

STANISŁAW KLIMENTOWSKI

Zastosowanie testu ELISA do diagnostyki enzoptycznej białaczki bydlę (EBB) przy użyciu zagęszczonych prób surowicy mleka

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

W rutynowej diagnostyce serologicznej EBB używa się głównie krwi. Badanie krwi jest jednak związane z wysokimi kosztami i znacznie trudniejszym jej pozyskiwaniem. Alternatywnym, równoważnie swoistym i tańszym materiałem do badań serologicznych okazało się mleko.

Behrens i wsp. (3), Manz i wsp. (12) i Bauer (1) stwierdzili, że badanie mleka przy użyciu testu ELISA jest w 8—10% czulsze aniżeli badanie surowicy krwi przy użyciu testu AGID. Ten ostatni może być wykorzystany tylko do badań surowicy krwi, gdzie koncentracja przeciwciał jest wyższa aniżeli w mleku.

Obecność przeciwciał anti-BLV w mleku stwierdzili liczni autorzy (2, 3, 10, 16), przy czym zawartość ich z wyjątkiem okresu siarowego, w którym notuje się wzrost poziomu przeciwciał, jest znacznie niższa aniżeli w surowicy krwi. Dlatego też do badania mleka stosuje się wielokrotnie czulszy w porównaniu z AGID test ELISA.

W ostatnich latach do badań testem ELISA wykorzystuje się zbiorcze próby mleka. Pallsen (14) wykazała, że jedno badanie kontrolne krwi przy użyciu AGID równa się kosztom 8 badań zbiorczych prób mleka. Badania zbiorczych prób mleka zostały szczególnie rozwinięte w krajach EWG, w których test ELISA został zaadaptowany do rozpoznawania BHV-1, IBR/IPV, EBB i brucelozy (6). Mają one zastosowanie w kontroli stad wolnych od EBB lub o niskim odsetku zwierząt zakażonych w stadzie.

Przy nowych zakażeniach poziom przeciwciał w mleku jest bardzo niski. Dlatego staje się konieczne zagęszczanie przeciwciał w surowicy mleka. Manz i wsp. (11) opisali zagęszczenie przeciwciał w surowicy mleka przy użyciu systemu ultrafiltracji (Minicon firmy Amicon). Po 25% zagęszczeniu zbiorczych prób mleka uzyskali oni pozytywne wyniki przy zakażeniu stada wynoszącym 2%. Celem pracy była adaptacja testu ELISA do diagnostyki EBB przy użyciu zagęszczonych prób surowicy mleka. Badania te stanowią kontynuację wcześniejszych eksperymentów (8).

Materiał i metody

Do badań użyto prób krwi i mleka pobranych od 229 krów rasy nob z czterech gospodarstw o różnym stopniu zakażenia wirusem EBB określonym na pod-

stawie badań surowicy krwi testem AGID. Wyniki tych badań przedstawiają się następująco:

- gospodarstwo „O” — 9 krów — odsetek zwierząt zakażonych 4,4%,
- gospodarstwo „M” — 59 krów — odsetek zwierząt zakażonych 33,9%,
- gospodarstwo „Cz” — 60 krów — odsetek zwierząt zakażonych 53,3%,
- gospodarstwo „S” — 41 krów — odsetek zwierząt zakażonych 87,8%.

Mleko po pobraniu wirowano przy 1600 g 10—15 min., a następnie po oddzieleniu tłuszczu inkubowano 24 godz. w temp. 37°C celem wytrącenia kazeiny. Po inkubacji próby ponownie wirowano, a uzyskane surowice wysalano przy użyciu nasyconego roztworu siarczanu amonu zachowując proporcje 1 ml surowicy mleka na 0,7 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu. Wysalanie prowadzono w probówkach na rolce przez 1 godz., po czym próby wirowano przy 1600 g 15 min., a następnie zlewano supernatant. Uzyskany precipitat białek serwatki ok. 0,5 g resuspendowano, zachowując proporcję dziesięciokrotnego zagęszczenia tj. rozcieńczano w 1 ml wody destylowanej. Tak przygotowany materiał był używany bezpośrednio do badań testem ELISA.

Do testu AGID surowicy krwi używano antygeny gp firmy „Hoechst” (import z RFN); testy ELISA surowicy krwi i mleka wykonano przy użyciu gotowych zestawów Enzygnost-Rinderleukose firmy Behringwerke (import z RFN) zgodnie z metodyką podaną we wcześniejszej pracy (8).

Wyniki i omówienie

Wyniki porównawczych badań diagnostycznych prób krwi i mleka w kierunku EBB przy użyciu AGID i ELISA w gospodarstwach „O”, „M”, „Cz” i „S” przedstawiono w tab. 1—4.

W gospodarstwie „O” (tab. 1) ogółem otrzymano na 69 badanych krów 3 (4,4%) wyniki dodatnie w teście AGID, 7 (10,1%) w teście ELISA surowicy krwi i 11 (15,9%) wyników dodatnich w teście ELISA mleka. Wszystkie dodatnie wyniki testu AGID zostały potwierdzone w teście ELISA surowicy krwi i mleka, jak również wszystkie dodatnie wyniki w teście ELISA surowicy krwi potwierdzono w badaniu mleka. W czterech przypadkach dodatnich testu ELISA surowicy mleka nie potwierdzonych w badaniu surowicy krwi stwierdzono, że 2 próby pochodziły od krów będących w czasie zasuszania przed wycieleniem, a 1 próba od krowy wkrótce po wycieleniu. W piśmiennictwie znane i opisywane jest przedporodowe i poporodowe zanikanie przeciwciał anti-BLV w surowicy krwi (2, 10). Według tych autorów miana przeciwciał obniżały się już od 4 tygod-

Tab. 1. Wyniki porównawczych badań prób krwi i mleka w kierunku EBB przy użyciu testów AGID i ELISA w gospodarstwie „O”

Wyniki badań	AGID surowicy krwi		ELISA surowicy krwi		ELISA mleka	
	+	-	+	-	+	-
AGID surowicy krwi	+		3 4,3%	0	3 4,3%	
	-		4 5,8%	62 89,9%	8 11,5%	58 84,1%
ELISA surowicy krwi	+	3 4,3%	4 5,8%		6 8,7%	1 1,4%
	-	0	62 89,9%		5 7,3%	57 82,6%
ELISA mleka	+	3 4,3%	8 11,6%	6 8,7%	5 7,2%	
	-	0	58 84,1%	1 1,5%	57 82,8%	
ogółem	3 4,3%	66 95,7%	7 10,1%	62 89,9%	11 15,9%	58 84,1%

Objaśnienia: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

Tab. 2. Wyniki porównawczych badań prób krwi i mleka w kierunku EBB przy użyciu testów AGID i ELISA w gospodarstwie „M”

Wyniki badań	AGID surowicy krwi		ELISA surowicy krwi		ELISA mleka	
	+	-	+	-	+	-
AGID surowicy krwi	+		18 30,5%	2 3,4%	16 27,1%	4 6,8%
	-		5 8,5%	34 57,6%	4 6,1%	35 59,3%
ELISA surowicy krwi	+	18 30,5%	2 3,4%		19 32,2%	4 6,8%
	-	2 3,4%	37 62,7%		1 1,7%	35 59,3%
ELISA mleka	+	16 27,1%	4 6,8%	19 32,2%	1 1,7%	
	-	4 6,8%	35 59,3%	4 6,9%	35 59,3%	
ogółem	20 33,9%	39 66,1%	23 39,0%	36 61,0%	20 33,9%	39 66,1%

Objaśnienia: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

Tab. 3. Wyniki porównawczych badań prób krwi i mleka w kierunku EBB przy użyciu testów AGID i ELISA w gospodarstwie „Cz”

Wyniki badań	AGID surowicy krwi		ELISA surowicy krwi		ELISA mleka	
	+	-	+	-	+	-
AGID surowicy krwi	+		32 53,3%	0	29 48,3%	3 5%
	-		7 11,7%	21 35%	8 13,3%	20 33,3%
ELISA surowicy krwi	+	32 53,3%	7 11,7%		33 55%	6 10%
	-	0	21 35%		4 6,7%	17 28,3%
ELISA mleka	+	29 48,3%	8 13,3%	33 55%	4 6,7%	
	-	3 5%	20 33,3%	6 10%	17 28,3%	
ogółem	32 53,3%	28 46,7%	39 65%	21 35%	37 61,7%	23 28,3%

Objaśnienia: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

nia przed wycieleniem, a następnie ulegały podwyższeniu dopiero 2 tygodnie po porodzie.

W gospodarstwie „M” (tab. 2), w którym odsetek krów zakażonych w teście AGID wyniósł 33,9% (20 krów), w teście ELISA surowicy krwi uzyskano 23 (38,1%), podczas gdy w teście ELISA surowicy mleka 20 (33,9%) wyników dodatnich na 59 badanych zwierząt. Niezgodność wyników testu ELISA i AGID surowicy krwi dotyczyły 5 przypadków wyników dodatnich i w 2 przypadkach ujemnych; testu ELISA surowicy krwi i mleka w 4 przypadkach wyników dodatnich i w 1 przypadku wyniku ujemnego. Powstałe niezgodności mogły być uwarunkowane świeżymi zakażeniami BLV.

W gospodarstwie „Cz” na 60 badanych krów otrzymano w teście AGID surowicy krwi 32 (53,3%) wyników dodatnich, podczas gdy w teście ELISA surowicy krwi 39 (65%), a surowicy mleka 37 (61,6%) wyników dodatnich. Zgodność wyników testu AGID i ELISA surowicy krwi wyniosła 88,3%, natomiast testu AGID surowicy krwi i ELISA surowicy mleka 81,7%.

W gospodarstwie „S” o najwyższym odsetku zwierząt zakażonych w stadzie wynoszącym 87,8% przy badanych 41 krowach otrzymano w teście ELISA surowicy krwi 100% wyników dodatnich, a w teście ELISA surowicy mleka 90,2% wyników dodatnich.

Porównując zastosowane trzy testy należy podkreślić, że najwyższą zgodność wyników między nimi (88,4—94,2%) otrzymano w gospodarstwie „O”, w którym odsetek zwierząt zakażonych w stadzie był niewielki (4,4%). W miarę wzrostu tego wskaźnika rosną nieznacznie również niezgodności wyników, co uwidocznione jest szczególnie w gospodarstwie „Cz”, w którym wyniki dodatnie w poszczególnych testach pokryły się w 81,7—88,3%. W tab. 5 przedstawiono wyniki badania testem ELISA losowych zbiorczych prób mleka, pochodzących od grup zwierząt o różnym odsetku zakażenia BLV. Wynika z niej, że stosując w technice ELISA zagęszczone surowice mleka istnieje możliwość wykrycia infekcji nawet w przypadku, gdy 1 z 8 krów jest zakażona BLV. Potwierdza to przydatność zbiorczych prób mleka do badań skriningowych.

Wykorzystanie mleka w diagnostyce laboratoryjnej EBB jest przedmiotem kilkuletnich badań licznych autorów (1, 5, 6, 8, 9, 11, 12). Początkowo używano natywnych prób mleka, które w określonych stanach fizjologicznych zawierając niski poziom przeciwciał ograniczały możliwości diagnostyczne. Dopiero rozwój i standaryzacja techniki ELISA oraz opracowanie metod zagęszczania przeciwciał w mleku umożliwiły jego wykorzystanie do diagnostyki EBB.

Istotnym zagadnieniem w uzyskaniu surowicy mleka okazuje się wytrącanie kazeiny. Mainz i wsp. (11) używali w tym celu podpuszczki oraz naturalnego zakwaszania w temp.

Tab. 4. Wyniki porównawczych badań prób krwi i mleka w kierunku EBB przy użyciu testów AGID i ELISA w gospodarstwie „S”

Wyniki badań		AGID surowicy krwi		ELISA surowicy krwi		ELISA mleka	
		+	-	+	-	+	-
AGID surowicy krwi	+			36 87,8%	0	33 80,5%	3 7,3%
	-			5 12,1%	0	4 9,8%	1 2,4%
ELISA surowicy krwi	+	36 87,8%	5 12,1%			37 90,2%	4 9,7%
	-	0	0			0	0
ELISA mleka	+	33 80,5%	4 9,8%	37 90,2%	0		
	-	3 7,3%	1 2,4%	4 9,7%	0		
ogółem		36 87,8%	5 12,2%	41 100%	0	37 90,2%	4 9,7%

Objaśnienia: + wynik dodatni, - wynik ujemny.

Tab. 5. Wyniki badania testem ELISA zbiorczych prób mleka pochodzących od grup zwierząt o różnym odsetku zakażenia BLV

Liczba prób zbiorczych mleka	Rodzaj prób zbiorczych mleka	Wynik badania zbiorczych próby mleka
2	*10/10	+
2	8/10	+
2	2/8	+
2	1/8	+
2	3/7	+
4	4/6	+
2	2/6	+
2	1/6	+
2	3/5	+
2	0/5	-

Objaśnienie: * - liczba prób dodatnich reagentów użytych do zbiorczej próby mleka.

37°C lub w temp. pokojowej. Najbardziej powtarzalne wyniki otrzymali po naturalnym zakwaszeniu w temp. pokojowej. Bünger i Forscher (4) porównywali naturalne zakwaszenie mleka z „prowokowanym” zakwaszeniem (dodatek bakterii kwasu mlekowego), chemicznym (dodatek kwasu mlekowego) oraz enzymatycznym (dodatek podpuszczki) i stwierdzili, że użycie podpuszczki daje podobne wyniki jak naturalne zakwaszenie mleka.

Drugim istotnym elementem w przygotowaniu surowicy mleka jest zagęszczanie przeciwciał. Do dyspozycji mamy obecnie dwie techniki:

— ultrafiltracja przy użyciu „Miniconu” (F-my Amicon) opisana przez Manza i wsp. (11) i Pallesen (14);

— zastosowanie siarczanu amonu opisane przez Forschnera i wsp. (5) oraz w niniejszej pracy. Obie techniki są równie skuteczne, choć druga wydaje się prostsza, szybsza i tańsza.

Zagęszczanie przeciwciał w surowicy mleka stosuje się w zbiorczych próbach mleka do kontroli zdrowotności stada.

Pierwsze próby w odniesieniu do EBB bez zagęszczania przeciwciał prowadzili Prewost (15), Bauer (1) oraz Toma (17) i doszli oni do wniosku, że minimum ok. 10% zwierząt musiałyby być zakażone w stadzie, aby uzyskać dodatni wynik w zbiorczej próbie mleka. Podobnie Noirtin i Fedida (13) uzyskali pozytywne wyniki badań zbiorczych prób mleka od 7 krów, z których jedna była zakażona na BLV.

Zagęszczanie przeciwciał w surowicy mleka doprowadziło do uzyskiwania dodatnich wyników badania zbiorczych prób mleka przy zakażeniu stada wynoszącym 2%, co praktycznie odpowiada wykryciu przeciwciał anti-BLV w zbiorczej próbie mleka pochodzącej od 50 krów, z których jedna była zakażona wirusem EBB (5, 11, 14). Zbiorcze próby mleka mogą być pobierane z udoju bańkowego oraz ze zbiorników mleka.

Reasumując można stwierdzić, że zgęszczone surowice indywidualnych prób mleka są w pełni wartościowym materiałem w diagnostyce serologicznej EBB przy wykorzystaniu techniki ELISA.

Zastosowanie zagęszczonych surowic zbiorczych prób mleka wydaje się godne polecenia ze względu na niskie koszty do kontroli zdrowotności gospodarstw wolnych od EBB (województwa wschodnich regionów Polski, gospodarstwa indywidualne) lub o niskim odsetku zwierząt zakażonych w stadzie. Badanie to jest znacznie tańsze, w porównaniu do badania surowicy krwi. Na obniżenie tych kosztów rzutowe zwłaszcza wyeliminowanie uciążliwego i stresogenego pobierania krwi.

Piśmiennictwo

1. Bauer T.: Einsatzmöglichkeiten der ELISA-Methodik gegenüber der AGID zur Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes — Vergleichende Untersuchungen an Blut- und Milchproben. Praca dokt. Giessen, 1983.
2. Bause J., Schmidt F. W.: Tierärztl. Umschau 35, 642, 1980.
3. Behrens F., Ziegelmeier R., Toth T., Keyserlingk M., Forscher E.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 92, 527, 1979.
4. Forscher E., Bünger I.: Dt. tierärztl. Wschr. 93, 269, 1986.
5. Forscher E., Bünger I.: Dt. tierärztl. Wschr. 93, 112, 1986.
6. Forscher E., Bünger I., Kötler D., Mehrkens L.: Dt. tierärztl. Wschr. 93, 328, 1986.
7. Forscher E., Ewald P., Keyserlingk M., Rötgen W., Seidler M.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 92, 3, 1979.
8. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
9. Kuźmak J., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 42, 217, 1986.
10. Keyserlingk-Eberlus M.: Untersuchungen zum Verhalten maternaler BLV-Antikörper im Blutserum von Kälbern und ihre Bedeutung in tierseuchenrechtlicher Sicht. Praca dokt., Hanover 1980.
11. Manz D., Wiegand D., Behrens F.: Dt. tierärztl. Wschr. 93, 107, 1986.
12. Manz D., Wiegand D., Behrens F.: Zbl. Vet. Med. B 28, 280, 1981.
13. Noirtin C., Fedida M.: Bull. Lab. Vet. 19/20, 31, 1985.
14. Pallesen U.: Wie sicher sind die Kontrolluntersuchungen der Hoffanksammelmilch auf Leukose mit der ELISA-Methode unter Vorschaltung eines Dialysesystems zur Ankonzentration der Antikörper in der Milch? Praca dokt., Hanover 1986.
15. Prewost Ph. A. H.: Contribution à l'étude du dépistage de la leucose bovine enzootique par le test ELISA sur le lait. Praca dokt. Alfort, 1981.
16. Straub O. C., Fischer C. W., Frerking H.: Tierärztl. Umschau 33, 657, 1978.
17. Toma B., Umillaume A., Manet G., Duret C., Eliot M., Crespeau F., Chappuis G., Parodi A. L.: Recl. Med. Vet. 160, 53, 1984.

Adres autora: dr Stanisław Klimentowski, ul. Pierwiosnkowa 6, 53-224 Wrocław

Климентовский С. — Применение критерия ELISA для диагностики энзоотического лейкоза скота (эле) с использованием сгущенных проб сыворотки молока

При помощи критериев ELISA и AGID исследовано 229 проб сыворотки крови и молока из 4 хозяйств с разным процентом инфекции BLV (4,3%, 33,9%, 53,3%, 87,8%). Сыворотки молока для исследования критерием ELISA сгущались 10-кратно с применением насыщенного раствора сульфата аммония. Во всех хозяйствах обнаруживалось на 2,4—11,5% больше инфицированных коров критерием ELISA молока чем AGID сыворотки крови. Сверх того, в хозяйствах с низким процентом животных, инфицированных BLV (ок. 5%), обнаруживалось притерием ELISA сыворотки молока на 5,8% больше положительных реагентов чем в критерии ELISA сыворотки крови. Сходство результатов между примененными методами формировалось по-разному в зависимости от степени инфекции стада и составило в среднем 85—95%. Исследовалась также возможность применения сборных проб молока для контроля инфекции BLV в стаде. Подтвердилась пригодность проб молока для диагно-

стики эле как более дешевого и легкого для получения материала.

Kliimentowski S. — The ELISA test and diagnosis of enzootic bovine leukosis using concentrate sera and milk samples

There were tested 229 samples of serum and milk derived from four farms in which the number of animals infected with bovine leukaemia virus was 4.3%, 33.9%, 53.3%, and 87.8%. The samples of milk tested by the ELISA were concentrated 10-fold by ammonium sulphate. In all the farms at 2.4—11.5% more infected cows were discovered testing milk by the ELISA compared with serum examination by the AGID test. Besides, in the farms with low percentage of animals infected, at 5.5% more positive reactions were stated by the ELISA using milk instead of serum. The consistence of results between the methods used ranged from 85—95% depending on the degree of herd infections. The possibility to use the collective milk samples to control the state of infection in a herd was also examined. It was confirmed the usefulness of milk examination towards enzootic bovine leukosis.

STANISŁAW CAKAŁA, MARIAN KONDRACKI

Enzootyczne zakaźne odoskrzelowe zapalenie płuc u cieląt i młodego bydła*)

Zakład Badania Chorób Bydła i Owiec Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Enzootyczne zakaźne odoskrzelowe zapalenie płuc (EZOZP) jest najczęstszą przyczyną znacznych strat ekonomicznych w chowie młodego bydła, szczególnie w większych stadach. Jakkolwiek w typowym przebiegu choroba występuje zwykle w postaci przewlekłej lub podostrej, to jednak nierzadko dochodzi do jej nasilenia w postaci ostrej. Schorzenie to należy do patologicznego syndromu układu oddechowego, a w zależności od warunków w stadzie w jego powstawaniu mogą odgrywać rolę czynniki zarówno natury zakaźnej, jak i niezakaźnej.

Etiologia. Wśród usposabniających czynników EZOZP duże znaczenie ma siara. Doświadczalnie wykazano, że zachorowalność jak również śmiertelność cieląt są tym większe, im niższa jest zawartość immunoglobulin (Ig) w ich surowicy; przy niskich wartościach Ig ryzyko śmiertelności może wzrastać nawet sześciokrotnie (2).

Ważną rolę w etiologii odgrywają czynniki stresowe takie jak transport, głodzenie, zmiana środowiska i pielęgnacji, nieprawidłowy mikroklimat pomieszczeń itp. Wraz ze wzrostem od-

ległości i czasu trwania transportu stwierdza się większą zachorowalność i śmiertelność. Zwiększają się również koszty leczenia i straty masy poszczególnych zwierząt (24). Stres aktywizuje przedni płat przysadki mózgowej do zwiększonego wydzielania ACTH, który stymuluje korę nadnerczy do sekrecji glikokortykoidów. Te z kolei wpływają immunosupresyjnie zarówno na odporność humoralną (zniesienie pierwotnej reakcji), jak również odporność komórkową. W tym ostatnim przypadku dochodzi do braku reakcji na czynniki pobudzające mitozę, do zahamowania migracji neutrofilów w kierunku zapalnego ogniska na skutek utraty adherencji, zniesienia enzymatycznej lizy bakterii pod wpływem neutrofilów i do obniżenia fagocytarnej i bakteriobójczej aktywności makrofagów. Immunosupresyjny wtórny wpływ stresu przejawia się także upośledzeniem wydalenia bakterii z górnych dróg oddechowych. Następuje wówczas namnażanie pastereli w jamie nosowo-gardłowej, ułatwienie ich adherencji i tworzenie się mikrokolonii w układzie oddechowym, szczególnie w płucach. Podobny efekt immunosupresyjny można uzyskać w przypadku reaktywacji i wydalania wirusów IBR pod wpływem steroidów jak również podania 3-metylandolu, mogącego powodować ostry obrzęk i rozedmę płuc („fog fever”), a powstającego w

*) Artykuł opracowano głównie na podstawie materiałów XIV Kongresu Chorób Bydła w Dublinie, Irlandia, 1986.08. 26—29.