodatkiem antybiotyku, zaś komórki wielojądrzaste w płynie Eagle'a bez antybiotyku i heparyny z dodatkiem 2% albuminy bydlęcej i 0,2% glukozy w stężeniu 5×10⁶ ml. Żywotność komórek kontrolowana za pomocą barwienia błękitem trypanu wynosiła powyżej 95%.

Test proliferacji limfocytów. Komórki o stężeniu końcowym 2×10⁶ ml zawieszano w podłożu Eagle'a z dodatkiem gentamycyny (20 ug/ml) i 10% inaktywowanej surowicy homologicznej lub płodowej surowicy cielęcej (FCS, Serva). Mikrohodowle o objętości 0,2 ml prowadzono w plastikowych mikroplytkach o okrągłym dnie (Sterilin, England). Jako mitogenów używano konkanawaliny A (Con A, Pharmacia), leukoaglutyniny (LA, Pharmacia) i wyciągu ze szkarłatki amerykańskiej (PWM, Gibco). Stężenia wyjściowe wynosiły 20 ug dla Con A i LA oraz rozcieńczenie 1:50 dla PWM. Poszczególne mikrohodowle nastawiano potrójnie. Mikroplytki inkubowano w temperaturze 39°C przez 48 godzin w powietrzu wilgotnym zawierającym 5% CO₂. 6 godzin przed zakończeniem inkubacji do każdego mikrodołka dodawano 1 uCi (37 kBq) ³H-tymidyny (UVVVR, CSSR). Następnie komórki hodowli zbierano na filtrach z włókna szklanego płuczac każdy mikrodołek 3-krotnie wodą destylowaną. Filtry wraz z komórkami suszono w temperaturze 60°C przez 1 godzinę. Pomiaru radioaktywności dokonywano w liczniku scyntylacyjnym Beckmana (LS 5000 TD, Beckman).

Odczyn fagocytarny. Zdolność pochłaniania przez neutrofile określono w stosunku do bakterii wzorcowego szczepu *Staphylococcus aureus* Oxford 209P, według metody opisanej uprzednio (15). Wyniki przedstawiono w postaci procentu komórek fagocytujących oraz indeksu fagocytarnego.

Odczyn zabijania. 0,2 ml oczyszczonych granulocytów o gęstości 10×10⁶/ml podłoża Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy homologicznej inaktywowanej mieszano z równą objętością zawiesiny gronkowców o gęstości 6×10⁶/ml. Hodowle inkubowano przez 2 godziny w 39°C. Kontrolę odczynu stanowiła zawiesina bakterii oraz płyn Eagle'a z dodatkiem surowicy. Proces zabijania przerywano przez inkubację hodowli w łaźni lodowej przez 15 minut. Granulocyty lizowano w 4°C przez 5 minut 0,5% wodnym roztworem tritonu (Triton-X 100, Serva), który dodawano do testowanej mieszaniny w ilości 0,2 ml. Następnie posiewano po 0,2 ml zawiesiny na stałe podłoża agarowe z dodatkiem 5% krwi barana (po 3 płytki na każde rozcieńczenie) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C. Po inkubacji liczone kolonie bakterii na poszczególnych płytkach. Aktywność bójczą granulocytów wyrażono w procentach, który obliczano według wzoru:

$$I = \frac{\text{średnia liczba kolonii w próbce badanej}}{\text{średnia liczba kolonii w kontroli}} \times 100$$

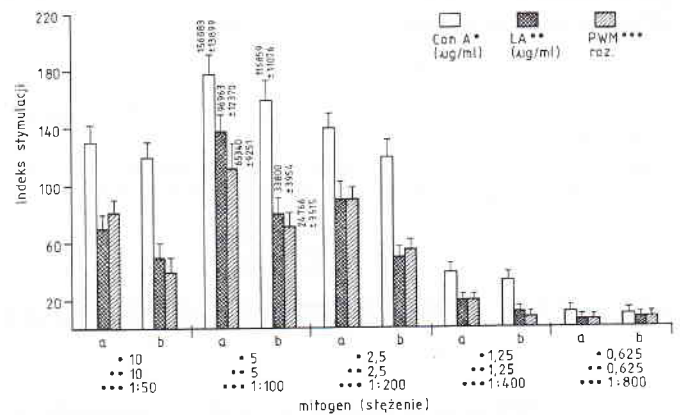
Test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Test NBT wykonano według metody Parka i wsp. (18) w modyfikacji własnej (15) w dwu wariantach: spontanicznym i stymulowanym. Wyniki testu NBT wyrażono w procentach komórek wykazujących obecność formazanu NBT w 100 kolejno liczonych neutrofilach.

Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy testu jednoczynnikowej analizy wariancji.

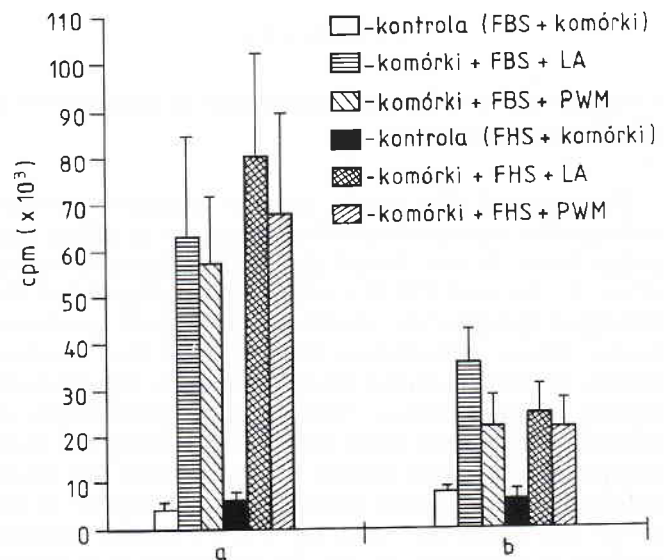
Wyniki i omówienie

Wyniki odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów krwi obwodowej lisów srebrzystych i polarnych stymulowanych mitogenami Con A, LA i PWM ilustruje ryc. 1. Jak wynika z zawartych w niej danych, najsilniej stymulowała limfocyty obydwu odmian lisów Con A. Średnie indeksy stymulacji były istotnie wyższe w lisów polarnych, co stwierdzono nawet w stężeniach 5-krotnie niższych od optymalnego. Odpowiedź proliferacyjna po stymulacji LA i PWM była istotnie wyższa również u lisów polarnych, tak w zakresie wielkości indeksów stymulacji jak i bezwzględnych wartościach inkorporowanej tymidyny. U lisów polarnych istotnie wyższe wskaźniki proliferacji limfocytów pod wpływem użytych mitogenów obserwowano w obecności w podłożu surowicy homologicznej, natomiast u lisów srebrzystych przy użyciu surowicy płodowej cielęcej (ryc. 2). Podobne różnice zaobserwowano w odniesieniu do proliferacji spontanicznej (ryc. 2).

Wskaźniki nieswoistej odporności przedstawiono w tab. 1. U lisów srebrzystych i polarnych odsetek komórek fagocytujących był zbliżony, natomiast średnia wartość indeksu fagocy-



Ryc. 1. Porównawcze wyniki odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów krwi lisa polarnego i srebrzystego w zależności od rodzaju i stężenia mitogenu a – lisy polarne, b – lisy srebrzyste



Ryc. 2. Wpływ surowicy na spontaniczną i stymulowaną mitogenem proliferację limfocytów krwi lisa polarnego i srebrzystego a – lisy polarne, b – lisy srebrzyste

Tab. 1. Porównawcze wyniki odporności nieswoistej lisów srebrzystych i polarnych (n = 3)

	% komórek fagocytujących	IF	IB	Lizozym mg/L	NBT	NBT stmulowany
Lisy srebrzyste	52,6±1,3	14,8±0,5*	90,2±0,9	4,2±0,3*	29,5±4,7	56,1±2,2
	(46–62)**	(12,2–17,8)	(82,9–93,6)	(2,5–6,0)	(7–63)	(25–90)
Lisy polarne	56,1±2,2	11,7±0,9*	86,8±2,2	6,4±0,7*	29,1±0,8	64,6±5,2
	(42–69)	(6,3–15,3)	(68,8–94,9)	(3–12)	(10–50)	(26–89)

Objaśnienia: IF – indeks fagocytarny, IB – indeks zabijania, * – różnice statystyczne istotne przy $p \leq 0,05$ w badanych grupach, ** – w nawiasach podano wartości minimalne i maksymalne.

tarnego była istotnie wyższa u lisów srebrzystych. Aktywność bójcza neutrofilii oraz odsetek komórek redukujących NBT były podobne u obu badanych odmian, natomiast stężenie lizozymu było istotnie wyższe w grupie lisów polarnych.

Wrodzona oraz nabyta odporność organizmu uwarunkowana jest przede wszystkim jego genotypem (8, 17, 20). Mechanizmy odpowiedzialne za obronę organizmu zwierzęcego przed zakażeniem można ogólnie podzielić na trzy grupy. Pierwszą z nich są bariery anatomiczne i funkcjonalne różnego typu. Kolejną grupę stanowią komórkowe (neutrofile, makrofagi komórki NK) i humoralne (naturalne przeciwciała, properdyna, dopełniacz, lizozym, system cytokin, białka ostrej fazy) czynniki odporności nieswoistej. Sprawność oraz harmonijne współdziałanie tych mechanizmów warunkuje uruchomienie odpowiedzi immunologicznej w wyniku zakażenia naturalnego lub szczepień ochronnych (8). Badania własne wykazały wyraźne różnice w zakresie badanych parametrów odporności nieswoistej lisów srebrzystych i polarnych. U obu odmian najsilniejszą odpowiedź proliferacyjną limfocytów stwierdzono po stymulacji Con A. Stanowi to potwierdzenie wcześniej uzyskanych wyników, iż u lisów hodowlanych mitogenem z wyboru do stymulacji nieswoistej proliferacji limfocytów jest Con A (13, 14). Istotnie wyższe indeksy po stymulacji wszystkimi użytymi mitogenami stwierdzono u lisów polarnych. Dotyczyło to zarówno wielkości indeksu stymulacji jak i bezwzględnej ilości inkorporowanej tymidyny (ryc. 1). Wiele czynników natury fizycznej, chemicznej i biologicznej wywiera modulujący wpływ na ilość tymidyny inkorporowanej z podłoża (2, 13, 14). W badaniach własnych stwierdzono, że istotny wpływ na aktywność proliferacyjną limfocytów ma rodzaj surowicy zawartej w podłożu. Różnice te dotyczyły tak proliferacji stymulowanej jak i spontanicznej (ryc. 2). Według danych piśmiennictwa (1, 3, 5, 16, 19, 20) odpowiedź proliferacyjna limfocytów na mitogeny jest uwarunkowana genetycznie i nie zależy od proporcji limfocytów T i B oraz fazy S podziału tych komórek. Dla uzyskania miarodajnych i powtarzalnych wyników konieczny jest jednak dobór odpowiednich komponentów i ustalenie optymalnych warunków wykonywania testu proliferacji *in vitro*.

U lisów srebrzystych stwierdzono istotnie wyższe indeksy fagocytarne natomiast aktywność bójcza neutrofilii była podobna u obu badanych odmian. Można domniemywać, że zaobserwowane różnice w zdolności fagocytarnej mogą być wynikiem genetycznie uwarunkowanych cech błony komórkowej neutrofilii (8, 16), a szczególnie liczba dostępnych receptorów Fc i C na ich powierzchni, czy też różnej zawartości opsonin lub substancji hamujących fagocytozę w surowicach badanych odmian lisów (15, 17).

W przeprowadzonych badaniach wykazano u lisów polarnych istotnie wyższe stężenie lizozymu, niż u srebrzystych. Zgodnie z poglądem Müllera i Brema (17) może to sugerować, iż niższy indeks fagocytarny u lisów polarnych jest kompensowany aktywnością (wyższym poziomem) lizozymu. Stwierdzone różnice w zakresie badanych parametrów (wskaźników) mogą ewentualnie rzutować na zróżnicowaną podatność testowanych odmian lisów na niektóre zakażenia, już na poziomie odpowiedzi nieswoistej pierwotnej (17). Warto podkreślić, że w toku wieloletnich badań terenowych zaobserwowano znacznie mniejszą wrażliwość na trychofitozę lisów srebrzystych w porównaniu do polarnych. W tych samych fermach i przy identycznym żywieniu wskaźniki zachorowalności lisów srebrzystych były 3–4-krotnie niższe, niż polarnych (21, 22). Z kolei lisy srebrzyste są bardziej podatne na zakażenia bakteryjne związane z przypadkowymi urazami skóry czy też błony śluzowej jamy ustnej przez odłamki kostne karmy. Przedstawione w niniejszej pracy dane wskazują, że w selekcji hodowlanej, niezależnie od oceny cech użytkowych, mogą być wykorzystywane wyniki badań nad odpornością poszczególnych odmian lisów hodowlanych.

Piśmiennictwo

1. Astle C. M., Harrison D. F.: Cellular Immun. 21, 192, 1976.
2. Barta O.: Vet. Immunol. 4, 279, 1983.
3. Buckley P. J., Wedmer H. J.: J. Immunol. 119, 9, 1977.
4. Brodacki A., Kostro K.: Univ. Mariae Curie Skłodowska EE 16, 189, 1993.
5. Edfors-Lilja I., Bergstrom M., Gustafsson U., Magnusson U., Fossum C.: Vet. Immunol. 27, 351, 1991.
6. Ferrante A., Thong Y. H.: J. Immunol. Methods 34, 279, 1980.
7. Juneja R. K., Nini T., Lohi O., Larsen B., Gahne B.: Genetics 19, 237, 1988.
8. Kehrl M. E., Weigel K. A., Freeman A. E., Thurston R., Kelly D. H.: Vet. Immunol. 27, 303, 1991.
9. Knudson K. L., Kaiser G., Lamont S. J.: Poultry Sci. 69, 65, 1990.
10. Kostro K., Brodacki A.: Medycyna Wet. 45, 626, 1989.
11. Kostro K.: Medycyna Wet. 45, 231, 1989.
12. Kostro K.: Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska DD, 44, 117, 1989.
13. Kostro K., Wiktorowicz K.: Vet. Immunol. 29, 182, 1991.
14. Kostro K., Wiktorowicz K.: Acta Vet. Hung. 40, 39, 1992.
15. Kostro K.: Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska DD 48, 147, 1993.
16. Liacopoulos-Briot M., Stiffel C., Lambert F., Decreusefond C.: Cellular Immun. 44, 29, 1979.
17. Müller M., Brem G.: Experientia 47, 923, 1991.
18. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M.: Lancet 2, 532, 1968.
19. Pink J. R., Miggiano V. C.: J. Immunol. 119, 1796, 1977.
20. Stiffel C., Liacopoulos-Briot M., Decreusefond C., Lambert F.: J. Immunol. 7, 291, 1977.
21. Wołoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K., Grądzki Z.: Medycyna Wet. 39, 387, 1983.
22. Wołoszyn S.: Hod. Drob. Inwent. 32, 16, 1984.

Adres autora: dr Krzysztof Kostro, ul. Weteranów 42/24, 20-044 Lublin