

GRZEGORZ TOMCZYK

Zastosowanie odczynu ELISA do diagnostyki zakażeń mykoplazmami u drobiu*

Zakład Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

ELISA in the diagnosis of mycoplasmal infections in poultry

The objective of the studies was development and use of a customized ELISA kit to diagnose mycoplasmal infections in poultry. The frozen strain of S-6 *M. gallisepticum*, concentrated and ultra-sounds processed, served as the antigen. The best extinction (OD) was noted with the antigen concentration of 100 µg/ml, sera diluted at 1:100 and conjugate diluted at 1:250. It was best to preserve antigen coated plates overnight at 4°C. The ELISA was used to detect specific anti-*M. gallisepticum* antibodies both in chickens experimentally infected and in hens and turkeys naturally infected with this microorganism.

Basing on the calculated value S/P it was possible to compare the sensitivity of the ELISA with an agglutination test (SPA) and a hemagglutination inhibition test (HI). The value of S/P for positive sera was more than 0.5, while for negative sera, below 0.5. The value of S/P in the ELISA for sera of chickens experimentally infected with high positive titres in HI (320 and 640) was more than 2.5, and for sera of HI titre 80 these values of S/P ranged from 1.0 to 1.5. The investigation of naturally infected birds showed that S/P in the ELISA test for sera of full agglutinating properties (3+) was more than 2.0, and for individual sera it was up to 3.5. However, weakly positive sera in the SPAS have a negative or slightly positive S/P value (from 0.5 to 1.0).

The ELISA test used to detect antibodies specific to *M. gallisepticum* proved to be more sensitive than the SPA and HI test.

Problem zakażeń mykoplazmami w hodowli drobiu pozostaje nadal aktualny. Mykoplazmozę dróg oddechowych kur (*mycoplasmosis gallinarum*) wywołuje *Mycoplasma gallisepticum* (MG). Zarazek ten może powodować również straty w stadach indyków i innych gatunków ptaków (12). Ostatnie dane piśmiennictwa wskazują, że schorzenie to, chociaż nie zawsze manifestujące się wyraźnymi objawami klinicznymi, powodować może znaczne straty ekonomiczne w produkcji drobiarskiej. Wielkość tych strat często warunkowana jest obecnością innych czynników zakaźnych jak wirusy i inne bakterie (3) przyłączających się w chwili wystąpienia w stadzie myko-

plazmozy. Ograniczenie strat powodowanych przez zakażenia mykoplazmami można osiągnąć poprzez eliminację ze stada nosicieli zarazka i utrzymanie stad rodzicielskich drobiu, wolnych od tych zakażeń (6, 7). Cel ten osiąga się między innymi poprzez monitoringowe badania serologiczne (eliminacja dodatnich seroreagentów) lub w oparciu o wyniki izolacji zarazka od ptaków.

Dotychczasowe metody diagnostyki mykoplazmozy polegające na izolacji samego zarazka są czasochłonne i następczą dużej trudności. Również stosowane dotychczas metody diagnostyki serologicznej jak: aglutynacja płytowa (rapid serum agglutination – RSA) oraz zahamowanie hemaglutynacji (haemagglutination inhibition – HAI), często nie pozwalają na wykrywanie obecności swoistych przeciwciał świadczących o zakażeniu, szczególnie w przypadku zakażeń utajonych. Odnosi się to także do tzw. zakażeń wczesnych ptaków, u których odczyn HAI użyty w pierwszych tygodniach po infekcji jest metodą o ograniczonej czułości (2) ze względu na wydłużony czas pojawiania się w organizmie zakażonych ptaków przeciwciał typu HI.

Podjęte w niniejszej pracy badania miały na celu zastosowanie w diagnostyce mykoplazmozy metody pozwalającej na szybkie rozpoznanie schorzenia. Oczekiwania te wydaje się spełniać test ELISA stosowany ze skutkiem w diagnostyce wirusologicznej chorób drobiu a ostatnio również w diagnostyce mykoplazmozy drobiu (1, 2, 5, 9, 11).

Materiał i metody

Antygeny. Do przygotowania antygeny użyto szczepu S-6 *Mycoplasma gallisepticum*. Szczep ten był kilkakrotnie klonowany na podłożach PPLO i serologicznie określony w obecności standardowej surowicy M-84 *M. gallisepticum*.

Antygen do testu ELISA. Szczep S-6 *M. gallisepticum* namnażano w zmodyfikowanym podłożu Freya. Do podstawowego bulionu dodawano trawioną pepsyną tkankę mięsa królika w ilości 0,5 g/l, NAD 0,1 g/l, 1 g cytrynianu sodu i 10 ml autolizatu drożdży. W celu zahamowania wzrostu bakterii saprofitycznych dodawano 0,5 g/l octanu talu i penicylinę 10 000 j.m./l. Jako źródło sterolu dodawano surowicę płodu bydłęcego lub końską w ilości 100 ml/lit podłoża. Pojedyncze kolonie (klony) mykoplazm uzyskane po uprzednim wysianiu liofilizatu szczepu S-6 na agar PPLO pobierano za pomocą mikropipety. Pobrane w ten sposób kolonie wysiewano na 5 ml podłoża płynnego (bulion Freya), które inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 37°C. Stanowiło to pulę macierzystą klonu mykoplazm. Po tym czasie całość hodowli bulionowej wysiewano na 150 ml świeżego podłoża tworząc w ten sposób tzw. pulę roboczą, którą inkubowano w poprzednio podanych warunkach. Z chwilą zauważenia zmiany zabarwienia podłoża świadczącym o wzroście mykoplazm wykonywano kolejny przesiew,

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 5-5863-91-02 finansowanego przez KBN

przenosząc całość hodowli do płaskodennych 250 ml kolb z podłożem bulionowym. Podłoża te inkubowano przez 72 godziny okresowo wstrząsając. Po tym czasie hodowla była zbierana w fazie późnej logarytmicznego wzrostu i poddawana wirowaniu w 10 000 obr/min. w temperaturze 4°C przez 30 min. Zebrany osad 3-krotnie przemywano w PBS (Dulbeco) pH 7,4, zawieszano w PBS w stosunku 1:9 wyjściowej objętości i poddawano działaniu ultradźwięków. Komórki mykoplazm rozbijano stosując dwa impulsy o natężeniu 20 kHz przez 2,5 minuty każdy (Ultrasonifikator MSE 7-70). Błony rozbitych komórek mykoplazm przepłukiwano w PBS i zawieszano do koncentracji 2,5 mg białka ogólnego w 1 ml.

Antygen do odczynu hemaglutynacji (HA). Antygen przygotowany w ten sposób, że 48-godzinna hodowla bulionowa szczepu S-6 zagęszczano 100-krotnie poprzez wirowanie (10 tys. obr/min. przez 45 min. w 4°C) i 3-krotnie przemywano w PBS. Uzyskany osad poddawano działaniu ultradźwięków (420 kHz 2 × 5 min.) i zawieszano w PBS. Uzyskany antygen wykazywał miano HA w zakresie od 160 do 320.

Surowice dodatnie i ujemna. Standardowe surowice dodatnie uzyskano poprzez immunizację kurcząt leżonych z jaj SPF (Lohman, Niemcy). Przed zakażeniem kurczęta przebadano testem aglutynacji płytowej w odstępie 2 tygodni na obecność przeciwciał przeciwko *M. gallisepticum* i *M. synoviae*. Zakażenia ptaków dokonano w wieku 5 tygodni, podając do dróg oddechowych 24-godzinna hodowla bulionowa szczepu S-6 *M. gallisepticum*, po 0,5 ml/ptaka, trzykrotnie w odstępie 3 dni. Po 12 dniach od ostatniego zakażenia ptaki przebadano ponownie testem aglutynacji płytowej (SPA) i hamowania hemaglutynacji (HI). Ptaki o mianach HI surowic 160 i powyżej oraz o mianach aglutynacyjnych 32 i powyżej wykrwawiano a surowice po odwirowaniu zamrażano w -20°C, w porcjach po 5 ml. Do testu ELISA jako kontrolną surowicę dodatnią używano pulę 4 surowic, której miano wynosiło 320. Jako kontrolę ujemną użyto surowicę kurcząt SPF wykrwawionych w wieku 3 tygodni, wcześniej przebadanych na obecność przeciwciał swoistych dla *M. gallisepticum* i *M. synoviae*.

Surowice kurcząt eksperymentalnie zakażonych. W badaniach użyto surowic 10 kurcząt SPF eksperymentalnie zakażonych w 28 dniu życia. Przed zakażeniem ptaki przebadano dwukrotnie w kierunku obecności przeciwciał *M. gallisepticum* i *M. synoviae*. Zakażenia dokonano do dróg oddechowych 24-godzinna hodowla bulionowa szczepu *M. gallisepticum*, wyosobnionego z przypadku klinicznej mykoplazmozy kurcząt brojlerów, w odstępach 3-dniowych, po 0,5 ml na ptaka. Po tygodniu od ostatniego zakażenia ptaki ponownie dokażano w ten sam sposób. Kurczęta wykrwawiano w 2 tygodnie od ostatniego zakażenia a zgromadzone surowice badano w odczynie hemaglutynacji.

Surowice kurze i indycze (ptaki naturalnie zakażone). Do badań użyto 36 surowic kurzych pochodzących ze stad kur naturalnie zakażonych *M. gallisepticum* (2 stada niosek, 3 stada brojlerów kurzych) oraz 29 surowic indyczych z 1 stada niosek i 4 stad brojlerów indyczych. Surowice te były dodatnie w odczynie aglutynacji płytowej.

Koniugat. W odczynie ELISA użyto koniugat zawierający frakcje IgG królicze skierowane przeciwko kurzym IgG, znakowane peroksydazą chrzanową (rabbit anti chicken IgG labeled with horseradish peroxidase enzyme HRP) typ IV firmy Sigma Chemical Co.

Substraty. W teście ELISA użyto dwa substraty firmy Sigma dla enzymu peroksydaza chrzanowa. Substrat ABTS zawierał 0,11 mg 3-etylobenzotiazolinsulfonianu w 1 ml 0,5 M buforu cytrynowego o pH 4,0, natomiast TMB (tetrametylobenzoidyna) przygotowano przez połączenie w równych objętościach koncentratu TMB z rozpuszczalnikiem. Obydwa substraty przed bezpośrednim użyciem były przetrzymywane w temperaturze pokojowej w warunkach zaciemnionych.

Bufor y. Używano 0,1 M bufor węglanowo-dwuwęglanowy CBB o pH 9,1; bufor ELISA-PBS o pH 7,4 z dodatkiem 0,05% Tweenu 20 (PBST); bufor cytrynowy o pH 4,0.

Płytki ELISA. Test wykonywano w mikropłytkach płaskodennych F-96 firmy NUNC.

Czytnik ELISA. Ekstynkcję mierzono w czytniku Sumal PE2 przy odpowiedniej długości fali: 405 nm dla substratu ABTS i 650 nm dla TMB.

Oznaczanie zawartości białka wg metody BCA mikro. Do dołków mikropłytki nanoszono po 10 µl kolejnych rozcieńczeń standardu białkowego BSA oraz badanego antygeny (ELISA) w trzech powtórzeniach. Następnie dodawano po 20 µl odczynnika BCA (Pierce). Po 30 minutach inkubacji w 37°C mierzono wartość ekstynkcji. Odczyt przeprowadzono w stosunku do próby ślepej zawierającej zamiast białka rozcieńczenie standardu. Stosowano długość fali 562 nm.

Odczyny serologiczne

Test ELISA. Obecność przeciwciał w surowicach badano pośrednią metodą ELISA. Płytki opłaszczano nanosząc po 100 µl/basenik odpowiednich rozcieńczeń antygeny. Absorbancję wykonano przez noc w temperaturze 37°C. Celem wysycenia miejsc niezwiązanych z antygenem, po przepłukaniu PBST, do dołków nanoszono po 100 µl roztworu BSA (10 mg w ml PBST). Przykryte płytki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie dołki opróżniano i przemywano 4-krotnie w PBST. Z kolei do dołków odmierzone po 100 µl surowic rozcieńczonych w buforze PBST. Każdą próbę surowicy badano w dwóch powtórzeniach. Płytki z nałożonymi surowicami inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po 4-krotnym przemyciu w PBST do dołków dodawano koniugat (po 100 µl) i płytki inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Po kolejnym płukaniu dodawano substrat dla enzymu (po 100 µl/basenik). Wynik reakcji odczytywano po 30 minutach inkubacji w 37°C, mierząc wartość ekstynkcji (OD) w czytniku ELISA.

Odczyn aglutynacji płytowej (SPA). Wykonano wg ogólnie przyjętych zasad. W badaniach surowic ptaków naturalnie zakażonych (kurzych i indyczych) stosowano komercyjne antygeny *M. gallisepticum* i *M. synoviae* (firmy Intervet) oraz antygen Mycognost (Biowet-Puławy). W ocenie stopnia reakcji surowicy z antygenem stosowano skalę 4-stopniową od „-” (brak aglutynacji) do „+++” (pełna aglutynacja występująca w ciągu 2 minut).

Odczyn hamowania hemaglutynacji (HI). Wykonano go znaną techniką wg Vardamana w badaniu surowic kurcząt doświadczalnie zakażonych. Miano HI 40 i powyżej uznawano za dodatnie.

Określenie optymalnych warunków wykonania testu ELISA i jego standaryzacja

Opracowanie optymalnych parametrów wykonania testu obejmowało określenie optymalnej koncentracji antygeny użytego do opłaszczania płytek, sposobu opłaszczania płytek, określenia optymalnych rozcieńczeń koniugatu i rodzaju użytego substratu.

Określenie optymalnej koncentracji antygeny. Płytki do testu ELISA opłaszczano antygenem (składniki białkowe błony komórkowej *M. gallisepticum*) w koncentracjach 10, 20, 40, 80, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml w objętości 100 µl na basenik. Do rozcieńczenia antygeny użyto 0,1 M bufor CBB o pH 6,0. Rozcieńczenie badanych surowic dodatnich i ujemnej wynosiło 1:100 a koniugatu 1:200.

Ustalenie optymalnych rozcieńczeń koniugatu. Aktywność enzymatyczną gammaglobuliny króliczej anty IgG kurcząt znakowanej enzymem peroksydaza chrzanowa (HRPO) badano w rozcieńczeniach dziesięciokrotnych od 1:10 do 1:1000.

Wpływ sposobu opłaszczania płytek na wartość ekstynkcji (OD). Opłaszczanie płytek przeprowadzono trzema sposobami: inkubację zakrytych płytek przez noc w temperaturze 4°C, inkubację przez noc w 37°C oraz inkubację w strumieniu ciepłego powietrza (szybkie wysuszenie).

Wpływ użytego substratu na wartość OD. Celem porównania różnic w wartościach OD badanych surowic stosowano dwa substraty ABTS i TMB. Jako stopera zatrzymującego reakcję barwną stosowano H₂O₂.

Sposób obliczania i interpretacji wyników testu ELISA. Wylczenie uzyskanych wyników (wartości OD) oparto na formule stosowanej w komercyjnych zestawach ELISA firmy IDEXX. Wylczano stosunek S/P wg wzoru:

$$\text{Współczynnik S/P} = \frac{S - N}{P - N}$$

gdzie: S – oznacza wartość OD surowicy badanej, P – wartość OD surowicy dodatniej, N – wartość OD surowicy ujemnej. Podstawione do wzoru wartości OD dawały średnią wartość powtórzeń (dwa powtórzenia). Równocześnie przyjęto zasadę interpretacji wyników, która wymagała, aby różnica pomiędzy średnią wartością OD surowicy dodatniej i surowicy ujemnej była wyższa od 0,075. Równocześnie OD surowicy ujemnej nie powinno przekraczać 0,150. Za wynik dodatni przyjmowano wartość współczynnika S/P > 0,5. Surowice o współczynniku niższym uznawano za ujemne.

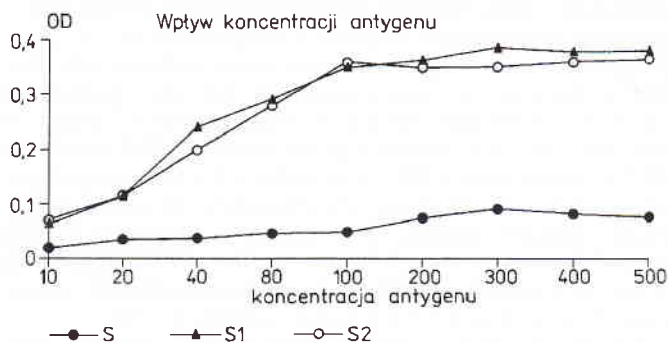
Czułość i swoistość odczynu ELISA. Dla porównania użyto odczynu HI (badanie surowic kurcząt doświadczalnie zakazanych) oraz SPA (w badaniu surowic ptaków zakazanych naturalnie).

Wyniki i omówienie

Przygotowany antygen dla testu ELISA z hodowli *M. gallisepticum* okazał się aktywny w reakcjach z surowicami dodatnimi. Sposób jego przygotowania polegający na rozbiciu komórek mykoplazm ultradźwiękami pozwolił uzyskać elementy błon komórkowych, które po odpowiednim wirowaniu i płukaniu doprowadzono do odpowiednich koncentracji określonej w stosunku do standardu białkowego. Ansari i wsp. (1) w pierwszych próbach zastosowania testu ELISA do diagnostyki mykoplazmozy stosowali antygeny zawierające całe komórki mykoplazm bądź też białkowe składniki błon komórkowych po trawieniu dwusiarczanem sodu (SDS).

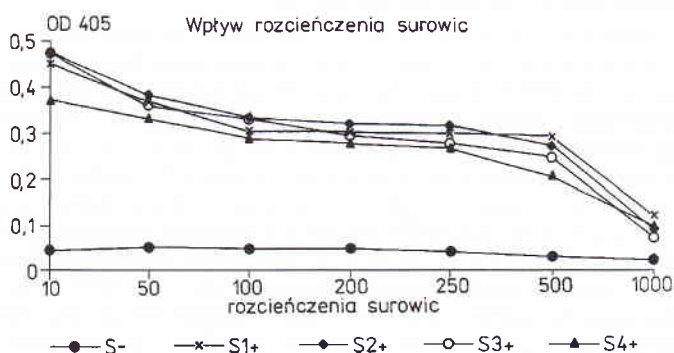
Wpływ koncentracji antygeny na wartość ekstynkcji w reakcji z surowicami dodatnimi i ujemną przedstawiono na ryc. 1. Najwyższe wartości OD dla dwóch surowic dodatnich uzyskano w najwyższej koncentracji antygeny, tj. 500 µg/ml, przy koncentracji 100 µg/ml wartości ekstynkcji były podobne jak przy koncentracjach antygeny w zakresie od 200 do 400 µg/ml, i nieznacznie tylko różniące się między sobą. Równocześnie przy tej koncentracji (100 µg/ml) wartość OD dla surowicy ujemnej była stabilna i nie przekraczała 0,050. Przy koncentracji antygeny powyżej 100 µg/ml wartość OD surowicy ujemnej wzrastała osiągając przy koncentracji 300 µg/ml 0,080. Ansarii i wsp. (1) najlepsze wyniki w teście ELISA uzyskali opłaszczając płytkę antygenem o koncentracji 90 i 180 µg/basenik.

Wykonane trzema sposobami próby opłaszczania płytek antygenem wykazały, że najlepszym sposobem jest opłaszczanie płytek przez noc w temperaturze 4°C, bowiem po zastosowaniu tego sposobu uzyskiwano stabilne wartości OD zarówno dla surowicy dodatniej jak i ujemnej. Nieco gorsze (mniej stabilne) wyniki uzyskiwano po opłaszczaniu płytek przez noc w temp. 37°C. Natomiast opłaszczanie płytek po-



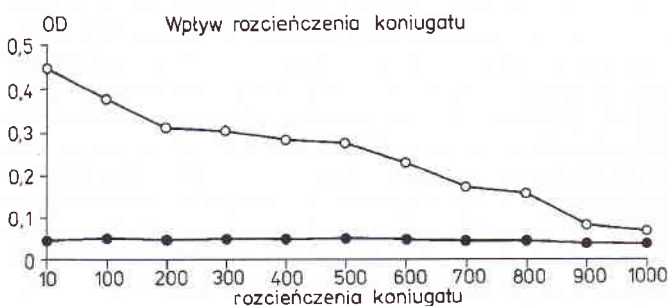
Ryc. 1. Test ELISA – Mg. Wpływ koncentracji antygeny na wartość ekstynkcji

Objaśnienia: * – koncentracja antygeny; S – surowica ujemna; S1, S2 – surowice dodatnie



Ryc. 2. Test ELISA – Mg. Wpływ rozcieńczenia surowic na wartość ekstynkcji

Objaśnienia: * – rozcieńczenia surowic; S – surowica ujemna; S1, S2, S3, S4 – surowice dodatnie



Ryc. 3. Test ELISA – Mg. Wpływ rozcieńczenia koniugatu na wartość ekstynkcji

Objaśnienia: * – rozcieńczenie koniugatu; S – surowica ujemna; S+ surowica dodatnia

przez szybkie wysuszenie w strumieniu ciepłego powietrza nie przynosiło oczekiwanych efektów, bowiem zarówno surowica dodatnia jak i ujemna przyjmowała niestabilne i bardzo niskie wartości, których nie można było uwidocznnić graficznie.

Przedstawione na ryc. 2 wyniki wskazują, że najwyższe wartości OD dla surowic dodatnich uzyskano w rozcieńczeniu 1:10. Równocześnie w rozcieńczeniu tym surowica ujemna zachowywała wartość OD poniżej 0,050. Wartość OD surowic dodatnich w zakresie rozcieńczenia od 1:10 do 1:100 spadała znacznie (o 0,100) i stabilizowała się w zakresie rozcieńczeń 1:100 do 1:250 (wartość OD w zakresie 0,262 do 0,311). Podobne wartości przyjmowały dwie surowice dodatnie S1 i S2 jeszcze w rozcieńczeniu 1:500 (0,287 i 0,268). Dopiero

Tab. 1. Wpływ użytego substratu na wartość OD w reakcji antygenu* *M. gallisepticum* z surowicami dodatnimi i ujemną

Surowica**	Wartość OD	
	ABTS	TMB
S-	0,041	0,069
S ₁ +	0,366	0,672
S ₂ +	0,387	0,694
S ₃ +	0,346	0,640

Objaśnienia: * – koncentracja antygenu 100 µg/ml, ** – rozcieńczenie surowic 1:100.

Tab. 2. Wartość ekstynkcji (OD) i współczynnika S/P surowic badanych testem ELISA w porównaniu z mianami HI tych surowic u kurcząt uodpornianych eksperymentalnie *M. gallisepticum*

Numery surowic	ELISA		HI
	OD	S/P	
1	0,335	1,07	80
2	0,502	1,50	80
3	1,054	3,12	640
4	0,369	1,11	80
5	0,848	2,52	640
6	0,673	2,00	160
7	0,983	2,91	320
8	1,285	3,80	640
9	0,548	1,64	160
10	1,067	3,16	640

Tab. 3. Wyniki badania surowic ptaków naturalnie zakażonych *M. gallisepticum*

ELISA S/P	SPA (liczba surowic)		
	+	++	+++
< 0,5	12*	17**	3
0,5–1,0	1	6	
1,0–1,5		4	2
1,5–2,0		2	6
2,0–2,5			2
2,5–3,0			4
3,0–3,5			3

Objaśnienia: * – surowice kurcze, ** – surowice indyckie.

w rozcieńczeniu 1:1000 jedna surowica dodatnia przyjmowała wartość 0,114, natomiast trzy pozostałe wykazywały wartość OD poniżej 0,1. Surowica ujemna we wszystkich rozcieńczeniach przyjmowała wartości poniżej 0,05 i wykazywała nieznaczny spadek wartości OD od rozcieńczenia 1:250 wzwyż.

Wpływ rozcieńczenia koniugatu na wartości ekstynkcji przedstawiono na ryc. 3. Płytkę opłaszczano 100 µg antygenu na basenik a surowicę dodatnią i ujemną rozcieńczano 1:100. Wartość OD dla surowicy dodatniej była najwyższa w roz-

cieńczeniach koniugatu 1:10 i wykazywała tendencję spadkową w miarę kolejnych rozcieńczeń. Najbardziej stabilne i przybliżone do siebie wyniki dla surowicy dodatniej stwierdzono w rozcieńczeniach koniugatu 1:200 i 1:300 (wartość OD odpowiednio 0,310 i 0,302), a także w rozcieńczeniu 1:400, 1:500 (0,279 i 0,270). Powyżej rozcieńczenia 1:500 wartości OD surowicy dodatniej wykazywały wyraźną tendencję spadkową przyjmując w rozcieńczeniu 1:1000 wartość przybliżoną do wartości surowicy ujemnej. Surowica ujemna wykazywała stabilne wartości OD niezależnie od użytego rozcieńczenia koniugatu i w żadnym z nich nie przekroczyła 0,05. Koniugat – frakcje IgG królicze antykurcze IgG znakowany peroksydazą chrzanową był ze skutkiem stosowany w teście ELISA przez innych autorów (8) zarówno do badania surowic kurzych jak również indyckich w zakażeniach mieszanych do wykrywania przeciwciał swoistych dla *M. gallisepticum* i wirusa zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy indyków (8), wirusa krwotocznego zapalenia jelit (4) u zakażonych indyków.

Uzyskane wyniki (tab. 1) wykazały, że substrat TMB dawał wyższe wartości OD zarówno dla surowic dodatnich jak i ujemnej. Średnia różnica pomiędzy wartościami OD surowic dodatnich przy użyciu TMB i ABTS wynosiła 0,3. Dla surowicy ujemnej różnica ta była mniejsza i wynosiła 0,028. Przy użyciu obydwu substratów możliwy był wizualny odczyt reakcji barwnej.

Wyniki badań w odczynie HI i ELISA surowic kurcząt zakażonych doświadczalnie *M. gallisepticum* zawarto w tab. 2. W badaniach własnych zarówno wartość OD jak i współczynnika S/P w teście ELISA korelowały z mianami HI dla surowic dodatnich. Surowice o mianie HI w zakresie od 80 do 160 przyjmowały wartość współczynnika S/P od 1,07 do 2,0. Zakres wartości OD wynosił dla tych surowic od 0,323 do 0,673. Surowice o wyższych mianach HI niż 160 przyjmowały również wyższe wartości S/P w zakresie od 2,52 do 3,80. W przypadku surowicy Nr 7 wartość S/P była wyższa przy mianie HI 320 niż surowicy Nr 5 (S/P 2,52 przy mianie HI 640). Talkington i wsp. (10) porównywał czułość obydwu odczynów i wykazał, że test ELISA jest bardziej czuły niż odczyn HI.

Badanie testem ELISA 36 surowic kurcząt i 29 surowic indyckich pochodzących z terenu wykonano dla porównania z wynikami odczynu aglutynacji płytowej (tab. 3). Surowice wykazujące w teście ELISA niskie (ujemne) wartości współczynnika S/P w odczynie aglutynacji były słabo dodatnie (+). Wynik taki uzyskano z 12 surowicami kurzymi i 17 surowicami indyckimi. Trzy inne surowice pochodzące od indyków wykazujące dodatni wynik w SPA (++) w teście ELISA były ujemne. Cztery surowice kurcze i dwie indyckie o wyniku w SPA (+++) również w ELISIE przyjmowały dodatnie wartości S/P w zakresie od 1,0 do 1,5. Najwięcej surowic o wysokiej wartości współczynnika S/P (zakres 1,5 do 2,0) dodatnich w teście ELISA było również dodatnich w odczynie SPA (+++). Surowice kurcze i indyckie o wysokich wartościach S/P (powyżej 2,0) w ELISIE dawały pełną aglutynację w odczynie SPA. Trzy surowice kurcze i jedna indycka o podobnym jak wyżej wyniku SPA (+++) w ELISIE przyjmowały bardzo wysokie wartości S/P (powyżej 3,0). Badania te wykazują, że test ELISA jest bardziej czuły i swoisty niż aglutynacja płytowa (SPA). Wyższą swoistość testu ELISA niż odczyn SPA potwierdzają badania Talkingtona i wsp. (10). Autorzy ci wykazali także, że opracowany test ELISA użyty do badania

surowic ptaków eksperymentalnie zakażonych pozwolił potwierdzić obecność swoistych dla użytego do zakażenia szczepu *M. gallisepticum* przeciwciał już w 7 dniu po infekcji. Natomiast przeciwciała typu HI wykrywane były dopiero powyżej 10 dnia po zakażeniu ptaków.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że opracowany test ELISA może być użyty do diagnostyki mykoplazmozy drobiu, pozwala bowiem wykrywać obecność swoistych dla *M. gallisepticum* przeciwciał w surowicach zakażonych ptaków.

Piśmiennictwo

1. Ansari A. A., Taylor R. F., Chang T. S.: Avian Dis. 27, 21, 1983.
2. Avakian A., Kleven S. H., Glisson J. R.: Avian Dis. 32, 262, 1988.
3. Carpenter T. E., Mallison E. T., Miller K. F., Gentry R. F., Schwartz L. D.: Avian Dis. 25, 404, 1981.

4. Davidson I., Aronovici A., Weisman I., Malkinson M.: Avian Dis. 29, 43, 1985.
5. Higgins P. A., Whithear K. G.: Avian Dis. 30, 160, 1986.
6. Kaszanyitzky E., Czifra G., Stipkovits L.: Acta Vet. Hung. 42, 69, 1994.
7. Laurimar F.: World Poultry 8, 64, 1992.
8. Naylor C. J., Al-Ankari A. R., Al-Afaleq A. I., Bradbury J. M., Jones R. C.: Avian Path. 21, 295, 1992.
9. Stipkovits L., Czifra G., Sundquist B.: Avian Path. 22, 481, 1993.
10. Talkington F. D., Kleven S. H., Brown J.: Avian Dis. 29, 53, 1985.
11. Tomczyk G., Minta Z.: Polish J. Immunol. 19, sup. 2, 62, 1994.
12. Yoder H. W. jr.: Diseases of Poultry. Iowa State University, Ames, 1991, s. 196-212.

Adres autora: lek. wet. Grzegorz Tomczyk, ul. Kościuszki 19/5, 24-100 Puławy

MARIA SZELAĞIEWICZ, RAJMUND SOKÓŁ, KATARZYNA GACA,
MARIUSZ MICHALSKI, MAMADOU BAH

Ocena zarobaczenia psów w Olsztynie

Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR-T, 10-957 Olsztyn-Kortowo

Summary

Verminous invasion in dogs of Olsztyn

The increasing number of dogs, including stray ones, was the reason for carrying out the pilot study on the extensiveness of verminous invasion in these animals in four central and 7 suburban quarters of Olsztyn. Fresh samples of faeces taken from 220 dogs, coming from 20 animals from each district, were examined for the presence of parasite eggs and segments of tapeworms and adults nematode forms. The studies revealed mainly the presence of nematodes and to a smaller degree the segments of *Diphylidium caninum* (1.3%). The extensiveness of parasite invasion commonly ranged from 10 to 45%. *Toxocara canis* occurred most frequently (11.8%). Moreover, eggs of *Ancylostomatidae* (2.7%), *Toxascaris leonina* (1.8%) and *Trichocephalus vulpis* (1.3%) were found.

One can conclude that due to their carrier state of parasites, dogs in towns and cities may constitute a potential health hazard for the inhabitants. This fact is all the more significant since only a small number of animals show clinical signs of infestation.

W Polsce obecnie chętnie kupuje się psy, zwłaszcza ras obronnych. Jednocześnie ciągle jeszcze wiele jest psów bezpańskich, przebywających często w okolicach przydomowych śmietników, a także w parkach miejskich. Obie te grupy mogą stanowić dla ludzi, szczególnie dla dzieci, zagrożenie chorobami pasożytniczymi. Fakt ten skłania parazytologów do kontrolowania stopnia zagrożenia ludzi inwazjami pasożytniczymi w aglomeracjach miejskich. W tym celu w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania kału wszystkich psów przyprowadzanych do klinik i przychodni weterynaryjnych (2, 3,

5, 6, 8, 11, 12), a także bada się kał pochodzący z terenu miast i osiedli podmiejskich (1, 4, 7, 9, 10). Badania te wykazały, że najpowszechniej występującymi pasożytami psów miejskich są: *Toxocara canis* (1-50%), *Ancylostoma caninum* (3-50%) i *Toxascaris leonina* (1,3-12%). Stwierdzano także jaja *Trichiuris vulpis*, przy czym ekstenzywność inwazji tego pasożyta wahała się w dość szerokich granicach od 0,1% do 20% (1, 13). Bardzo rzadko występują natomiast inwazje tasiemców i kapilarii. Jedynie Abo Sheada i wsp. (1) stwierdził obecność *Diphylidium caninum* u 19,8% i *Diphyllobothrium latum* u 1,5% psów, a Haralabidis i wsp. (5) w sporadycznych przypadkach wykrywali jaja przywry *Dicrocoelium dendriticum*.

Mając na uwadze stale zwiększającą się liczbę psów w miastach oraz możliwość zarażenia ludzi jajami *Toxocara canis* i *Echinococcus spp.* postanowiono przeprowadzić wstępne badania ekstenzywności zarobaczenia tych zwierząt na terenie Olsztyna i okalających go osiedli domków jednorodzinnych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w maju 1995 r. na 220 próbach świeżego kału psów zebranych w 11 dzielnicach Olsztyna (Centrum, Stare Miasto, Zatorze, Jaroty, Brzeziny, Dajtki, Kolonia Mazurska, Likusy, Słoneczny Stok, Słupy i Zielona Górka). Kał zbierano w godzinach rannych z ziemi w miejscach najczęstszego przebywania psów ze swoimi właścicielami, wzdłuż ścieżek w parkach, na skwerach, w pobliżu domów i placów zabaw dzieci, na chodnikach i najbliższej ich okolicy.

Kał poddano badaniu na obecność członów tasiemców i dorosłych postaci nicieni (oglądanie), a następnie przeprowadzono jego flotację i dekantację w celu wykrycia i identyfikacji jaj pasożytów. Użyty do badań kał pochodził od psów o nieznanym wieku, płci, rasie i kondycji.