

Status immunologiczny brojlerów kurzych w województwie lubelskim

WOJCIECH KOZDRUŃ, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, JERZY RZEDZICKI*, STANISŁAW TOKARZEWSKI*, MAŁGORZATA BOŚ*, HANNA CZEKAJ

Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Katedra Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Kozdruń W., Samorek-Salamonowicz E., Rzedzicki J., Tokarzewski S., Boś M., Czekaj H.
Evaluation of the immunological status of chicken broiler flocks in the Eastern Poland

Summary

In twenty broiler flocks the following antibodies against common viruses were evaluated: chicken anaemia (CAV), infection bursal disease (IBDV), infection bronchitis (IBV) and reoviruses. The antibodies against Marek's disease virus (MDV) were additionally examined. The presence of antibodies against CAV, IBDV and IB was determined by commercial ELISA kits and against reoviruses by ELISA performed according to the modified method of Slaughter. The antibodies against CAV occurred in 7 flocks, the percentage of positive sera was 5% to 22%. All the sera showed the presence of IBDV antibodies. The antibodies against IBV were found in 5 flocks. In 7 flocks 80% of sera were positive. The antibodies against reoviruses were found in 90% of the flocks examined. All sera were positive in 8 flocks and negative in 2 flocks. In 6 flocks antibodies against MDV were found in 5% to 40% of the chickens.

Keywords: serological monitoring, ELISA test, chicken anaemia virus (CAV), infection bursal disease virus (IBDV), infection bronchitis virus (IB), reovirus, Marek's disease virus (MDV).

W wielkostadnej produkcji drobiarskiej ocena stanu zdrowotnego stada ptaków ma istotne znaczenie. Znajomość sytuacji epizootycznej jest niezbędna do prowadzenia właściwej immunoprofilaktyki. W ostatnim okresie coraz częściej importuje się ptaki z zagranicy, nierzadko z obszarów o nieznanym statusie immunologicznym, co pociąga za sobą ryzyko wystąpienia chorób zakaźnych, padnięć i strat gospodarczych.

Monitoring serologiczny czyli okresowe badanie surowic ptaków danego stada w celu określenia obecności swoistych przeciwciał przeciwko czynnikom zakaźnym drobiu, pozwala ocenić poziom przeciwciał matczynych, określić skuteczność podanej szczepionki, ocenić stan zdrowotny danego stada, jak również ułożyć odpowiedni kalendarz szczepień i racjonalnie skorygować programy profilaktyczne. Na podstawie otrzymanych wyników można rozpoznać chorobę i określić stan zagrożenia epidemiologicznego stada, a nawet obszaru, na którym jest położona ferma. Stosowanie monitoringu serologicznego ma więc na celu optymalizację produkcji i poprawę wyników ekonomicznych, czyli zwiększenie opłacalności hodowli drobiu.

W monitoringu stosowany jest test immunoenzymatyczny ELISA. Charakteryzuje się on dużą swoistością, czułością i powtarzalnością, a ponadto jest łatwy

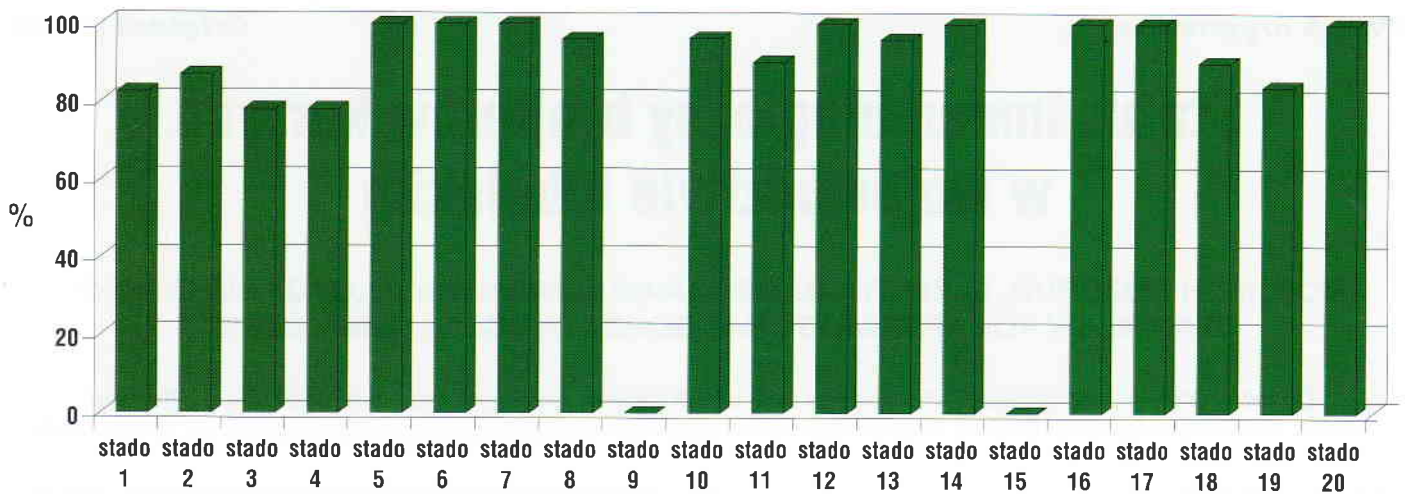
do wykonania. Dodatkowym plusem jest fakt, że przy zastosowaniu odpowiedniego programu komputerowego możliwa jest szybka analiza uzyskanych wyników.

Celem badań była ocena sytuacji epizootycznej w stadach brojlerów kurzych na terenie województwa lubelskiego.

Materiał i metody

Surowice. Badania przeprowadzono w 20 stadach brojlerów kurzych rasy Lohman i Arbor Acres w wieku 5,5-8 tygodni dostarczonych do Lubelskich Zakładów Drobiarskich. Liczebność stad wynosiła od 7 do 26 tysięcy ptaków w stadzie. Brojlery były szczepione przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli i zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza. Z każdego stada pobrano losowo 23 próbki krwi. Łącznie pobrano 460 próbek. Krew wirowano, a uzyskane surowice inaktywowano w 56°C przez 30 minut i następnie przechowywano w temp. -20°C.

Odczyn immunodyszki w żelu agarowym (AGID). Odczyn wykonywano w celu wykrycia w surowicach ptaków precypityn przeciwko wirusowi choroby Mareka (MDV). Przeprowadzono go mikrometodą, stosując 1,5% żel agarowy przygotowany w 8% roztworze NaCl. W żelu agarowym o grubości 0,5 mm wycinano rozetki o średnicy baseników 4 mm. Do basenika centralnego nakraplano antygen uzyskany poprzez oczyszczenie zjadliwego szczepu wirusa choroby Mareka, namnażającego się w folikulach



Ryc. 1. Odsetek surowic dodatnich w kierunku Reo w teście ELISA

piór zakażonych ptaków. Do baseników położonych wokół basenika centralnego nanoszono badane surowice. Kontrolę stanowiła rozetka z surowicami standardowymi: dodatnią i ujemną. Za wynik dodatni uznawano obecność linii precipitacyjnych pomiędzy basenikiem centralnym z antygenem a basenikiem z badaną surowicą po 24-48 h inkubacji w temperaturze pokojowej.

Test immunoenzymatyczny ELISA przeciwko reowirusom. Test wykonywano według metody podanej przez Slaughter i wsp. (9) w modyfikacji własnej. Antygen do testu stanowił standardowy szczep S1133 reowirusa namnożony w hodowli fibroblastów zarodka kurzego (CEF). Jego miano wynosiło $10^{5,83}$ TCID₅₀ w 0,1 ml. Test wykonywano w 96 basenikowych płytkach Nunclon. Na powierzchnię baseników nanoszono antygen wirusowy zawieszony w wodzie dejonizowanej w ilości 0,3 µg białka/basenik. Płytki pozostawiano do wyschnięcia w 37°C przez 18 h, po czym umieszczano je w temperaturze -20°C. Bezpośrednio przed użyciem w celu redukcji reakcji niespecyficznych do baseników rozlewano roztwór albuminy surowicy bydźlej (2,0 mg/basenik). Płytki inkubowano przez 1 h w 37°C. Po tym czasie płytki płukano 4-krotnie roztworem PBST (PBS + Tween 20) i dodawano inaktywowane surowice rozcieńczone 1/100 w PBST. Na każdą surowicę przeznaczano po 3 baseniki. Płytki z surowicami inkubowano 1 h w 37°C i płukano jak poprzednio. Następnie dodawano koniugat (IgG królika anty IgG kury) znakowany peroksydazą chrzanową (Sigma) i rozcieńczony 1/8000 w PBST. Płytki inkubowano i płukano jak poprzednio. Jako substratu używano ABTS. Wyniki reakcji barwnej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 405 nm, uznając za wynik dodatni wartość OD (gęstość optyczna) powyżej 0,200. Test ELISA przeprowadzano w objętości 100 µl poszczególnych reagentów.

Zestaw komercyjny ELISA (IDEEX). Zestawem tym wykrywano przeciwciała przeciwko wirusowi zakaźnego zapalenia oskrzeli, wirusowi anemii zakaźnej oraz wirusowi zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza. Zawierał on gotowe opłaszczone odpowiednim antygenem 96 basenikowe mikropłytki. Badane surowice rozcieńczano w rozcieńczalniku (bufor ze stabilizatorem białkowym w stosunku 1:500). Koniugat stanowiła gamma globulina kozia skierowana przeciwko gamma globulinom kurzym znakowana

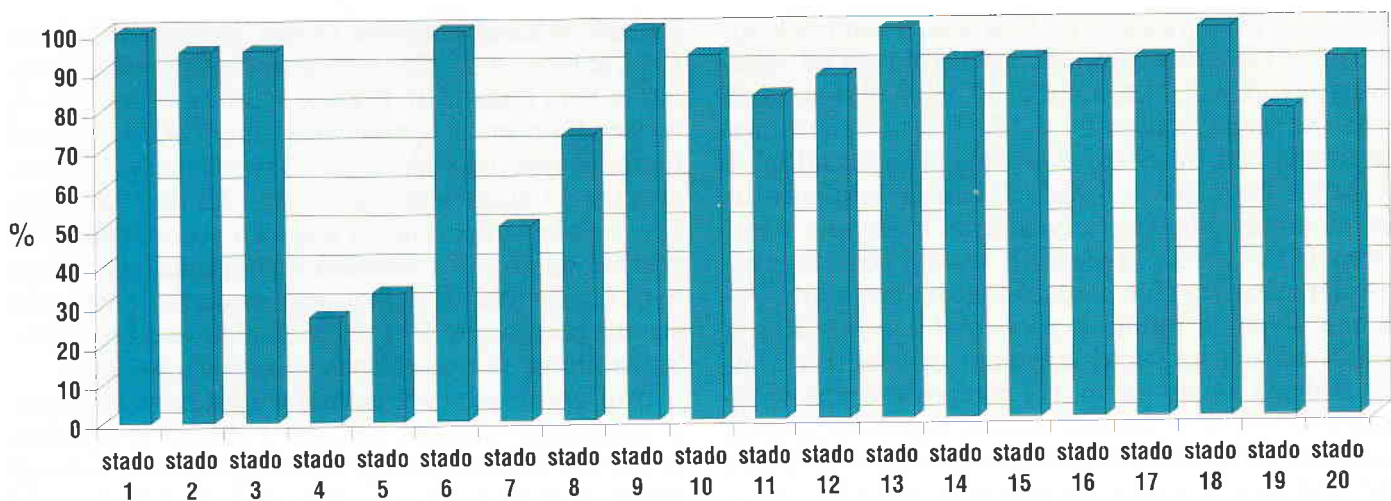
peroksydazą chrzanową. Jako substratu używano TMB (chromogen) rozcieńczonego w stosunku 1:1 w buforze fosforanowym z dodatkiem nadtlenku wodoru. Reakcję barwną zatrzymywano 0,12% roztworem kwasu fluorowodorowego. Wynik reakcji barwnej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 650 nm. Za wynik dodatni uznawano wartość ilorazu S/N (surowica badana/surowica ujemna) w przypadku przeciwciał przeciwko CAV poniżej 0,60, natomiast w przypadku przeciwciał przeciwko IBV i IBDV powyżej 0,2.

Wyniki i omówienie

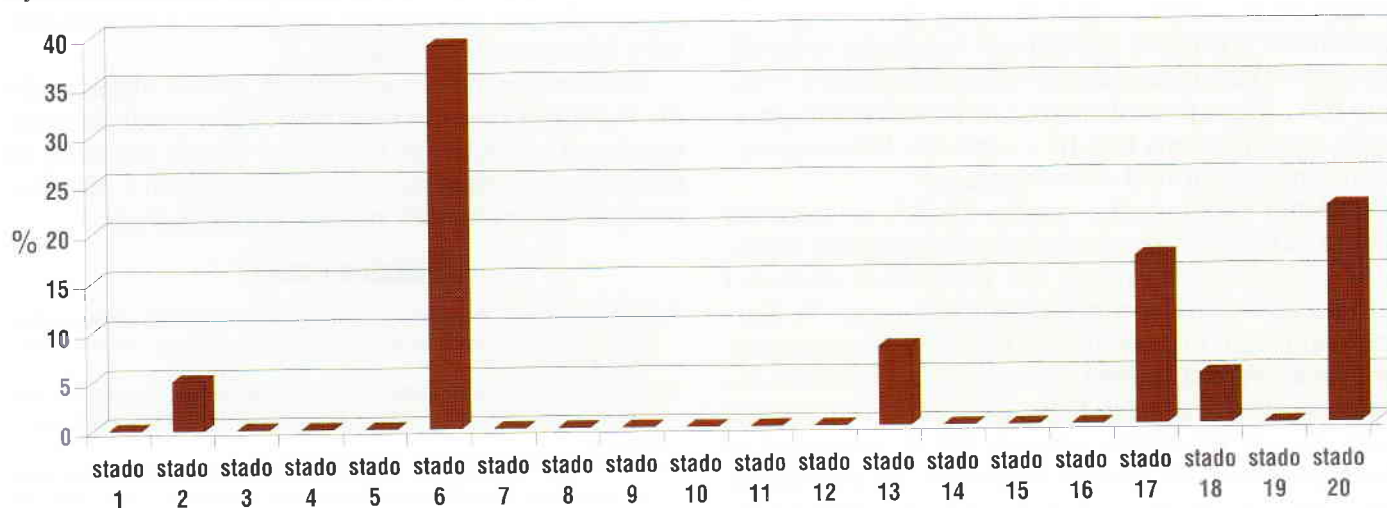
Status immunologiczny i epidemiologiczny u brojlerów ocenia się dwukrotnie: w pierwszych dniach życia, a następnie przed ubojem. Określa się poziom przeciwciał przeciwko wirusowi anemii zakaźnej (CAV), wirusowi zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (IBDV), wirusowi zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV) oraz zakażeniom reowirusowym.

W ostatnim czasie wykazano w Polsce powszechne zakażenie stad brojlerów reowirusami (4, 6, 13). Badanie w kierunku zakażenia reowirusami przedstawiono na ryc. 1. Obecność przeciwciał stwierdzono w 90% badanych stad. W ośmiu stadach wszystkie badane surowice były seropozytywne. W dziesięciu stadach odsetek dodatnich reakcji wynosił 80-90%. Wartości OD były wysokie i wahały się w granicach od 0,400 do 0,650. Jedynie dwa stada były seronegatywne.

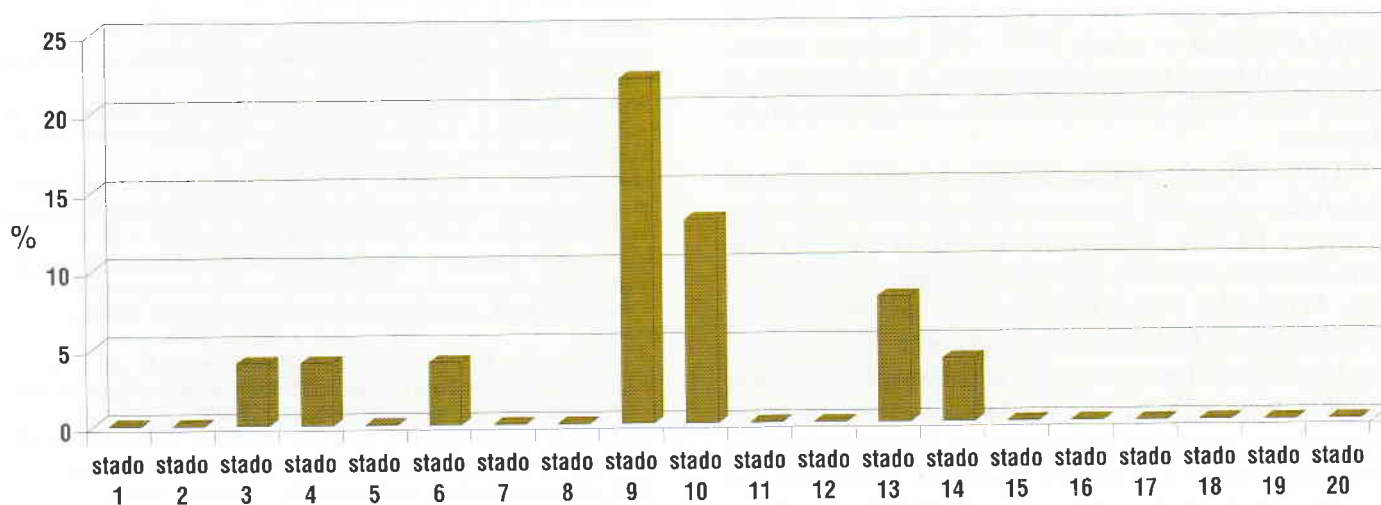
Zakażenia reowirusami mogą przebiegać bezobjawowo, mogą być przyczyną zahamowania przyrostów i gorszego wykorzystania paszy, a także przyczyną znacznych padnięć (8). Pierwsze badania serologiczne przeprowadzone przez Karczewskiego i wsp. w 1983 r. (3) wykazały obecność przeciwciał przeciwko reowirusom w 19,2% stad reprodukcyjnych. W następnych latach liczba seropozytywnych stad stopniowo wzrastała. W 1998 r. liczba zakażonych stad wynosiła prawie 100% (10, 13). Z przeprowadzonych badań wynika, że w województwie lubelskim odsetek zakażonych stad jest bardzo wysoki i nie odbiega od sytuacji epizootycznej w kraju.



Ryc. 2. Odsetek surowic dodatnich w kierunku IBV w teście ELISA



Ryc. 3. Odsetek surowic dodatnich w kierunku MDV w teście AGID



Ryc. 4. Odsetek surowic dodatnich w kierunku CAV w teście ELISA

Ostatnio także coraz częściej notuje się przypadki zakażenia ptaków wirusem zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV). Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na ryc. 2. We wszystkich stadach wykazano obecność przeciwciał przeciwko IBV. W pięciu stadach wszystkie badane surowice były dodatnie. W siedmiu stadach ponad 80% surowic było seropozytywnych, a

tylko w trzech stadach obecność przeciwciał stwierdzano w 30-50% surowic. Uzyskane średnie wartości OD surowic były wysokie i wahały się od 0,150 do 0,450. Należy przypuszczać, że obecne w surowicach ptaków przeciwciała są przeciwciałami poszczepionymi, przeciwciała matczyne zanikają w drugim tygodniu życia ptaków. W badaniach terenowych Karczew-

ski i wsp. (3) wykazali, że 53,8% stad reprodukcyjnych kur kierunku mięsnego było wolnych od zakażeń tym wirusem. Natomiast w 30,8% stad stwierdzili niskie miana przeciwciał, a w 15,4% stad średnie miana przeciwciał. W 1992 r. Koncicki (4) wykazał zakażenie wirusem IBV w 4 stadach kurcząt brojlerów na terenie województwa olsztyńskiego. Następnie Minta i wsp. (6) w 1996 r. stwierdzili wysoki poziom przeciwciał matczynych w stadach kurcząt brojlerów. Podobne wysokie miana przeciwciał zanotowano w trzech stadach nie szczepionych przeciwko IBV. Dalsze badania Minty i wsp. (7) przeprowadzone w latach 1997-1998 w sześciu stadach reprodukcyjnych, wykazały wysoki poziom przeciwciał matczynych anty IBV. Odsetek wyników dodatnich wynosił 95-100%. Po zastosowaniu pełnego programu profilaktycznego obserwowano 100% serokonwersję po szczepieniu przeciwko wirusowi zakaźnego zapalenia oskrzeli. Dane te wskazują na znaczne zakażenie ptaków wirusem IBV. Z tego powodu notuje się bardzo częste przypadki występowania tzw. IB – *nephritis*, które są przyczyną znacznych strat ekonomicznych.

Badania serologiczne testem ELISA w kierunku wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza wykazało obecność przeciwciał we wszystkich stadach i seropozytywne były wszystkie surowice (ryc. 3). Karczewski i wsp. (3) zanotowali w 53,8% nie szczepionych stad wysoki stopień zakażenia stad wirusem zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (IBDV). Z kolei Koncicki (4) zakażenie wirusem IBDV stwierdził w dziesięciu stadach kurcząt brojlerów województwa olsztyńskiego. Badania przeprowadzone przez Mintę i wsp. (6) w 1996 r. wykazały wysoki poziom przeciwciał matczynych u kurcząt brojlerów. Podobne wyniki otrzymał w latach 1997-1998 badając serologicznie ptaki stad reprodukcyjnych (7). Niewątpliwie wpływ na to mają przeprowadzane szczepienia profilaktyczne.

Na ryc. 4 przedstawiono występowanie przeciwciał przeciwko wirusowi anemii zakaźnej (CAV) określone testem ELISA. Występowały one w siedmiu stadach. Odsetek surowic dodatnich wahał się od 5% do 22%. Wieliczko i wsp. (12) badając siedem ferm reprodukcyjnych kierunku mięsnego oraz 17 ferm kurcząt brojlerów, obecność przeciwciał anty CAV wykazała w surowicach kur we wszystkich stadach reprodukcyjnych, zaś tylko w dziewięciu fermach (53,0%) u kurcząt rzeźnych. Odsetek wyników dodatnich był wyższy w stadach reprodukcyjnych (94,3%), podczas gdy u brojlerów wynosił około 66%. Minta i wsp. (6) w 1996 r. wykazali wysoki poziom przeciwciał anty CAV w surowicy 1 dniowych piskląt. Stosując program profilaktyczny w stadach reprodukcyjnych zapobiega się pionowemu przekazywaniu wirusa na potomstwo przez nioski zakażone w okresie produkcji. U potomstwa obserwuje się 100% serokonwersję (11). Dren i wsp. (1) badali 13 stad reprodukcyjnych kierunku mięsnego oraz 9 stad brojlerów. We wszystkich

stadach wykazali obecność swoistych przeciwciał anty CAV, natomiast 86,4% surowic pochodzących od brojlerów było dodatnich. Z kolei McIlroy i wsp. (5) nie wykazali obecności przeciwciał anty CAV w stadach reprodukcyjnych ptaków do 20 tygodnia życia, natomiast w 15 stadach brojlerów od 17,3 do 19,6% ptaków było zróżnicowanych wagowo w porównaniu do stad nie zakażonych wirusem anemii zakaźnej. Hoop i wsp. (2) stwierdzili w Szwajcarii zakażenie wirusem anemii zakaźnej w 15 z 35 badanych stad brojlerów. Śmiertelność w tych stadach wynosiła 3,6-19,8%.

Brojlery nie są w większości przypadków szczepione przeciwko chorobie Mareka. Pomimo to wykonane odczyn immunodiffuzji w żelu agarowym, wykazał obecność precypityn w sześciu stadach. Ich obecność stwierdzono w 5 do 40% badanych surowic. Świadczy to o dużym zagrożeniu i możliwości wybuchu choroby Mareka w tych stadach.

Reasumując, należy stwierdzić, że na Lubelszczyźnie nastąpiło znaczne rozprzestrzenienie zakażeń wirusowych u brojlerów. Uzyskane wyniki pozwolą na modyfikację programów profilaktycznych i dostosowanie ich do aktualnej sytuacji epizootycznej.

Piśmiennictwo

- Dren C., Forkas T., Nemeth I.: Serological survey on the prevalence of chicken anaemia virus infection in Hungarian chicken flocks. *Vet. Microbiol.* 1996, 50, s. 7-16.
- Hoop R. K., Guscetti F., Keller B.: An outbreak of infectious chicken anaemia in fattening chickens in Switzerland. *Schw. Arch. Tierh.* 1992, 134, s. 485-489.
- Karczewski W., Karpińska E., Minta Z., Czekaj H.: Rozprzestrzenienie zakażeń wirusowych w stadach rodzicielskich kur kierunku mięsnego. *Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin*, 1983, 2, s. 665.
- Koncicki A.: Występowanie zakażeń wirusowych u kurcząt w rejonie olsztyńskim. *Mat. IX Kongresu PTNW, Olsztyn* 1992, 1, s. 242.
- McIlroy S. G., McNulty M. S., Smith J. A., Goodall E. A., Alcorn M. J.: Economic effects of clinical chicken anaemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Dis.* 1992, 36, s. 566-574.
- Minta Z., Bugajak P., Daniel A., Bartnicka B., Tomczyk G.: Health status of broiler chicken flocks in Poland estimated by serologic monitoring. *Mat. XI Inter. Congress WVPA, Budapeszt*, 1997, s. 241.
- Minta Z., Daniel A., Bugajak P., Bartnicka B., Tomczyk G.: Ocena statusu immunologicznego stad reprodukcyjnych kur w świetle badań monitoringu serologicznego. *Mat. Konf. „Ferma drobiu”, Gdynia*, 1999, s. 23-25.
- Szeleszczuk P., Dymacz G.: Zastosowanie monitoringu serologicznego do optymalizacji programów immunoprofilaktyki zakażeń reowirusowych u kur w kraju. *Mat. Konf. „Rola reowirusów w patologii ptaków”, Wrocław*, 1998, s. 29-30.
- Slaughter S. S., Yang T. J., Van der Heide L., Fredrickson T. N.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of detecting chicken antireovirus antibody of high sensitivity. *Avian Dis.* 1978, 22, 802-807.
- Wieliczko A., Mazurkiewicz M., Gawel A.: Zakażenia reowirusowe w stadach reprodukcyjnych kur typu mięsnego w świetle badań serologicznych. *Konf. „Rola reowirusów w patologii ptaków”, Wrocław*, 1998, s. 36-39.
- Wieliczko A., Mazurkiewicz M., Jurowski J.: Zakażenie kur wirusem anemii zakaźnej. *Medycyna Wet.* 1996, 52, s. 446-447.
- Wieliczko A., Trzęsowski P., Mazurkiewicz M., Gawel A., Jurowski J.: Wyniki badań serologicznych nad występowaniem zakażeń wirusem anemii zakaźnej (CAV) u kur i ich wpływ na efekty produkcyjne. *Mat. Konf. „Aspekty fermowego i drobnotowarowego chowu drobiu”, Wrocław*, 1995, s. 41-42.
- Wiśniewska J., Wieliczko A.: Występowanie zakażeń reowirusami u kurcząt rzeźnych na terenie Polski południowo-zachodniej w świetle badań serologicznych. *Mat. Konf. „Rola reowirusów w patologii ptaków”, Wrocław*, 1998, s. 39-40.