

Przeciwciała swoiste dla *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u bydła mlecznego północno-wschodniej Polski*)

JOANNA SZTEYN, AGNIESZKA WISZNIEWSKA, MARIA MONIKA FUS-SZEWczyk

Zespół Higieny Produktów Zwierzęcych Katedry Ochrony Zdrowia Publicznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

Szteyn J., Wiszniewska A., Fus-Szewczyk M. M.

Antibodies specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cows in north-east Poland

Summary

A total of 495 samples from adult (> or = 2-year-old) dairy cattle in north-east Poland were tested for the presence of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using a commercial IDEXX, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The sampled animals came from 20 pre-selected herds. The seroprevalence was 25% at the herd level and 1.01% in the individual animal level. The changes in seropositive numbers were also traced in the infected herd for over a one year period from the time of detecting serodoubtful or seronegative samples. On account of the potential danger that infected animals pose, a program must be developed for combating paratuberculosis in Poland.

Keywords: paratuberculosis, dairy cows

Przeprowadzanie ukierunkowanych badań serologicznych w celu wykrycia zakażeń prątkiem *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) zwierząt daje podstawy do oceny istniejącego zagrożenia epizootycznego. Uzyskane wyniki mają szczególne znaczenie w przypadku chorób o długim okresie wylegania, takich jak choroba Johnego u bydła. Zwierzęta nie wykazujące objawów klinicznych choroby stanowią źródło zakażenia i powodują duże straty ekonomiczne, a surowce pozyskiwane od tych zwierząt mogą stanowić zagrożenie zdrowotne dla ludzi (4). Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE) umieścił paratuberkulozę na liście chorób objętych obowiązkiem zgłaszania. Zarejestrowane przez OIE przypadki dowodzą, że choroba ta występuje na wszystkich kontynentach w ponad siedemdziesięciu krajach. Rozprzestrzenienie się paratuberkulozy, jak sugerują badacze (3), jest prawdopodobnie wyższe niż podają to w raportach oficjalne władze. Powodów rozbieżności jest kilka – infekcja może być obecna w stadzie przez wiele lat i nie jest właściwie rozpoznana, kliniczne zmiany mogą być powikłane przez inne choroby, co utrudnia właściwą diagnozę, u bydła mlecznego dotychczas szczególną uwagę poświęcano takim zoonozom, jak gruźlica i brucelozą, nie we wszystkich krajach jest to jednostka chorobowa objęta obowiązkiem zgłaszania, implikacje powstałe na skutek zgłoszenia choroby mogą zniechęcać właścicieli stad do jej zgłaszania.

Ocena rzeczywistej sytuacji epizootycznej następuje zatem duże trudności, a fakt, że opublikowane wyniki badań pochodzą z różnych okresów i wykonane były z użyciem różnych technik trudności te potęguje. W Polsce przypadek paratuberkulozy u bydła, w okolicy Krakowa został opisany w 1970 r. (17). Znanne są także wyniki badań serologicznych przeprowadzonych u kóz (9) w latach dziewięćdziesiątych XX w. Wykazały one obecność przeciwciał u 2,5% zwierząt w 15,8% stad. Aktualnie brak jest danych na temat występowania i rozprzestrzenienia choroby u bydła. W sytuacji zagrożenia dla ludzi, jakie może stwarzać obecność prątka w mleku (11) oraz braku informacji na temat rozprzestrzenienia zakażenia w stadach bydła mlecznego istotne jest przeprowadzenie badań w tym kierunku.

Celem badań własnych było określenie częstości występowania, przeciwciał swoistych dla *Map* w stadach bydła mlecznego z północno-wschodnich terenów Polski oraz prześledzenie zmian w liczbie seroreagentów w stadach, w okresie roku od wykrycia odczynów seropozytywnych lub serowatpliwych.

Materiał i metody

Przed przystąpieniem do badań serologicznych, analizie poddano wyniki trzyletnich badań rutynowych w kierunku gruźlicy bydła z terenu województwa warmińsko-mazurskiego. W jej wyniku wytypowano stada bydła do badań serologicznych. Krew w wytypowanych stadach pobierano od zwierząt, które ukończyły drugi rok życia. Obecność

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr 6PO6K 035 20.

przeciwciał swoistych dla *Map* wykrywano w surowicy przy użyciu testu ELISA firmy IDEXX. Wykonanie testu oraz warunki inkubacji były zgodne z procedurą podaną przez producenta. Dla każdej serii surowic wykonywano równoległe badanie z kontrolnymi surowicami (Positive Control Serum, Negative Control Serum). Pierwszą serię badań wykonano w 2001 r. w 16 stadach bydła (329 próbek) i kontynuowano w następnym roku w 4 stadach (166 próbek). Ogółem przebadano 495 próbek surowicy krów mlecznych z 20 wybranych stad. Drugie badanie wykonano po 6 miesiącach i przeprowadzono je tylko w pięciu stadach, w których wcześniej stwierdzono odczyny seropozytywne i serowątliwe. Trzecie badanie, po upływie następnych 6 miesięcy, wykonane zostało w 3 stadach, w których zarówno w pierwszym, jak i drugim badaniu stwierdzono obecność przeciwciał swoistych dla *Map*.

Wyniki i omówienie

Analiza wyników trzyletnich badań rutynowych bydła w kierunku gruźlicy, przeprowadzanych przez służby weterynaryjne w latach 1997-2000, pozwoliła na wytypowanie stad do badań serologicznych. Wyniki testu tuberkulinowego z użyciem tuberkuliny ptasiej mogą pełnić pomocniczą rolę w diagnostyce paratuberkulozy ze względu na znaczne podobieństwo antygenowe *Mycobacterium avium subsp. avium* i *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Łącznie przeanalizowano wyniki próby śródskórnej porównawczej bydła z 17 powiatów województwa warmińsko-mazurskiego (tab. 1). Odsetek zwierząt reagujących dodatnio na tuberkulinę ptasią wynosił w 1998 r. 0,028, w r. 1999 0,047, a w 2000 r. 0,044. Występowanie odczynów skórnych dodatnich w stadzie było podstawą zakwalifikowania go do badań serologicznych. Zastosowany test ELISA firmy IDEXX dzięki wprowadzeniu fazy absorpcji próbki z *Mycobacterium phlei* zmniejsza możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych z innymi prątkami. W badaniach używano testów o różnej dacie produkcji z czym, według instrukcji producenta, związana była ocena. Wyniki badania surowicy krwi zwierząt testem ELISA zamieszczono w tab. 2. Badaną próbkę surowicy uznawano za dodatnią, jeśli stosunek S/P (sample-to-positive), gęstości optycznej, w serii I a był $\geq 0,15$, a ujemną jeśli stosunek S/P był $< 0,15$. W pozostałych seriach stosunek S/P pomiędzy 0,15 a 0,30 uznawano za wątpliwy, zaś $\geq 0,30$ za dodatni. Stado bydła uznawano za seronegatywne, jeśli wszystkie próbki surowicy uzyskały wynik ujemny w teście ELISA. Obecność przeciwciał swoistych dla *Map* stwierdzono ogółem u 1,010% bydła, w 25% stad poddanych badaniu serologicznemu po raz pierwszy. Drugie badanie wykazało 0,854% seroregantów dodatnich i 4,273% wykazujących odczyny wątpliwe spośród 234 przebadanych. W trzecim badaniu stwierdzono 1,990% wyników dodatnich 273% i 2,487% wątpliwych na ogólną liczbę 201 badanych.

Oficjalny raport OIE z 1997 r. odnotował wystąpienie więcej niż jednego przypadku paratuberkulozy

Tab. 1. Wyniki tuberkulinizacji bydła w woj. warmińsko-mazurskim w latach 1998-2000

Rok badania	Liczba sztuk bydła		
	poddana badaniu w kierunku gruźlicy	reagujących dodatnio na tuberkulinę	
		PPD bydłęcą	ptasią
1998	116 963	604	3341
1999	99 769	722	4861
2000	46 793	333	2095
RAZEM	263 525	1659	10 297

Tab. 2. Wyniki badań serologicznych surowicy bydła testem ELISA w kierunku *Map*

Nr badania (seria)	stad bydła, od których pobierano surowicę do badań	badanych próbek surowicy	Liczba próbek surowicy z wynikiem		
			dodatnim	wątpliwym	ujemnym
Ia	16	329	1	–	328
Ib	4	166	4	2	160
II	5	234	2	10	222
III	3	201	4	5	192
RAZEM		930	11	17	902

w ciągu pięciu lat poprzedzających ogłoszenie raportu w 25 spośród 40 krajów europejskich (12). Dokonując porównania raportów OIE z 1990 i 1998 r. wyraźnie widać wzrost liczby krajów europejskich, w których chorobę rejestrowano z dziewięciu w 1990 r. do dwudziestu czterech w 1998 r. (10). Badania serologiczne w kierunku obecności przeciwciał specyficznych dla *Map* przeprowadzono i nadal przeprowadza się w wielu krajach. Część z nich wykonywana jest w ramach opracowanych, krajowych programów zwalczania paratuberkulozy zwierząt. Porównanie jednak uzyskanych rezultatów z danymi literaturowymi nastręcza pewne trudności, które są wynikiem różnic w czułości i specyficzności testów stosowanych w różnych krajach oraz okresu, w którym były wykonywane. Ostatnio opublikowane wyniki badań 2997 próbek surowicy pobranej od krów mlecznych z wstępnie wytypowanych stad regionu Meklemburgii–Zachodniej Pomeranii, z użyciem testu Svanovir-ELISA, wykazały obecność przeciwciał przynajmniej w jednej próbce z 84,7% przebadanych stad (7). Podobne badania w losowo wybranych stadach bydła (556) w wieku powyżej 24 miesięcy (13 317) przeprowadzone w Belgii w latach 1997/1998, wykazały obecność przeciwciał u 2,9% sztuk w 18% stad (1). Znacznie wyższą obecność – 48,7% odnotowano na południu Belgii (8). W Austrii badania bydła dorosłego wykazały przeciwciała w 7% stad (6), a w Anglii i Walii w 17% (2). Ocena wstępna, będąca wynikiem badań 506 surowic krów w Grecji potwierdziła obecność przeciw-

ciał w 42 próbkach, tj. 8,3% (18). W 1998 r. procent uzyskanych wyników dodatnich po przeprowadzeniu badań metodami serologicznymi w stadach bydła w Holandii wynosił 55 (13), a w Norwegii 39,9 (5). Szczegółowe badania z użyciem różnych metod, nie tylko serologicznych nad występowaniem oraz dynamiką rozprzestrzeniania się paratuberkulozy u zwierząt prowadzono w Republice Czeskiej (15, 16). Z publikowanych informacji wynika, że w krajach europejskich procent stad bydła zakażonych *Map* wahał się od 7 do 55. Dane Departamentu Rolnictwa USA z 1996 r. wskazują, że stada bydła mlecznego były zarażone *Map* w 22%. Infekcja dotyczyła w podobnym stopniu wszystkich stanów. Ponadto występowanie odczynów dodatnich związane było z wielkością stada i w stadach liczących ponad 300 sztuk było wyższe i wynosiło 40%. W Australii, w odróżnieniu od USA procent pozytywnych odczynów serologicznych jest różny w różnych stanach. W południowo-wschodniej części, w stanie Victoria, liczba odczynów dodatnich wynosiła 22% a w Nowej Południowej Walii 9% (18).

W Polsce od lat oficjalnie nie zarejestrowano klinicznej postaci choroby Johnego u bydła. Zwierzęta importowane poddawane były w czasie kwarantanny, w ramach obowiązujących procedur, badaniu serologicznemu w kierunku paratuberkulozy i tylko te wykazujące brak przeciwciał w surowicy mogły zasilać rodzime stada. Stwierdzona, w badaniach własnych, obecność przeciwciał swoistych dla *Map* w stadach bydła mlecznego z terenu północno-wschodniej Polski, wskazuje na istniejące zagrożenie paratuberkulozą. Bydło mleczne, w którego surowicy stwierdzono przeciwciała może być źródłem zakażenia paratuberkulozą innych zwierząt, a mleko, w którym mogą być obecne prątki może stanowić źródło zakażenia człowieka.

Wnioski

1. Badania serologiczne potwierdzają występowanie paratuberkulozy w stadach bydła mlecznego w północno-wschodniej Polsce.

2. Przyczyną szerzenia się paratuberkulozy w stadach bydła jest brak właściwego rozpoznania choroby.

3. Celowe wydaje się opracowanie programu zwalczania paratuberkulozy w Polsce.

Piśmiennictwo

1. Boelaert F., Walravens K., Biront P., Vermeersch J. P., Berkvens, Godfried J.: Prevalence of paratuberculosis (John's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 2000, 77, 269-281
2. Cetinkaya B., Erdogan H. M., Morgan K. L.: Prevalence, incidence and geographical distribution of John's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet. Rec.* 1998, 143, 256-269.
3. Condron R.: Prevalence of John's disease and control measures in countries other than in Europe. *Abstr. IDF Brainstorming Session on Mycobacterium paratuberculosis.* Brussels 5-6 May 1999, s. 4-5.
4. Cywińska A., Baś M.: Czy paratuberkuloza jest zoonozą? *Życie Wet.* 2003, 78, 155-160.
5. Djonne B., Fredriksen B., Nyberg O., Sigurdardóttir M., Tharaldsen J.: National bovine paratuberculosis program in Norway. *Bull. IDF.* 2001, 364, 75-80.

6. Gasteiner J., Awad-Masalmeh M., Baumgartner W.: John's disease in Austrian cattle: diagnosis by faecal culture, PCR and ELISA and seroprevalence survey. *Sixth Internat. Colloq. Paratuberculosis.* Melbourne 14-18.02. 1999, s. 200.
7. Hacker U., Huttner K., Konow M.: Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 2004, 117, 140-144.
8. Haine D., Boelaert F., Pfeiffer D. U., Saegerman C., Lonneux J.-F., Losson B., Mintiens K.: Herd-level seroprevalence and risk-mapping of bovine hypodermosis in Belgian cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 2004, 65, 93-104.
9. Kaba J.: Analiza zagrożeń epizootycznych w populacji kóz hodowlanych w Polsce na przykładzie wybranych chorób zakaźnych. *Mat. Konferencji Nauk „Aktualny stan hodowli oraz kierunki użytkowania kóz w Polsce”.* Warszawa 12.12.1997, s. 117-123.
10. Kennedy D., Holmström A., Plym Forshell K., Vindel E., Suarez Fernandez G.: On - farm management of paratuberculosis (John's disease) in dairy herds. *Bull. IDF* 2001, 362, 18-31.
11. Lipiec M.: Paratuberkuloza jako zoonoza. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 191-194.
12. Manning E. J. B., Collins M. T.: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 2001, 20, 133-150.
13. Muskens J., Barkema H. W., Russchen E., van Mannen K., Schukken Y. H., Bakker D.: Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* 2000, 77, 253-261.
14. Nielsen S. S.: Prevalence of John's disease and control measures applied Europe. *Abstr. IDF Brainstorming Session on Mycobacterium paratuberculosis.* Brussels 5-6 May 1999, s. 6.
15. Pavlik I., Horvathova A., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Fixa B., Rychlik I.: Homogeneity/Heterogeneity of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis strains: correlation between RFLP-type and source (animal, environmental, human). *Sixth Internat. Colloq. Paratuberculosis.* Melbourne 14-18.02.1999, s. 321-329.
16. Pavlik I., Rozsypalova Z., Mattiova L., Machackova M., Fischer O., Valent L., Rajska D., Mracko I., Hirko M., Miskovic P.: Control of paratuberculosis in five cattle farms and the findings of new infected animals during 1990-2000. *Bull. IDF* 2001, 364, 56-59.
17. Ramisz A., Czakala S., Szańkowska Z., Hoffman H., Damm A., Zahaczewski J., Danileczuk K., Jaremski A.: Przypadek choroby Johnego u bydła na terenie województwa krakowskiego. *Medycyna Wet.* 1970, 26, 203-205.
18. Xylouri-Frangiadaki E.: Preliminary serological investigation of M. paratuberculosis in dairy herds in Greece. *Bull. IDF* 2001, 364, 69-70.

Adres autora: dr hab. Joanna Sztejn prof. UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn; e-mail: sztejn@uwm.edu.pl

TAYLOR V. J., CHENG Z., PUSHPAKUMARA P. G. A., BEEVER D. E., WATHES D. C.: Zależności pomiędzy poziomem podobnego do insuliny czynnika wzrostowego 1 w plazmie krów mlecznych a płodnością i wydajnością mleczną. (Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor – 1 in dairy cows and their fertility and milk yield). *Vet. Rec.* 155, 583-588, 2004 (19)

Badając krowy pierwiastki i wieloródki rasy holsztyńsko-fryzyjskiej określono zależność pomiędzy podobnym do insuliny czynnikiem wzrostu 1 (IGF-1) a płodnością i wydajnością mleczną. Poziom IGF-1 określono w odstępach tygodniowych na tydzień przed wycieleniem i 12 tyg. po wycieleniu w plazmie 177 krów wieloródek i czterokrotnie w tym czasie w plazmie 142 pierwiastek. Oznaczono też poziom IGF-1 w mleku 50 wieloródek. Poziom IGF-1 u pierwiastek był wyższy aniżeli u wieloródek. Niskie stężenie IGF-1 w plazmie wieloródek przed i po wycieleniu było związane z niemożnością zajścia w ciążę pomimo powtarzania inseminacji. Wieloródki o poziomie IGF-1 w plazmie na tydzień po porodzie wynoszącym powyżej 25 ng/ml 11 razy częściej zachodziły w ciążę po pierwszej inseminacji aniżeli krowy o niższym stężeniu IGF-1. W plazmie krów z wyższym szczytem wydajności mlecznej stężenie IGF-1 było niższe. Poziom IGF-1 w mleku nie zależał od poziomu IGF-1 w plazmie i od płodności.