

JACEK KUŹMAK

Enzootyczna białaczka bydła (EBB). II. Badania porównawcze surowicy krwi i mleka przy użyciu testów ID i ELISA

Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Próby zastosowania mleka jako materiału do badań serologicznych nie są nowe, bowiem postępowanie to uprzednio było stosowane przy rozpoznawaniu brucelozy bydła (8).

Badania Segera (16), Pipera i wsp. (15) oraz Forschnera i wsp. (6) dowiodły, że przeciwciała przeciw wirusowi EBB są wydzielane wraz z mlekiem. Wstępne badania nad określeniem wartości diagnostycznej przeciwciał w mleku podjęli Nougayrede i Gayot (14), którzy testem immunodiffuzji w żelu (ID) oznaczali je w serwatce mleka, mleku i surowicy krwi 111 krów oraz Grundboeck-Juško i Kuźmak (7), którzy tym samym testem oznaczali przeciwciała w mleku i surowicy krwi 232 krów. Powyższe badania wykazały, że badając mleko stwierdza się od 5 do 12 razy mniej dodatnich reagentów niż przy badaniu surowicy krwi. Ze względu na niską czułość metoda ta jest mało przydatna w badaniach. Obserwacje te zostały następnie potwierdzone w pracach polskich autorów: Steca i wsp. (17) oraz Klimentowskiego (9).

Zastosowanie w diagnostyce EBB immunoenzymatycznego testu ELISA i radioimmunologicznego (RIA), znacznie czulszych od metody ID, zwróciło uwagę na możliwość oznaczania przeciwciał w mleku i użycia go jako materiału do badań w rutynowej diagnostyce EBB. Swoiste przeciwciała oznaczano przeważnie testem ELISA (1, 2, 3), rzadziej testem RIA (4). Wysoka czułość testu ELISA pozwoliła oznaczać przeciwciała także w zbiorczych próbach mleka (11, 20). Przydatność takiego postępowania nie została jednoznacznie określona, jakkolwiek Toma i wsp. (19), badając 118 prób mleka zbiorczego wykazali, że metoda ta pozwala stwierdzić infekcję, gdy ilość zakaźnych zwierząt w stadzie waha się od 5 do 10%.

W prezentowanej pracy oceniono wartość diagnostyczną przeciwciał dla wirusa EBB w mleku poszczególnych krów, badanym testem ELISA, w porównaniu z rutynowo stosowaną metodą badania surowicy krwi testami ID i ELISA.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próby krwi i mleka pobrane od krów rasy ncb, w wieku od 3 do 11 lat, pochodzących z 5 stad: B, K, O, S, W. Wcześniej badania surowicy krwi tych zwierząt przeprowadzone na około 4–6 miesięcy przed pobraniem materiału, wykazały zróżnicowany stopień zakażenia, wyno-

szący od 18 do 40%. W chwili badania liczebność stad wahała się od 46 krów w stadzie S do 148 w stadzie O. Łącznie pobrano 307 prób krwi i mleka. Ze stada B pobrano 63 próby, ze stada K — 58, ze stada O — 90, ze stada S — 35 oraz ze stada W — 61 prób. Większość prób mleka była pobrana od krów znajdujących się w 2–4 miesiącu laktacji. Sposób uzyskiwania i postępowania z próbami krwi i mleka był analogiczny jak w pracy uprzednio prezentowanej. Mleko badano testem ELISA, a otrzymane wyniki konfrontowano z rezultatami badania surowicy krwi tych samych zwierząt, testami ID i ELISA.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań porównawczych surowicy krwi i mleka 307 krów z 5 stad. Badanie surowicy krwi testem ID wykazało w 130 (45,6%) przypadkach wynik dodatni, przy czym w zależności od stada, stopień zakażenia zwierząt wahał się od 34,4% do 68,5%. Badając mleko testem ELISA odczyn dodatni stwierdzono u 143 krów (46,6%).

Nie wszystkie wyniki dodatnie, które występowały w surowicy krwi zostały potwierdzone w mleku, bowiem u 9 krów przy dodatnim wyniku w surowicy otrzymano ujemny wynik w mleku. Odczyny takie występowały u zwierząt we wszystkich stadach, przy czym największą ich liczbę obserwowano w stadzie B. Ze 143 dodatnich prób mleka rezultaty nie pokrywające się z badaniem surowicy krwi obserwowano w 22 przypadkach. Rezultaty takie występowały w 4 stadach, przy czym liczba ich była od 2 do 5 razy większa, niż liczba rezultatów dodatnich w surowicy krwi i ujemnych w mleku. Łącznie na 307 badanych krów rezultaty rozbieżne w badaniu surowicy krwi i mleka obserwowano u 31 (10,1%) zwierząt.

W przypadku badania surowicy krwi testem ELISA (tab. 2), odczyn dodatni stwierdzono u 160 (52,1%) zwierząt. W mleku odczyn ten potwierdzono u 139 (45,2%) krów. Dodatni wynik badania surowicy krwi i ujemny mleka obserwowano łącznie u 21 zwierząt, najczęściej w stadzie W i O. U 4 krów badaniem surowicy krwi nie potwierdzono dodatniego wyniku badania mleka. Ogółem rozbieżne rezultaty między surowicą krwi a mlekiem wystąpiły u 25 (8,1%) zwierząt.

Z badań porównawczych wynika, że korzystniejsze rezultaty określające przydatność mleka jako materiału do badań uzyskano, gdy surowicę krwi badano testem ID. W tym przypadku liczba zwierząt reagujących dodatnio, określona w oparciu o badanie mleka, była tylko

Tab. 1. Porównanie wyników badania serologicznego surowicy krwi i mleka testami ID i ELISA

Stado zwierząt	Liczba	Mleko ELISA (+)		Mleko ELISA (-)	
		surowica krwi ID(+)	surowica krwi ID(-)	surowica krwi ID(+)	surowica krwi ID(-)
S	35	19	5	1	10
B	63	24	0	3	36
W	61	32	9	2	18
O	90	26	5	1	58
K	58	20	3	2	33
Ogółem	307	121	22	9	155

Tab. 2. Porównanie wyników badania serologicznego surowicy krwi i mleka testem ELISA

Stado	Liczba zwierząt	Mleko (+)		Mleko (-)	
		surowica krwi(+)	surowica krwi (-)	surowica krwi(+)	surowica krwi (-)
S	35	23	1	1	10
B	63	24	0	3	36
W	61	41	0	6	14
O	90	28	3	7	52
K	58	23	0	4	31
Ogółem	307	139	4	21	143

Tab. 3. Porównanie czułości różnych metod badania surowicy krwi i mleka Krów

Metoda	Liczba prób	Liczba odczynów		Względna czułość metody (%)
		dodatnich	ujemnych	
Surowica krwi ELISA	307	160 (52,1%)	147 (47,8%)	100
Mleko ELISA	307	143 (46,5%)	164 (53,5%)	89,4
Surowica krwi ID	307	130 (42,3%)	177 (57,7%)	81,2

o 1% większa od liczby zwierząt dodatnich, określonych badaniem surowicy krwi. W przypadku badania surowicy krwi metodą ELISA liczba zwierząt dodatnich była o 5,5% większa od liczby zwierząt, u których stwierdzono dodatni wynik w mleku. Podobną relację obserwowano, gdy dodatnie rezultaty badania surowicy krwi potwierdzono badaniem mleka. Rezultaty dodatnie potwierdzono w 93,1% (121/130), gdy surowicę krwi badano testem ID i w 86,8% (139/160), gdy badano ją testem ELISA.

Porównanie czułości stosowanych metod (tab. 3) wykazało, że badając surowicę krwi testem ID stwierdza się obecność przeciwciał u 130 zwierząt, co stanowi 80% czułości metody ELISA w surowicy krwi. Oznaczanie przeciwciał w

mleku pozwoliło stwierdzić odczyn dodatni u 143 zwierząt, co stanowi prawie 90% czułości metody ELISA w surowicy krwi.

Stosując do badania mleka czuły test ELISA należało przypuszczać, że liczba zwierząt posiadających przeciwciała będzie większa od liczby zwierząt posiadających je w surowicy krwi badanej testem ID. Przypuszczenia te zostały poparte rezultatami poprzednich badań, które wykazały, że miano przeciwciał w mleku jest 16 razy wyższe od miana w surowicy krwi badanej testem ID, oraz rezultatami prac innych autorów, porównujących badanie surowicy krwi testem ID z badaniem mleka testem ELISA. Behrens i wsp. (3) stosując test ID do badania surowicy krwi stwierdzili 76%, a stosując test ELISA w mleku 85% dodatnich rea-

gentów, w stosunku do 100% dodatnich w teście ELISA w surowicy krwi. Bauer i wsp. (2) otrzymali odpowiednio 90% i 98,8% dodatnich reagentów w teście ID w surowicy krwi i ELISA w mleku. Podobne rezultaty obserwowane były przez Bana i wsp. (1) oraz Manza i wsp. (12). Rezultaty badań własnych, w których test ELISA w mleku okazał się o 10% bardziej czuły niż ID w surowicy krwi, potwierdzają obserwacje cytowanych autorów. Różnią się natomiast od wyników Tomy i wsp. (19), którzy używając nawet rozcieńczonych prób mleka otrzymali o około 5% niższe rezultaty w porównaniu z badaniem surowicy krwi metodą ID. Na uwagę zasługuje fakt, że w badaniach własnych dodatnie rezultaty badania surowicy krwi tą metodą zostały potwierdzone badaniem mleka w 93%, co wskazuje, że metodę tę można uważać za alternatywną w stosunku do metody ID w surowicy krwi. Występowanie rezultatów różniących w badaniu mleka i surowicy krwi zostało potwierdzone przez niektórych autorów. Toma i wsp. (18), badając 387 krów, aż u 32 stwierdzili dodatnią reakcję w teście ID w surowicy krwi i ujemną w teście ELISA w mleku. Obserwowane w badaniach własnych różnice tłumaczyć można dużo większą czułością testu ELISA niż ID, uwarunkowaniami fizjologicznymi krów w okresie po porodzie — o czym pisano wcześniej, jak również łącząc z występowaniem nowych zakażeń w stadzie.

Przyjmując, że u zwierząt świeżo zakażonych miano przeciwciał w surowicy krwi jest stosunkowo niskie, miano w mleku — będące około 16 razy niższe — jest praktycznie niewykrywalne. Potwierdzeniem tego może być fakt, że największa liczba omawianych niezgodności w badaniu krwi i mleka występowała w stadach W i O, które były kilkakrotnie badane, a zwierzęta dodatnie eliminowane, względnie izolowane. Prawdopodobieństwo wystąpienia w tych stadach osobników świeżo zakażonych było więc duże. Nie można również wykluczyć udziału reakcji nieswoistych. Uwaga ta odnosi się do testu ELISA, którego nadczułość przy wykrywaniu swoistych dla wirusa EBB przeciwciał jest określana na 8—10%. Należy dodać, że wg niektórych autorów (5, 10, 21) stopień wykrywania dodatnich reagentów zależy od wieku zwierząt, struktury stada oraz formy i sposobu zwalczania choroby.

Prezentowane wyniki potwierdzają opinię Manza i wsp. (13), że metoda oznaczania przeciwciał w mleku testem ELISA przewyższa czułością metodę ich oznaczania testem ID w surowicy krwi, jest natomiast mniej czuła niż badanie surowicy krwi testem ELISA. Za oznaczaniem przeciwciał w mleku przemawia fakt, że pobieranie próbek mleka jest tańsze i prostsze niż krwi, a w fermach bydła mlecznego jest czynnością wykonywaną rutynowo. Eliminuje się przy tym pobieranie krwi, które jest bardziej pracochłonne i stwarza okazję do

rozprzestrzeniania wirusa. Inne argumenty to: obiektywna ocena wyników przy odczycie spektrofotometrycznym, automatyzacja czynności związanych z nastawieniem próby, możliwość zbadania dużej ilości prób w krótkim czasie. Za badaniem surowicy testem ID przemawiają takie argumenty jak: łatwość przygotowania reagentów, prosty sposób nastawienia i odczytu próby, wysoka swoistość, możliwość wykonania w każdych warunkach bez potrzeby posiadania odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego, co ma szczególne znaczenie w masowych akcjach rozpoznawczych. Należy zaznaczyć, że przepisy dotyczące diagnostyki EBB w większości państw oraz w skali międzynarodowej zalecają posługiwanie się testem ID.

Biorąc pod uwagę wszystkie te elementy w programie uwalniania stad zakażonych wirusem EBB, celowym wydaje się w pierwszym etapie akcji badanie surowicy krwi metodą ID, poszerzone o badanie siary i wydzieliny przedsiarowej z równoczesnym usuwaniem dodatnich reagentów. Alternatywnym postępowaniem byłoby badanie mleka poszczególnych krów testem ELISA, a także siary i wydzieliny przedsiarowej. Taki sposób postępowania pozwoliłby przeprowadzić badanie całych stad bydła mlecznego wyłącznie w oparciu o badanie wydzieliny gruczołu mlekowego. W końcowym etapie akcji należałoby zastosować czułą metodę ELISA w surowicy krwi celem ostatecznej weryfikacji wyników.

W wyborze metod postępowania nie bez znaczenia są względy ekonomiczne. Należy podkreślić, że jakkolwiek koszty laboratoryjne badania ELISA są prawie o 100% wyższe w stosunku do ID, to biorąc pod uwagę zużycie antygeny, przy wykorzystaniu tej samej masy wirusa i jego białek, uzyskiwanych z hodowli komórkowej, testem ELISA można zbadać od 20 do 25 razy więcej prób niż metodą ID.

Piśmiennictwo

1. Ban J., Zajac V., Altaner C., Cerny L.: Zentbl. Vet. Med. B. 29, 591, 1982.
2. Bauer Th., Weigand D., Manz D.: Dt. tierärztl. Wschr. 91, 313, 1984.
3. Behrens F., Ziegelmaier R., Forschner E., Manz D., Weigand D.: Cuur. Topics vet. Med. Animal Sci. 15, 173, 1982.
4. Bex F., Bruck C., Mammerickx M., Portetelle D., Ghysdael J., Cleuter Y.: Cancer Res. 39, 1118, 1979.
5. Ferdinand G. A. A., Langston A., Ruppen R., Drlica S.: Can. J. Comp. Med. 43, 173, 1979.
6. Forschner E., Ewald P., Keyserlingk-Ebertus W., Rottgen M., Seidler M. J.: Berl. Munch. tierärztl. Wschr. 3, 92, 3, 1979.
7. Grundboeck J., Kuźmak J.: Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin, 1983, 515.
8. Heck F. C., Williams J. D., Pruett J., Sanders R., Zink D. L.: Am. J. vet. Res. 41, 2082, 1980.
9. Klimentowski S.: Medycyna wet. 42, 342, 1986.
10. Mammerickx M.: Annis Med. vet. 126, 227, 1982.
11. Mammerickx M., Portetelle D., Burny A.: Zentbl. Vet. Med. B 32, 526, 1985.
12. Manz D.: Dt. tierärztl. Wschr. 88, 161, 1981.
13. Manz D., Weigand D., Behrens F., Ziegelmaier R.: Zentbl. Vet. Med. B 28, 280, 1981.
14. Nougayrede Ph., Gayot G.: Recl. Med. vet. 157, 283, 1981.
15. Piper C. E., Ferrer J. F., Abt D. A., Marshak R. R.: Natl. Cancer Inst. 62, 165, 1979.
16. Seger C. L., Morgan E.: Bovine Leukosis: various methods of molecular virology. CEC, Luxembourg, 1977, 267.
17. Stec J., Grundboeck J., Grundboeck M.: Medycyna wet. 41, 117, 1985.
18. Toma B., Crespeau F., Vuillaume A., Duret Ch., Chappuis G., Levy D., Parodi A. L.: Fifth Inter. Symp. on Bovine Leukosis, Tübingen, 1982, 400.

19. Toma B., Vuillaume A., Manet G., Duret Ch., Eloit M., Crespeau F., Chappuis G., Parodi A. L.: *Recl. Med. vet.* 160, 53, 1984.
20. Toma B., Vuillaume A., Prevost P., Duret C., Eliot M., Chappuis G., Parodi A. L.: *Annls Rech. vet.* 17, 73, 1986.
21. Wilesmith J. W., Straub O. C., Lorenz R. J.: *Res. vet. Sci.* 28, 10, 1980.

Adres autora: dr Jacek Kuźmak, ul. Kościuszki 12/4, 24-100 Puławy

Kuźmak J. — Энзоотический лейкоз скота. II. Сравнительные исследования сыворотки крови и молока с применением критериев ID и ELISA

Цель работы состояла в сравнительных исследованиях сыворотки крови, исследуемой критериями ID и ELISA, и молока, исследуемого критерием ELISA. Материал для исследований происходил от 307 коров, натурально зараженных вирусом энзоотического лейкоза скота, из 5 стад. В исследованиях молока положительную реакцию отмечено у 143 коров. В сыворотке крови, исследуемой критерием ELISA, противотела присутствовали у 160, а в критерии ID у 130 животных. Положительные результаты исследования крови критерием ID были в 93% (121/130) подтверждены исследованием молока. Когда сыворотка крови исследовалась методом ELISA, по-

ложительные результаты подтверждено исследованием молока в 81% (129/160). Исследования показали, что метод определения противотел в молоке критерием ELISA можно считать альтернативным относительно исследования сыворотки крови методом ID.

Kuźmak J. — *Enzootic bovine leukosis (EBL). II. Comparative examinations of blood and milk using the AGID and ELISA tests*

The examination were carried out using the material derived from 307 cows coming from 5 herds naturally infected with EBL virus. Positive reactions were found in the samples of milk of 143 cows. Positive seroconversion was stated by the ELISA in 160 and by immunodiffusion in 130 cows, respectively. The presence of specific antibodies in the sera tested by the AGID test were confirmed in 93% (121/130) using milk samples. When sera were tested by the ELISA positive results were also stated in milk samples in 129 per 160 examined (81%). The author suggests that milk examination by the ELISA gives to some extent comparable results with those obtained using serum samples and the AGID test.

ANDRZEJ RUDY

Wpływ zakażenia drobnoustrojami aparatów klujnikowych na stan zdrowotny brojlerów kurzych w pierwszych dniach życia

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Wrocławska 170, 45-836 Opole

W czasie klucia, transportu i odchovu pisklęta poddawane są działaniu różnych stresów, a najpoważniejszy stanowią zakażenia bakteryjne powodujące wysoką śmiertelność. Z badań Mazurkiewicz i wsp. (7) wynika, że wśród określonych przyczyn zejść śmiertelnych kurcząt w Polsce najczęstszy był udział chorób bakteryjnych 29,3—52,7%, a wśród nich zapalenie pępka i woreczka żółtkowego, kolibakterioza oraz salmoneloza. W świetle danych piśmiennictwa (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11) w warunkach chowu towarowego pisklęta wprowadzone do brojlerni stają się źródłem zanieczyszczenia mikrobiologicznego pomieszczeń. Badania Pietrzekiewicz (8) wykazują, że zapalenie pępka i woreczka żółtkowego stanowi 41,5% przyczyn padnięć w pierwszym tygodniu życia kurcząt brojlerów. Badania własne (10, 11) oraz Sautera i wsp. (14) wskazują, że od 2—5 dnia życia kurcząt brojlerów straty z powodu zapalenia pępka i woreczka żółtkowego wynoszą 75,4—80,1%, salmonelozę 1,7—3,2%, a aspergilozę od 1,3—1,9%, w zależności od warunków chowu. U padłych kurcząt wykazujących zapalenie pępka i woreczka żółtkowego Mazurkiewicz i wsp. (7) izolowali poza *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, urzęsione pałeczki *Salmonella* (8—14,8%), natomiast w badaniach włas-

nych (12) u kurcząt, których wiek nie przekraczał 5 dni życia odsetek zakażenia salmonelą wynosił 51,5% badanych piskląt.

Wysoki udział strat na tle zapalenia pępka i woreczka żółtkowego według Borzemskiej (3) może być warunkowany takimi czynnikami jak: niska wartość biologiczna jaj wylęgowych, niewłaściwa technologia lęgu, brak higieny w komorze klujnikowej oraz zaniechanie brakowania piskląt.

Celem niniejszej pracy była próba wykazania wpływu zakażenia bakteryjnego aparatów klujnikowych na stan zdrowotny kurcząt w pierwszych 5 dniach życia.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w Zakładach Wylęgu Drobiu w rejonie woj. opolskiego i objęto nimi 120 lęgów piskląt brojlerów kurzych. Badaniami objęto:

— stan sanitarny aparatów klujnikowych przed wstawieniem do klucia, określając ogólną liczbę bakterii i grzybów w 1 m³ powietrza (13) oraz liczbę bakterii i grzybów na 1 cm² powierzchni (4),

— stan sanitarny aparatów klujnikowych w chwili wyjmowania piskląt na podstawie zakażenia mikrobiologicznego powietrza. Badania wykonano metodą sedymentacji wg Gogoberidze oraz Jakubowskiej (cyt. 13). Poszczególne rodzaje drobnoustrojów zidentyfikowano w oparciu o metody podane w podręczniku