

Diagnostyka enzootycznej białaczki bydła przy użyciu testu seroneutralizacji

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Diagnosis of enzootic bovine leukaemia by the seroneutralization test

The seroneutralization test based on the inhibition of syncytial effect (SN-ST) turned out to be very useful in the serological diagnostics of enzootic bovine leukaemia. The mean coefficient value of the SN-ST for positive sera (ELISA titer from 200 to 3200) was 0.1, for doubtful (ELISA = 100) – 0.52 and for negative sera 0.94. In case of negative serum the multinuclear cells (syncytium) were very large and numerous and with 85 to 100 nuclei; for doubtful sera they were small, scarce and with 25 to 30 nuclei. No syncytia were observed with the presence of negative sera. The time of incubation of BLV with positive sera played a very important role in the process of seroneutralization. The best results of SN-ST, which corresponded to the ELISA, were found after two hours of neutralization.

Serologiczna diagnostyka enzootycznej białaczki bydła (ebb) w kraju i na świecie oparta jest głównie na dwu odczynach – immunodyszuzji w żelu agarozowym (6, 7, 12, 14, 16) i teście ELISA (2, 17, 20, 21, 22). Wymienione metody serologiczne mimo swoich zalet posiadają i wady: odczyn immunodyszuzji (ID) – prosty i o wysokiej swoistości jest jednak mało czuły, zaś test ELISA – o wysokiej czułości lecz pracochłonny i drogi.

W badaniach własnych postanowiono wykorzystać test seroneutralizacji w diagnostyce białaczki bydła oparty o efekt syncytialny z użyciem komórek FLK-BLV. Jako markera zastosowano komórki CC81. Badania wielu autorów m.in. 3, 9, 11, 13, 15, 19, wykazały pełną przydatność efektu syncytialnego w wirusologicznej diagnostyce zakażeń wirusem BLV (Bovine Leukemia Virus), w związku z czym otwartym problemem pozostaje diagnostyka serologiczna choroby przy pomocy testu syncytialnego.

Materiał i metody

Komórki FLK (Fetal Lamb Kidney) – komórki nerki płodu owcy zakażone permanentnie wirusem BLV. Namnażano je w płynie RPMI 1640 (GIBCO) z dodatkiem 6% inaktywowanej surowicy cielęcej i antybiotyków (100 penicyliny i 100 µg streptomycyny/ml).

CC81 – komórki uzyskane przez Fischingera i wsp. w 1974 r. z ksenotropowych komórek kota zakażonych wirusem MSV (Mouse Sarcoma Virus). Kultywację tych komórek prowadzono w płynie Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków.

Surowice. Ogółem do badań użyto 35 surowic bydła z gospodarstwa uspołecznionego o wysokim stopniu zapowietrzenia wirusem BLV oraz 4 surowic z gospodarstwa uznanego od wielu lat za wolne od białaczki (grupa IIIa). Wszystkie surowice badane inaktywowano na łaźni wodnej w temp. 56°C – 30 min.

Oznaczanie przeciwciał anty BLV. Kontrolę obecności swoistych przeciwciał odpornościowych w surowicy badanych zwierząt przeprowadzano odczynem ID (antygen produkcji PIWet. Puławy) oraz testem ELISA (BIOVETA Iwanowice CR).

Metodyka testu seroneutralizacji (SN-ST). Test seroneutralizacji wykonywano na płytkach NUNCLON z 24 basenikami o płaskim dnie i o średnicy 1,6 cm. W rzędzie baseników przygotowano najpierw szereg rozcieńczeń surowicy badanej, po czym do każdego dodano 10^4 komórek FLK w objętości 0,1 ml. Po 2 godzinach inkubacji w temp. 37°C dodawano 0,8 ml komórek CC81 w koncentracji $1,6 \times 10^5$. Powyższą zawiesinę komórek namnażano przez 24 godz. w temp. 37°C a następnie zlewano znad nich płyn wzrostowy i przemywano roztworem PBS. Tak przygotowane komórki barwiono metodą Pappenheima. Ilość powstałych syncytiów zliczano w mikroskopie odwróconym f-my Zeiss w powiększeniu $10 \times 12,5$ obserwując względnie duże pole widzenia (2 mm^2) namnożonej hodowli komórek.

Ocena i obliczanie wyników. Zasadę i ocenę wyników testu seroneutralizacji prowadzono wg instrukcji wykrywania wirusa białaczki bydła testem syncytialnym (10). Podstawowe obserwacje i liczenie syncytiów prowadzono przy 125-krotnym powiększeniu mikroskopu. Z reguły zliczano ilość syncytiów z 10 różnych pól widzenia, sumowano je i obliczano wartość średnią dla pola 2 mm^2 . Uzyskane liczby stanowiły wartość współczynnika syncytiów dla danej surowicy w teście seroneutralizacji.

$$\text{wzór: } N = \frac{x}{2 \text{ mm}^2}$$

N – współczynnik dla badanej surowicy w teście SN-ST
x – średnia liczba syncytiów w polu widzenia o pow. 2 mm^2 .

Chcąc znać liczbę syncytiów na całej powierzchni hodowli komórek w baseniku (2 cm^2) należy wartość współczynnika pomnożyć przez 200.

Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty badań ilustruje tab. 1, 2, 3 i 4 oraz ryc. 1, 2 i 3. Rozróżnianie struktury uzyskanych syncytiów i ich morfologii nie nastęrcza większych trudności. W zależności od ilości przeciwciał swoistych dla wirusa BLV są one różnej wielkości i o różnorodnym kształcie. Liczba jąder komórkowych w syncytium waha się od 5-6 do 85-100. W przypadku surowic nie zawierających przeciwciał anty BLV, utworzone syncytia są zwykle liczne, duże i o różnorodnym kształcie (ryc. 1), zaś dla surowic o niskim mianie przeciwciał (ELISA 1:100) są średniej wielkości i zawierają około 25-30 jąder komórkowych (ryc. 2). Syncytia te poprzez swoją morfologię dają podstawy do rozpoznania choroby. Najpewniejszych podstaw diagnostycznych w teście syncytialnym dostarczają duże

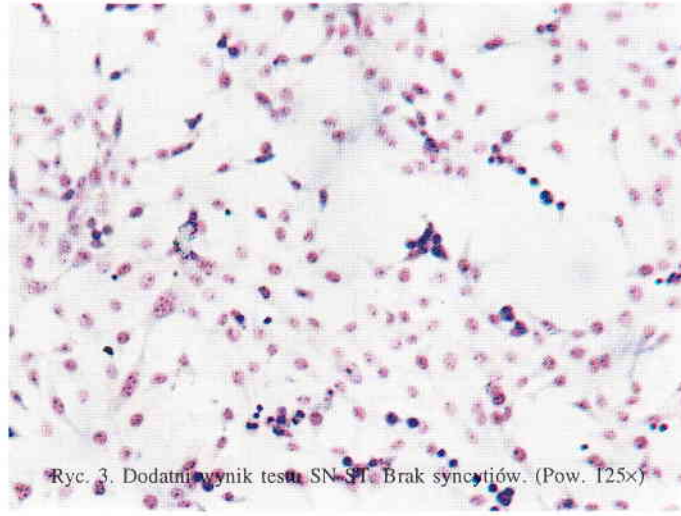
Tab. 1. Wpływ czasu neutralizacji wirusa BLV na wynik testu seroneutralizacji (SN-ST)

Czas neutralizacji	Rozcieńczenie surowicy	Wartość liczbowa współczynnika testu SN-ST surowic bydła białaczkowego:																
		18	36	20	32	19	23	27	34	35	3	9	24	29	31	1	25	33
1 godz.	p*	1,0	2,0	1,7	1,1	1,5	1,3	1,9	2,0	2,2	1,1	1,2	1,3	2,5	2,1	1,3	1,5	1,4
	1/2**	2,6	3,0	1,9	2,2	1,9	1,1	2,0	3,0	1,6	1,4	1,7	0,9	2,0	2,7	2,0	0,9	2,2
2 godz.	p	0,05	0,1	0,2	0	0,2	0,15	0,2	0,06	0,15	0,4	0,3	0,7	0,3	0,3	0,8	0,4	0,8
	1/2	0,1	0,3	0,5	0,8	0,1	0,7	0,5	0,2	0,5	0,7	0,9	1,2	0,7	0,4	1,1	1,2	0,8
Test ELISA		800	800	400	400	200	200	200	200	200	100	100	100	100	100	-	-	-

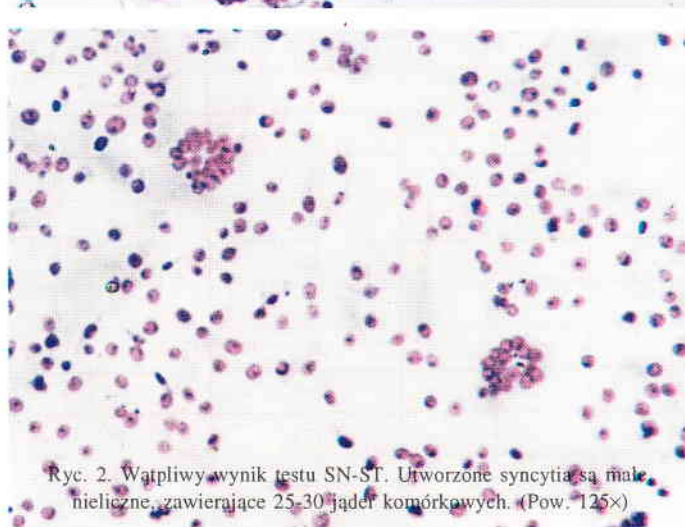
Objaśnienia: * – surowica nierozcieńczona (pełna), ** – surowica badana rozcieńczona płodową surowicą cielęcą nie zawierającą przeciwciał anty BLV.



Ryc. 1. Ujemny wynik testu SN-ST. Syncytia duże, liczne, zawierające 85-100 jąder komórkowych. (Pow. 125x)



Ryc. 3. Dodatni wynik testu SN-ST. Brak syncytiów. (Pow. 125x)



Ryc. 2. Wątpliwy wynik testu SN-ST. Utworzone syncytia są małe, nieliczne, zawierające 25-30 jąder komórkowych. (Pow. 125x)

syncytia, które nawet nieliczne pozwalają na rozpoznanie białaczki bydła. Surowice zawierające swoiste przeciwciała o mianie ELISA 1:200 – 1 : ≥ 3200 hamują efekt syncytialny (ryc. 3). Stwierdzone niekiedy syncytia są nieliczne, małe i zawierają 2-5 jąder komórkowych. Najczęściej obserwuje się tu powiększenie komórek, rozpulchnienie ich chromatyny jądrowej i słabsze wybarwienie. Interesujące jest, że wszystkie jądra syncytiów są podobnej wielkości, morfologii i nie obserwuje się form podziałowych. Polykariocytoza syncytium wskazuje, że jest to proces fuzji komórek a nie endomitozy.

W metodyce testu seroneutralizacji istotnym jest czas inkubacji komórek FLK z badanymi surowicami zawierającymi przeciwciała dla wirusa BLV. Uzyskane rezultaty ilustruje tab. 1. Najbardziej wiarygodne wyniki testu SN-ST uzyskano po 2 godzinach neutralizacji wirusa białaczki. Przedłużenie tego czasu z surowicami zawierającymi przeciwciała dla BLV

Tab. 2. Wpływ rozcieńczenia na wartość współczynnika testu SN-ST dla surowic bydła zakażonego wirusem białaczki

Test diagnostyczny	Rozcieńczenie surowicy	Średnia liczba syncytiów w polu widzenia dla surowicy (numer):											
		40	39	36	32	33	34	38	28	45	2	37	cielęca (płodowa)
SN-ST	p*	0	0	0	0	0,3	0	0,15	0	0,7	5,0	0	11,3
	1/2 ^s	0	0	0,8	0,1	2,3	0	2,2	2,6	2,5	7,1	4,4	13,4
	1/4	0	0,8	1,9	0,5	3,3	1,3	5,6	9,1	11,0	10,6	6,6	10,4
	1/8	0,1	1,7	6,0	2,3	6,6	2,1	12,4	11,6	12,0	11,8	11,6	10,3
ID		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ELISA		12800	800	800	400	400	100	100	100	-	-	-	-
SN-ST (wynik ogólny)		-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-	+

Objaśnienia: * – surowica nierozcieńczona (pełna), ** – czas neutralizacji wirus-przeciwciało 2 godz., ^s – surowica badana rozcieńczona płodową surowicą cielęcą nie zawierającą przeciwciał anty BLV.

Tab. 3. Wyniki kontroli serologicznej surowic bydła w kierunku enzoptycznej białaczki

Grupa zwierząt	Nr surowicy	Test serologiczny				
		ELISA	ID	Seroneutralizacja – SN–ST		
				współczynnik	wynik ogólny	
Gospodarstwo zapowietrzone wirusem białaczki (BLV)	I	40	12800	1/32*	0	–
		82129	6400	1/4	0	–
		Czajka	1600	1/32	0	–
		Chuda	800	1/4	0	–
		K-2	800	1/16	0	–
		36	800	1/4	0,1	–
		18	800	1/4	0,05	–
		39	800	1/4	0	–
		95	400	1/4	0	–
		20	400	1/2	0,2	–
		32	400	1/2	0	–
		92	200	1/2	0	–
		90	200	1/4	0	–
		73	200	p	0	–
		64	200	1/4	0	–
		19	200	1/2	0,2	–
		23	200	1/2	0,15	–
		27	200	1/2	0,2	–
		34	200	1/2	0	–
		35	200	p	0,15	–
	II	38	100	–	0,15	–
		3	100	–	0,4	±
		9	100	–	0,3	–
		24	100	–	0,7	±
		28	100	–	0,3	–
		29	100	–	0,3	–
		31	100	–	0,3	–
		8	–	–	0,5	±
		13	–	–	0,4	±
		25	–	–	0,4	±
		1	–	–	0,8	+
	III	33	–	–	0,5	±
		45	–	–	0,7	±
		37	–	–	0	–
	Ciel. płodowa		–	–	11,3	+
Gospodarstwo wolne od BLV	IIIa	1	–	–	1,2	+
		2	–	–	1,0	+
		3	–	–	1,3	+
		4	–	–	1,0	+

Objaśnienia: * – dodatni wynik odczynu ID w rozcieńczeniu surowicy 1:4, p – dodatni wynik odczynu ID z surowicą nierozcieńczoną (pełną), + – dodatni wynik testu SN–ST, ± – wynik wątpliwy, – wynik ujemny.

nie powoduje wzrostu liczby syncytiów, natomiast skrócenie go do 1 godziny miało istotny wpływ na ostateczny wynik SN-ST. Surowice wykazujące dodatni wynik ELISA (1:200-1:800) po 2 godzinach neutralizacji wirusa wykazywały niskie wartości liczbowe współczynnika testu SN-ST (0,06-0,2), podczas gdy neutralizacja przez 1 godzinę powodowała 5-20-krotny wzrost jego wartości. Wyniki neutralizacji surowic 1 godzinę były nieadekwatne do rezultatów ELISA i nie korespondowały również z rezultatami współczynnika testu SN-ST dla surowic ujemnych lub dla surowic o mianie 1:100 neutralizowanych 2 godz. Spośród surowic o mianie 1:100 po 2 godz. neutralizacji trzy z nich wykazywały ujemny wynik SN-ST (współczynnik 0,3), zaś dla dwu pozostałych wynosił on 0,4-0,7. Rozcieńczenie surowic badanych miało również wpływ na wartość współczynnika testu seroneutralizacji (tab. 2). Dwukrotne rozcieńczenie surowic o mianie ELISA 1:800-1:12 800 nie zmieniało liczbowej wartości współczynnika testu SN-ST, natomiast w przypadku surowic o mianie 1:100 do 1:400, wartość jego uległa zmianie.

Oceniając czułość testu SN-ST porównano ją z wynikami odczynu immunodyszfuzji i testu ELISA. Jak wykazano w tab. 2, spośród 6 surowic z dodatnim wynikiem ID, stwierdzono u nich również obecność swoistych przeciwciał anty BLV w teście SN-ST. Spośród pozostałych 6 surowic wykazujących ujemny wynik ID, w dwu przypadkach notowano dodatni wynik seroneutralizacji, jeden był wątpliwy i dwa ujemne. Czułość testu seroneutralizacji porównano również z wynikami ELISA. Spośród 12 surowic badanych dodatni wynik ELISA notowano dla 8 surowic, podczas gdy w teście SN-ST obecność przeciwciał dla wirusa BLV stwierdzono w 9 przypadkach.

Przeprowadzone badania wskazują na wysoką zgodność rezultatów testu SN-ST z wynikami odczynu ID i testu ELISA. Wykazanie obecności przeciwciał anty BLV w teście seroneutralizacji w przypadku surowicy nr 37, przy ujemnym jej wyniku ELISA, podkreśla wartość seroneutralizacji w diagnostyce enzootycznej białaczki bydła.

Kolejne wyniki badań nad przydatnością testu SN-ST w rozpoznawaniu ebb przedstawia tab. 3. Jak wykazano (grupa I) spośród 20 surowic badanych o mianie ELISA 1:12 800-1:200, 100% surowic wykazywało współczynnik testu SN-ST od 0 do 0,2. W II grupie dla 12 surowic o mianie ELISA 1:100 lub ujemnych wynosił on 0,3-0,8 a dla 7 surowic ujemnych od 1,0 do 1,3. W przypadku surowic grupy I syncytiów nie notowano lub były one nieliczne, małe i zawierały 2-5 jąder komórkowych. W II grupie surowic powstałe syncytia były większe, wyraźniejsze i liczyły od 25 do 30 jąder, zaś w grupie III były duże, liczne i zawierały od 35-100 jąder komórkowych.

Przeprowadzone badania własne wykazały, że średnia wartość liczbowa współczynnika testu SN-ST dla surowic z dodatnim mianem przeciwciał dla BLV wynosi – 0,1; dla surowic

wątpliwych – 0,52 a dla surowic ujemnych – $\geq 0,94$. Przedstawione wyniki ilustruje tab. 4.

Wysoką czułość testu seroneutralizacji dla wirusa BLV wykazały badania Ferrera i wsp. (4) oraz Guillemana i wsp. (5). Badania Ferrera wykazały również korelację pomiędzy obecnością przeciwciał dla BLV a obecnością samego wirusa u cieląt w wieku 6-18 miesięcy karmionych mlekiem swych matek zakażonych wirusem białaczki. Podobną zgodność wyników testu seroneutralizacji z wynikami odczynu wiązania dopełniacza wykazali Miller i Van Der Maaten (18).

Reasumując wyniki badań własnych jak i innych autorów (4, 5, 18) należy przyjąć, że test seroneutralizacji SN-ST może być wykorzystany przy pomocy efektu syncyotialnego w serologicznej diagnostyce enzootycznej białaczki bydła.

Piśmiennictwo

1. Diglio C. A., Ferrer J. F.: Cancer Res. 36, 1056, 1976.
2. Engwal E., Perlman P.: I. Immun. 109, 129, 1972.
3. Ferrer J. F., Diglio C. A.: Cancer Res. 36, 1068, 1976.
4. Ferrer J. F., Piper C. E., Beliga V.: CEC Inform. Centr. Bruxelles 323, 1976.
5. Guilleman B., Mamoun R., Levy D., Astier T., Irgens K., Parodi A. L.: CEC Inform. Centr. Bruxelles 337, 1976.
6. Gupta P., Ferrer J. F.: Anns Rech. Vet. 9, 683, 1978.
7. Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 38, 19, 1982.
8. Grundboeck J., Grundboeck M.: Instrukcja Min. Rol. Nr 54, 1983.
9. Grundboeck M., Buzata E.: Bull. Vet. Inst. Puławy 30-31, 21, 1987-88.
10. Grundboeck M., Buzata E.: Instrukcja wykrywania enzootycznej białaczki bydła (EBB) testem syncyotialnym. Instytut Weterynarii, Puławy, 1990.
11. Grundboeck M., Buzata E.: Bull. Vet. Inst. Puławy 35, 19, 1992.
12. Hoff-Jørgensen R.: CEC Inform. Centr. Luxemburg 55, 1980.
13. Honma T., Onuma M., Mikami T., Izawa H.: Jpn. J. Vet. Sci. 42, 5, 1980.
14. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
15. Klimentowski S., Powęska J., Kuryszek J.: Medycyna Wet. 45, 470, 1989.
16. Łosieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 48, 205, 1992.
17. Manz D., Weigand D., Behrens F., Ziegelmaier R.: Zntbl. Vet. Med. 28, 280, 1981.
18. Miller J. M., Van Der Maaten M. J.: J. natn. Cancer Inst. 53, 1699, 1974.
19. Paul P. S., Castro A. E., Pomeroy K. A., Johnson D. W., Muscoplat C. C.: Vet. Microb. 3, 77, 1978.
20. Ressay A. A., Gieklens A. L., Quak J., Mastenbroek N., Tuppert C., De Castro: Anns Rech. Vet. 9, 663, 1978.
21. Rułka J., Klimentowski S., Szczotka M., Stec J.: Medycyna Wet. 50, 265, 1994.
22. Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Medycyna Wet. 41, 117, 1985.
23. Van Der Maaten M. J., Miller J. M.: J. natn. Cancer Inst. 52, 491, 1974.

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

BANETH G., WANER T., KOPLAK A., WEINSTEIN S., KEYSARY A.: Badanie psów w Izraelu na obecność przeciwciał dla *Ehrlichia canis*. (Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel). Vet. Rec. 138, 257-259, 1996 (11)

Stosując metodę immunofluorescencji przebadano 410 surowic psów z pięciu geograficznie różniących się rejonów Izraela na obecność przeciwciał dla *Ehrlichia canis*. Za dodatnie miano przyjęto rozcieńczenie surowicy wynoszące 1:20 lub więcej. Trzydzieści procent psów reagowało dodatnio, z tym że w grupie psów towarzyszących człowiekowi wyniki pozytywne występowały u 13,9% osobników zaś w grupie bezpiecznych psów u 37,5% osobników. 17,6% psów zdrowych i 26,6% psów chorych było seropozytywnych. Większy odsetek psów seropozytywnych występował na północy, najmniej w regionie centralnym Izraela. Tylko 14,9% psów w wieku do 1 roku posiadało w surowicy krwi przeciwciała dla *E. canis*. Przeciwciała występowały w surowicach 34,2% psów w wieku ponad 8 lat.

G.

Tab. 4. Ogólna ocena testu seroneutralizacji w diagnostyce enzootycznej białaczki bydła

Zakres wartości liczbowych współczynnika	Mediana	Średnia wartość liczbowa współczynnika	Ogólny wynik testu SN-ST
0-0,2	0,08	0,1	-
0,3-0,7	0,5	0,52	±
0,8- $\geq 1,3$	0,9	$\geq 0,94$	+