

TADEUSZ MAJEWSKI, MARTA FIOŁKA, JOSE LUIS PIEDRA-VALVERDE,
MARIA TIETZE, PHOCAS MUKEZAMFURA

Przeciwciała *Mycoplasma agalactiae* w surowicy i mleku owiec

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin

Majewski T., Fiołka M., Piedra-Valverde J. L., Tietze M., Mukezamfura Ph.

Antibodies of *Mycoplasma agalactiae* in the blood plasma and milk of ewes

Summary

The ELISA test was used to detect antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in the blood plasma and milk of ewes belonging to Experimental Stations I and II of the Agricultural University in Lublin. The age of ewes was between 2-7 years and they were from the first to sixth lactation period of about 100 days duration. The ewes were free of infectious diseases and the blood and milk samples were taken in the 15th, 45th, and 75th days of lactation. For detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* the kit of Dr. Bommeli AG (Switzerland) and evaluation unit for ELISA of Magpol (Poland) were used. Of 76 ewes of group I, only in 4 appeared a higher level of antibodies against *M. agalactiae*, in comparison to negative control values, but this was significantly lower than the level of positive controls. In the samples of milk of group I the level of antibodies was in the range of negative controls, and only slightly increased in two cases, but not to the range indicating *M. agalactiae* infection. In the samples from 4 ewes belonging to group II, although the level of antibodies was higher than the negative control values it was still in a range much lower than positive control values. In the milk samples of 54 ewes from group II the level of antibodies was in the range of negative controls and slightly augmented in 17, but below the threshold indicating infection with *M. agalactiae*. The obtained results do not prove the presence of diseased state of udder caused by *M. agalactiae* in either group of ewes.

Mykoplazmy powodują zachorowania u zwierząt gospodarskich i drobiu, giną w temperaturze 50°C w ciągu 30 min., a w 60°C w czasie 5 min. W niskich temperaturach ich czas przeżywalności ulega wydłużeniu. Odznaczają się wrażliwością na niskie pH, detergenty, preparaty dezynfekcyjne i niektóre antybiotyki (1, 2, 15). Wykazują natomiast oporność na działanie penicyliny. Mykoplazmy są pozbawione ściany komórkowej i charakteryzują się polimorfizmem (2, 3, 13). Zewnętrzną osłonkę tworzy 3 warstwowa błona cytoplazmatyczna grubości 10 µm, zbudowana głównie z białek i lipidów. Mykoplazmy nie wytwarzają przetrwalników i nie wykazują ruchu (1, 8, 13, 14).

Stres, nieodpowiednie warunki środowiskowe, niedobory żywieniowe są czynnikami predysponującymi do występowania infekcji mykoplazmami u zwierząt. Miejscem zakażenia i ich namnażania jest układ oddechowy i moczowo-płciowy, skąd z krwią i limfą przenikają do stawów i gruczołu mlekowego wywołując *arthritis* i *mastitis* (1, 2, 5, 8, 10, 13, 14, 18).

Mycoplasma agalactiae obejmuje dwa gatunki: *M. agalactiae agalactiae* wywołująca bezmleczność u owiec i kóz i *M. agalactiae bovis* u krów (1, 2, 3, 4, 5, 14). Z badań Al-Breeda (1), Rapoporta (13) i Vechta (18) wynika, że mykoplazmy jako czynnik etiologiczny *mastitis subclinica* stanowią coraz

częstszą przyczynę zachorowań małych przeżuwaczy, dotyczących od 3 do 10% pogłowia, przy czym odsetek zachorowań jest wyższy u owiec niż u kóz (1, 2, 3, 5, 8). Stany zapalne gruczołu mlekowego o charakterze podklinicznym u owiec obejmują od 10-60% matek w stadzie (7). Dotychczasowe badania wykazały, że głównym czynnikiem etiologicznym *mastitis* u owiec były gronkowce i paciorkowce (7, 16).

Z uwagi na dość znaczny odsetek podklinicznych stanów zapalenia wymion istnieje konieczność podjęcia badań identyfikacyjnych w odniesieniu do innych czynników etiologicznych tego schorzenia u owiec. Może do nich należeć *Mycoplasma agalactiae*.

Mikrobiologiczne metody wykrywania obecności mykoplazm są trudne i wymagają warunków specyficznych. Ze względu na duże zróżnicowanie gatunków i szczepów brak jest uniwersalnej pożywki umożliwiającej ich wykrycie. Jedną z nowszych i precyzyjnych metod diagnostycznych, o dokładności wyników do 97,3%, jest test ELISA, polegający na oznaczaniu poziomu przeciwciał przeciwko *Mycoplasma agalactiae* z użyciem przeciwciał monoklonalnych związanych z enzymem (6, 9, 10, 15, 17).

Celem badań było określenie poziomu przeciwciał przeciwko *Mycoplasma agalactiae* testem ELI-

SA w mleku i surowicy krwi owiec z dwóch Stacji Doświadczalnych. Ten szybki, czuły i swoisty test może być wykorzystany do celów profilaktyki i diagnostyki chorób zakaźnych wywołanych przez *Mycoplasma agalactiae*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w dwóch (I i II) Stacjach Doświadczalnych Hodowli Owiec AR w Lublinie w 1996 r. Do badań pobierano mleko i surowicę krwi owiec ras: polskiej nizinnej, suffolk, berrichonne oraz ich mieszańców z różnym dolewem krwi F₁-50%, F₂-75% i F₃-87,5% owcy nizinnej. Owce w wieku od 2-7 lat były między pierwszą a szóstą laktacją. Stado było wolne od chorób zakaźnych i znajdowało się pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną.

Badania przeprowadzono w 15, 45 i 75 dniu laktacji trwającej 100 dni. Próby mleka pobierano po 6 godzinach od odłączenia jagniąt. Owce utrzymywane były na głębokiej ściółce, miały stały dostęp do wody. Żywienie było znormalizowane w oparciu o pasze własne, uzupełnione dodatkami mineralno-witaminowymi. Skład jakościowy i energetyczny dawki pokarmowej opracowany został w Zakładzie Hodowli Owiec i Kóz AR w Lublinie w oparciu o obowiązujące normy (17).

W czasie pobierania prób mleka i krwi oceniano zdrowotność gruczołu mlekowego badaniem klinicznym, zaś w tych samych próbach mleka określano liczbę komórek somatycznych metodą Prescott-Breeda oraz wykonywano badania mikrobiologiczne w kierunku wykluczenia lub potwierdzenia obecności *St. aureus* (11).

Przebadano 76 prób mleka i surowicy krwi owiec z I owczarni i odpowiednio 71 prób z drugiej. Mleko poddane testowi było pozbawione tłuszczu przez odwirowanie (10 000 rpm, 30 min.), a okres przetrzymywania go w temp. -18°C, podobnie jak surowicy, do momentu wykonania oznaczeń nie był dłuższy niż 14 dni.

Do wykrywania *Mycoplasma agalactiae* w mleku i surowicy użyto zestawu szwajcarskiej firmy Dr Bommeli AG oraz czytnika ELISA (prod. MAGPOL Wrocław).

Warunkiem wykonania testu jest przeprowadzenie badanej próby do roztworu wodnego. Surowicę krwi owiec rozcieńczano stukrotnie, a mleko dwukrotnie w rozpuszczalniku z zestawu analitycznego (EIA kit). Zarówno dodatnia jak i ujemna próba kontrolna, podobnie jak surowica krwi badanych owiec, były rozcieńczane 100-krotnie. Wartości absorbancji próby kontrolnej dodatniej obejmują wartości stężeń przeciwciał świadczących o występowaniu procesu chorobowego. Natomiast przedział absorbancji zakresu kontroli ujemnej obejmuje wartości niższe, dowodzące o jego braku. Różnice stężeń przeciwciał, charakterystycznych dla stanów chorobowych u poszczególnych grup badanych zwierząt wynikają z różnic poziomu antygenu *Mycoplasma agalactiae*. Czytnik ELISA mierzy wartość absorbancji zależną od natężenia barwy zielonej. Wszystkie wartości odczytywane są w odniesieniu do roztworu wzorcowego, którym wypełniony jest pierwszy rząd zagłębień każdej mikropłytki. Po dokonaniu odczytu przy użyciu filtru 405 nm i wykonaniu obliczeń dla każdej próby, uży-

kuje się wartości absorbancji, które mieszczą się w przedziale kontroli dodatniej, ujemnej lub między nimi. Ta ostatnia możliwość świadczy o podwyższonym poziomie przeciwciał przeciw *Mycoplasma agalactiae*, co jest sygnałem do podjęcia odpowiednich działań profilaktycznych.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzona ocena zdrowotności gruczołu mlekowego badaniami klinicznymi wymion oraz cytologicznymi i mikrobiologicznymi mleka wykazała u 20% owiec występowanie podklinicznych stanów zapalnych. Infekcje bakteryjne na tle gronkowcowym stanowiły tylko 0,5% wszystkich stanów podklinicznych, zaś zawartość komórek somatycznych wynosiła średnio 400 tys. w 1 cm³ wydzieliny. W związku z tym, autorzy podjęli badania nad obecnością *M. agalactiae* w surowicy krwi i w mleku jako czynnika etiologicznego *mastitis subclinica*.

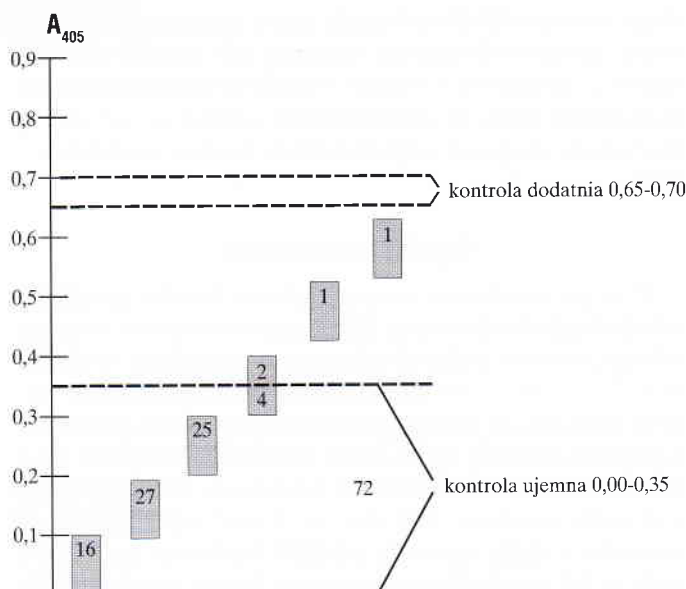
Badania diagnostyczne testem ELISA w wielu krajach są przeprowadzane powszechnie, a w przypadku białaczki i brucelozы należą nawet do badań urzędowych obok metod tradycyjnych (6, 9, 10, 15, 17). Test ELISA z mlekiem jest bezpieczną metodą alternatywną do stosowanego tradycyjnie odczynu seroneutralizacji.

Wartości ektynkcyj dla surowicy krwi owiec z I owczarni – proporcjonalne do poziomu przeciwciał przeciwko *Mycoplasma agalactiae*, mieściły się w przedziale 0,0-0,6. Kontrola dodatnia wykazywała wartości w zakresie 0,65-0,70, zaś kontrola ujemna w przedziale 0,00-0,35. W I owczarni na 76 owiec tylko u 4 poziom przeciwciał był znacznie podwyższony w porównaniu do kontroli ujemnej, jednak zdecydowanie różnił się od wartości dodatniej (ryc. 1). Natomiast w mleku owiec tej samej owczarni poziom ten kształtował się w zakresie kontroli ujemnej, a tylko w dwóch próbach był nieznacznie podwyższony, lecz nie na tyle by stwierdzić obecność *Mycoplasma agalactiae* (ryc. 2).

U owiec z II owczarni tylko u 4 sztuk stwierdzono nieznacznie podwyższony poziom przeciwciał w surowicy krwi, w porównaniu do kontroli ujemnej, przy znaczącej różnicy wobec kontroli dodatniej. Jedna próba o wartości absorbancji 0,131 nieznacznie przewyższała górny zakres przedziału kontroli wynoszącej 0,0-0,1, gdy próba dodatnia mieściła się w przedziale 0,40-0,45 (ryc. 3).

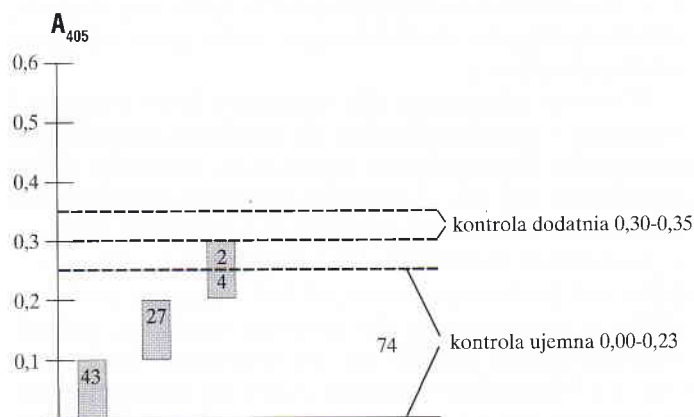
W próbach mleka od 54 owiec z II owczarni poziom przeciwciał mieścił się w zakresie wartości dla kontroli ujemnej, podczas gdy u 17 owiec był lekko podwyższony, lecz nie przekroczył progu krytycznego (ryc. 4).

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą braku wzrostu poziomu przeciwciał w mleku i surowicy krwi, które wskazywałyby na występowanie procesu chorobowego w gruczole mlekowym owiec. Obecność przeciwciał w mleku w kierunku *Mycoplasma agalactiae* wykazali również inni autorzy (2, 3, 5, 13, 14), przy czym zawartość przeciwciał w

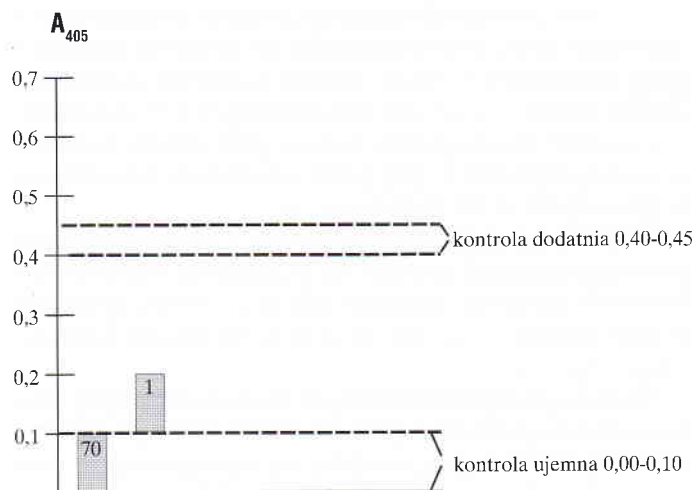


Ryc. 1. Wartość absorbancji prób kontrolnych i prób surowicy w badaniach testem ELISA w kierunku *M. agalactiae* u owiec z owczarni I

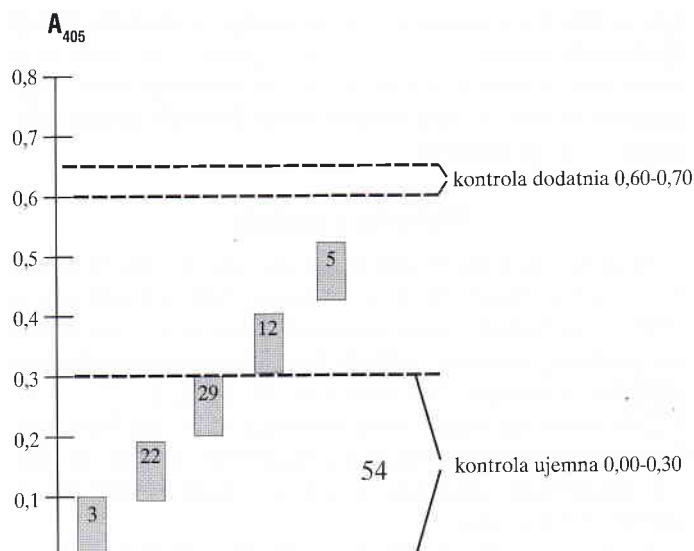
Objaśnienia: cyfry w prostokątach oznaczają liczebność matek, A – absorbancja.



Ryc. 2. Wartość absorbancji prób kontrolnych i prób mleka w badaniach testem ELISA w kierunku *M. agalactiae* u owiec z owczarni I



Ryc. 3. Wartość absorbancji prób kontrolnych i prób surowicy w badaniach testem ELISA w kierunku *M. agalactiae* u owiec z owczarni II



Ryc. 4. Wartość absorbancji prób kontrolnych i prób mleka w badaniach testem ELISA w kierunku *M. agalactiae* u owiec z owczarni II

mleku i surowicy wykazywała różnice, co potwierdzają również wyniki badań własnych.

Badania przeprowadzone nad występowaniem *Mycoplasma agalactiae* u owiec wykazały, że występujące u 20% matek stany podkliniczne *mastitis* miały inne podłoże etiologiczne. Ujemne wyniki badań serologicznych uzyskano w 95% prób surowicy i 97% prób mleka owiec I owczarni oraz w 98% prób surowicy i 76% prób mleka z II owczarni. Wysoka swoistość zastosowanego testu ELISA pozwala na szybkie i skuteczne postępowanie. Wyniki badań własnych wskazują na wysoką wartość diagnostyczną testu i uzasadniają jego użycie w rutynowej diagnostyce *mastitis subclinica*.

Piśmiennictwo

1. AL-Breed A. A.: Vet. Med. J. Giza 37, 233, 1989.
2. Banga J. S., Gupta P. P.: Indian J. Anim. Sci. 59, 681, 1989.
3. Bar-Moshe B., Rapoport E.: Isr. J. Med. Sci. 17, 537, 1987.
4. Gonzales R. N., Sears P. M., Wilson D. J., Mohammed H. O.: Proc. 3rd Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel 6, 68, 1995.
5. Hanga H. S.: Austr. Vet. J. 65, 361, 1988.
6. Klimentowski S., Rypuła K., Ziemiński R., Folwarczny J., Rułka J.: Medycyna Wet. 51, 85, 1995.
7. Krukowski H., Tietze M., Majewski T.: Proc. 3rd Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel 5, 73, 1995.
8. Nayak N. C.: Small Rum. Res. 5, 155, 1991.
9. Osek J., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 51, 337, 1995.
10. Otachel-Hawranek J., Korfanty E., Szachowski S., Erbert Ciszewski G., Jakubiak J.: Medycyna Wet. 51, 402, 1995.
11. Polska Norma: Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. PN-93/A-86034/13.
12. Rapoport E., Bar-Moshe B.: Internat. colloq. goat diseases. INRA, Niort, 1984, s. 83.
13. Rapoport E., Levisohn S.: Hung. J. Anim. Prod. Suppl. 1, 129, 1993.
14. Snoep J. J., Sampimon O. C., Bloemert J., Mei v.d.J.: Proc. 3rd Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel 2, 28, 1995.
15. Szulowski K., Piłaszek J., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 51, 607, 1995.
16. Tietze M., Majewski T., Szymanowska A.: Zesz. Nauk. PTZ 11, 53, 1993.
17. Ryś R.: Normy żywienia bydła i owiec systemem tradycyjnym. Instytut Zootechniki. Kraków, 1993.
18. Vecht U.: Proc. 3rd Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel 2, 3, 1995.

Adres autora: prof. dr hab. Tadeusz Majewski, ul. Lubartowska 9/3, 20-115 Lublin