

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Medicina Veterinaria

Weterynaria

8(1) 2009



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Medicina Veterinaria*

Miroslav Baran (Koszyce, Słowacja), Ryszard Bobowiec (Lublin),
Carlos Castrillo (Saragossa, Hiszpania), Andrzej Depta (Olsztyn),
Øystein Sjaastad (Oslo, Norwegia), Jacek Szczawiński (Warszawa),
Wojciech Zawadzki (Wrocław) – przewodniczący,
Agnieszka Kwiatkowska (Wrocław) – sekretarz

Opracowanie redakcyjne i korekta:
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz
Janina Szydłowska

Łamanie
Halina Sebzda

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644–0676

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2009

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax 71 328–12–77
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 3,2 Ark. druk. 3,75
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87–800 Włocławek
tel./fax: (054) 232 37 23, 232 48 73; e-mail: sekretariat@expol.home.pl

ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH METALI CIĘŻKICH W MLEKU PRZEŻUWACZY (KRÓW I KÓZ) Z REJONÓW PRZEMYSŁOWYCH I CZYSTYCH EKOLOGICZNIE

Zbigniew Dobrzański, Magdalena Skiba, Aleksandra Brożyńska,
Monika Kowalska-Górska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem doświadczenia była ocena zawartości wybranych metali ciężkich (ołowiu, kadmu, miedzi i niklu) w mleku przeżuwaczy (krów i kóz), a także porównanie poziomów tych metali u zwierząt pochodzących z różnych regionów – zanieczyszczonego i uważanego za wolny od zanieczyszczeń przemysłowych. Zawartość metali ciężkich została oznaczona w próbkach mleka surowego krowiego i koziego. Zanotowano następujące średnie zawartości pierwiastków (odpowiednio Cu, Ni, Cd i Pb): w mleku krowim z terenu przemysłowego 0.659, 0.2358, 0.007, 0.042 mg/kg; w mleku krowim z terenu uznawanego za czysty 0.227, 0.065, 0.003, 0.019 mg/kg; w mleku kozim z terenu przemysłowego 0.671, 0.226, 0.007, 0.043 mg/kg; w mleku kozim z terenu uznawanego za czysty 0.248, 0.063, 0.003, 0.021 mg/kg. Pomiedzy zawartością metali ciężkich w mleku z terenu industrialnego i uznawanego za wolny od zanieczyszczeń przemysłowych wykazano wysoko istotne różnice. Zawartość wszystkich metali w wyraźnym stopniu była wyższa w mleku od zwierząt z terenu przemysłowego. Niepokojący jest fakt, iż urzędowo dopuszczalna zawartość Pb (0.02 mg/kg) została przekroczona w próbkach z obu rejonów.

Słowa kluczowe: przeżuwacze, mleko, miedź, nikiel, kadm, ołów

WSTĘP

Metale ciężkie należą do jednych z najgroźniejszych zanieczyszczeń środowiska, choć wiele z nich przy odpowiednich warunkach pełni rolę biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, jak np. cynk, żelazo, miedź i selen. Dotychczas nie wykazano żadnej roli biologicznej, jaką mogłyby pełnić rtęć, kadm, arsen i ołów, przez co uważa się je za substancje całkowicie obce dla organizmu i szkodliwe, nawet przy bardzo małych stężeniach. Pierwiastki te należą do grupy o najwyższym

Adres do korespondencji – Corresponding author: Zbigniew Dobrzański, Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 38c, 51-630 Wrocław, e-mail: zbigniew.dobrzański@up.wroc.pl

współczynnika kumulacji, wynoszącym 10–600. Do cech wspólnych rtęci, ołowiu i kadmu zalicza się łatwość absorpcji z powietrza atmosferycznego i przewodu pokarmowego, łatwość przechodzenia przez łożysko, barierę biologiczną krew-mózg (Hg, Pb), zdolność tworzenia połączeń z makrocząsteczkami, a także uszkodzanie budowy łańcucha kwasów nukleinowych (Cd, Hg) [Seńczuk 2005, Pyrz 2006].

Pierwiastki szkodliwe, jak np. kadm, pobierane są z pożywieniem i wodą pitną. Mogą więc ulegać bioakumulacji w produktach pochodzenia zwierzęcego i włączeniu do łańcucha pokarmowego człowieka [Pyrz 2006]. Długotrwałe narażenie ustroju na małe nawet dawki metali ciężkich, wynikające ze stałego przebywania w skażonym środowisku, może być przyczyną subklinicznych zmian w organizmie, często nieodwracalnych, ujawniających się po wielu latach, jak np. białaczka [Madej i in. 1994]. Objawy chorobowe pojawiają się dopiero, gdy stan zmian jest już zaawansowany i są charakterystyczne dla poszczególnych szkodliwych pierwiastków [Oleđzka 1999]. Aby przeciwdziałać bioakumulacji metali ciężkich w tkankach zwierząt, podejmuje się próby wykorzystania różnego rodzaju interakcji zachodzących pomiędzy nimi. Są to interakcje typu antagonistycznego i synergistycznego pomiędzy składnikami dawki pokarmowej. Równolegle prowadzone są badania nad wykorzystaniem właściwości kompleksotwórczych, sorpcyjnych i jonowymiennych glinokrzemianów, kwasów huminowych i flawonoidów [Dobrzański i in. 1996].

Metale ciężkie mogą przedostawać się do organizmu poprzez skórę (np. Ni), drogą pokarmową (Cu, Cd, Pb), a także inhalacyjną (Pb, Cd i inne). Przedstawianie się metali ciężkich do organizmu zwierząt następuje głównie drogą pokarmową, w wyniku spożywania dużej ilości paszy zawierającej metale ciężkie pobrane z gleby lub zanieczyszczonej glebą. Pewną rolę odgrywa także pobieranie grudek ziemi podczas wypasu. Na obszarach o zanieczyszczonej glebie, od 9 do 80% ołowiu i 34–90% arsenu zostaje wprowadzone do organizmu tą drogą. Wiele metali wykazuje dodatnią zależność liniową pomiędzy zawartością w glebie a w ziarnie zbóż [Pulina i in. 2008]. Po strawieniu paszy związki mineralne są wchłaniane przez śluzówkę jelita, a następnie wraz z krwią dostają się do gruczołu mlekowego, dlatego też osocze krwi i surowica są najczęściej badane w celu określenia koncentracji tych pierwiastków zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Jednakże mleko, jako pokarm, który pełni najważniejszą rolę w dostarczaniu białka do organizmu dzieci i jest podstawą dla produkcji przetworów takich jak np. sery, kefiry, masło itd., równocześnie jest głównym źródłem metali ciężkich i powinno być objęte stałą kontrolą stężenia tych metali [Ryś 1999]. Badania monitoringowe produktów pochodzenia zwierzęcego (mleko, jaja) wskazują na znaczne zróżnicowanie koncentracji Cd, Hg, Pb oraz innych metali ciężkich, od śladowego do wielokrotnie przekraczającego wartości fizjologiczne [Kabata-Pendias 1999].

W mleku występuje około 25 pierwiastków śladowych. Ich koncentracja jest zmienna i zależy od wielu czynników, głównie od zawartości danego pierwiastka w glebie, paszy, wodzie i powietrzu, stopnia ich bioprzyswajalności, a także zjawiska interakcji międzypierwiastkowej [Górska i Litwińczuk 1996, Dobrzański i in. 2005, Dz. U. Nr 37 poz. 325 i 326]. Składniki mineralne, a w tym pierwiastki śladowe, wywierają istotny wpływ na właściwości fizyczne, stabilność białek oraz kształtowanie się smaku mleka, a także katalizę niektórych reakcji chemicznych zachodzących w mleku [Ryś 1999]. Trudno ustalić, które z pierwiastków śladowych i w jakich ilościach są naturalnymi składnikami mleka, a które pochodzą z zanieczyszczeń. Spośród pierwiastków występujących w mleku moż-

na wyróżnić takie, które mają znaczenie fizjologiczne (żelazo i kobalt), technologiczne (żelazo, miedź) i toksykologiczne (cynk, fluor, kadm, ołów). Pierwiastkami szczególnie niepożądanymi w mleku są: arsen, fluor, ołów i rtęć.

Przechodzenie do mleka różnych pierwiastków oraz substancji zależy w dużym stopniu od selektywnej przepuszczalności błony komórkowej pęcherzyka mlekowego. Utrata tej cechy wskutek działania czynników biologicznych, takich jak mastitis, albo chemicznych (alkohol, benzen, ksylen) umożliwia przedostawanie się do mleka nie tylko metali, ale także różnych zanieczyszczeń chemicznych i organicznych.

Sam mechanizm przedostawania się pierwiastków toksycznych do mleka jest wciąż niedokładnie poznany. Uważa się, że może on polegać na łączeniu się metali z nieswoistymi lub swoistymi nośnikami białek w osoczu krwi – metalotioneinami. Miedź podlega selektywnej przepuszczalności błony komórkowej pęcherzyka mlekowego. Występująca „naturalnie”, czyli w paszy, łączy się z tłuszczami, a „dodana” (np. w formie premiksu) – z białkami. Przenikanie kadmu do mleka zachodzi na drodze transportu ułatwionego dzięki wiązaniu się z różnymi białkami. Ołów najpierw jest deponowany w tkankach (np. kości, wątroba), a dopiero później przenikać może do mleka. Uważa się, że gruczoł mlekowy dla tego metalu jest skutecznym filtrem. Nie ma natomiast dokładnych danych na temat mechanizmu warunkującego przechodzenie do mleka niklu [Grega i in. 1977, Górska i in. 1996].

Na podstawie wyników wielu badań stwierdzono, że zawartość kadmu i ołowiu wzrasta na terenach uprzemysłowionych, natomiast samego ołowiu – w pobliżu dużych szlaków komunikacyjnych. W badaniach przeprowadzonych na terenie GOP [Bodak i Dobrzański 1997] zawartość kadmu w trawach porastających pobocza dróg, w miejscu stanowiącym częste miejsce wypasu, wynosiła od 0,31 do 1,68 mg/kg s.m. i była przekroczona w porównaniu do naturalnych zawartości (0,2 mg/kg s.m.) aż ośmiokrotnie, natomiast ołowiu dwukrotnie (7,3 do 26,4 mg/kg przy normie wynoszącej 10 mg/kg s.m.).

Z analiz prowadzonych w ostatnich latach wynika, że w zbiorczych próbkach mleka krowiego zawartość metali toksycznych sporadycznie przekraczała dopuszczalne stężenia [Litwińczuk i in. 1999].

Badania Popiołek-Pyrz [1998] przeprowadzone na terenie środkowo-wschodniej Polski wykazały względnie niską zawartość tych metali w mleku surowym. Występowanie wysokich stężeń metali ciężkich w jednostkowych próbach w stosunku do prób zbiorczych autorzy tłumaczą wpływem zanieczyszczenia antropogenicznego w środowisku bytowania zwierząt. Kołacz i in. [2004], a także Vidovic i in. [2005], badając zawartość ołowiu i kadmu w mleku krów utrzymywanych w różnych regionach (przemysłowych i typowo rolniczych), wykazali statystycznie istotnie wyższe poziomy ołowiu w mleku krów utrzymywanych w rejonach przemysłowych.

MATERIAŁY I METODY

Badany materiał stanowiły próbki mleka krowiego oraz koziego, pochodzące z gospodarstw z woj. śląskiego i dolnośląskiego. Pobrano po 12 próbek mleka z każdego gospodarstwa. W sumie pobrano 48 próbek (24 mleka koziego i 24 mleka krowiego). Na terenie Górnego Śląska mleko uzyskano z gospodarstw położonych w pobliżu tras przelotowych w Pyskowicach (krowy) i Zbrosławicach (kozy), oddalonych od siebie o 15 km. Na Dolnym Śląsku mleko pobrano w Bystrzycy, z sąsiednich gospodarstw.

Zwierzęta były karmione paszami gospodarskimi pochodzącymi z własnych upraw. W żywieniu krów dodatkowo stosowano młóto. Wszystkie zwierzęta miały zadawaną paszę treściwą dwa razy na dobę po udoju. Sianokiszzonka dla krów zadawana była w miarę potrzeb. Kozy miały stały dostęp do siana. Wszystkie zwierzęta przez większość dnia przebywały na pastwisku – krowy w systemie uwięziowym, a kozy na wybiegu grodzonym elektrycznie (tab. 1).

Tabela 1. Rodzaje pasz zadawanych zwierzętom

Table 1. Kind of fodder served to animals

Gospodarstwo	Gatunek	Pasza
Pyskowice	krowy	sianokiszzonka, mieszanka zbożowa, otręby, młóto, pastwisko
Zbrosławice	kozy	mieszanka zbożowa, siano, pastwisko
Bystrzyca 1	krowy	sianokiszzonka, mieszanka zbożowa, młóto, pastwisko
Bystrzyca 2	kozy	owies, siano, pastwisko

Koncentracje metali ciężkich w roztworach badawczych oznaczono metodą spektrometrii absorpcji atomowej [Dittrich 1988] w aparacie SpectrAA 220 FS, firmy Varian, w obecności próby ślepej i próby referencyjnej. Referencją była wątroba rekina psiego (dog fish liver „DOLT-3”) firmy NRC CNRC Canada, zatwierdzona przez Commission of the European Communities- Community Bureau of Reference B.C.R

W mleku oznaczono stężenia miedzi, niklu, kadmu i ołowiu. Wyniki zestawiono statystycznie (obliczenia wartości średnich, odchyłeń standardowych, istotności różnic między danymi), wykorzystując program Statistica ver.7.0 i Statgraphic ver.5.0.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 2–4.

Dane zestawiono pod względem miejsca pochodzenia próbek, a także gatunku zwierząt. Nie wystąpiły istotne różnice pomiędzy gatunkami w obrębie danego rejonu. Poziom metali w próbkach mleka koziego i krowiego był zbliżony. Wysoko istotne statystycznie różnice wystąpiły natomiast pomiędzy badanymi rejonami. W próbkach mleka pobranych na Górnym Śląsku zawartość badanych pierwiastków była zdecydowanie wyższa niż w mleku z Bystrzycy. Nie zostały odnotowane istotne korelacje pomiędzy występowaniem poszczególnych pierwiastków.

Pomimo wysokiej istotności różnic pomiędzy zawartością badanych metali w mleku pochodzącym z tych rejonów – stężenia Cd nie przekroczyły i kształtowały się znacznie poniżej dopuszczalnego limitu, który wynosi 0,001 mg/kg [Rozp. Min. Zdr. 2003]. Poziom Ni nie różnił się bardzo od danych podawanych w dostępnym piśmiennictwie. Stężenie dopuszczalne przez normy przekroczył natomiast poziom Cu w mleku krów i kóz z woj. śląskiego. Odpowiednio średnie poziomy tego pierwiastka wyniosły 0,6591 i 0,6992 mg/kg przy dopuszczalnym 0,5 mg/kg [Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej 1993]. Ołów przekroczył limit dopuszczalnego stężenia, które wynosi 0,02 mg/kg [Rozp. Min. Zdr. 2004], zarówno w mleku zwierząt z terenu przemysłowego, jak i czystego ekologicznie. Zalecane normy przekroczyły koncentracje dwóch pierwiast-

ków: Cu w mleku z terenów przemysłowych zarówno krowim, jak i kozim oraz Pb w obu regionach. W mleku kozim i krowim z terenu przemysłowego została przekroczona istotnie norma dla zawartości Pb w mleku [Rozp. Min. Zdr. 2003, Rozp. Min. Zdr. 2004, Seńczuk 2005], która wynosi 0,02 mg/kg. Nie zanotowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy zawartościami Pb dla mleka koziego i krowiego.

Próby były wyrównane w grupach, nie zaobserwowano dużego odchylenia standardowego ani istotnych wariancji. Brak wyraźnych różnic pomiędzy zawartościami badanych metali w mleku kóz i krów wskazuje na podobieństwo działania mechanizmu przechodzenia tych pierwiastków do mleka przeżuwaczy.

Tabela 2. Zawartość Cu, Ni, Cd i Pb w mleku krowim i kozim z rejonu zanieczyszczonego i czystego
Table 2. Content of Cu, Ni, Cd and Pb in cow's and goat's milk from polluted and unpolluted area

Parametry statystyczne Statistical parameters	Rejon badań Researches area	Rodzaj mleka Milk type	Cu [ppm]	Ni [ppm]	Cd [ppb]	Pb [ppm]
MIN.	zanieczyszczony polluted	krowie cow's	0,582	0,199	6,6	0,038
		kozie goat's	0,619	0,211	6,8	0,039
	czysty unpolluted	krowie cow's	0,206	0,060	3,5	0,018
		kozie goat's	0,230	0,059	3,2	0,018
MAX.	zanieczyszczony polluted	krowie cow's	0,724	0,401	8,3	0,047
		kozie goat's	0,754	0,245	7,9	0,048
	czysty unpolluted	krowie cow's	0,261	0,069	4,2	0,022
		kozie goat's	0,277	0,070	4,3	0,024
SD	zanieczyszczony polluted	krowie cow's	0,047	0,055	0,5	0,003
		kozie goat's	0,038	0,009	0,4	0,002
	czysty unpolluted	krowie cow's	0,015	0,003	0,2	0,002
		kozie goat's	0,015	0,003	0,3	0,002
$\bar{X} \pm \text{SEM}$	zanieczyszczony polluted	krowie cow's	0,659 ± 0,014	0,236 ± 0,016	7,4 ± 0,2	0,043 ± 0,001
		kozie goat's	0,672 ± 0,011	0,226 ± 0,003	7,5 ± 0,1	0,043 ± 0,001
	czysty unpolluted	krowie cow's	0,228 ± 0,004	0,065 ± 0,001	3,9 ± 0,1	0,019 ± 0,001
		kozie goat's	0,249 ± 0,004	0,063 ± 0,001	3,7 ± 0,1	0,021 ± 0,001

$\bar{X} \pm \text{SEM}$ – średnia oraz błąd standardowy dla średniej – the average and the standard error for average

SD – standardowe odchylenie – standard deviation

MIN.-MAX. – minimalny i maksymalny poziom danego pierwiastka w mleku
– minimum and maximum of the element in milk

Tabela 3. Zestawienie parametrów statystycznych charakteryzujących zawartość Cu, Ni, Cd i Pb w mleku krowim i kozim z obu rejonów objętych doświadczeniem

Table 3. Specification of statistical parameters which describe Cu, Ni, Cd and Pb content in cow's and goat's milk from both experimental areas

Metal Metal	Parametry statystyczne Statistical parameters	Mleko krowie 1 Cow's milk 1	Mleko kozio 1 Goat's milk 1	Mleko krowie 2 Cow's milk 2	Mleko kozio 2 Goat's milk 2
Cu	MIN.- MAX. [ppm]	0,582–0,724	0,619–0,754	0,206–0,260	0,230–0,277
	SD	0,047	0,038	0,015	0,015
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	0,659 \pm 0,014	0,672 \pm 0,011	0,228 \pm 0,004	0,249 \pm 0,004
Ni	MIN.- MAX. [ppm]	0,199–0,401	0,211–0,245	0,060–0,069	0,059–0,0702
	SD	0,055	0,009	0,003	0,003
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	0,239 \pm 0,016	0,226 \pm 0,001	0,065 \pm 0,001	0,0635 \pm 0,001
Cd	MIN.- MAX. [ppb]	6,6–8,3	6,8–7,9	3,5–4,2	3,2–4,3
	SD	0,519	0,350	0,19	0,30
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	7,39 \pm 0,15	3,73 \pm 0,08	3,88 \pm 0,05	3,73 \pm 0,08
Pb	MIN.- MAX. [ppm]	0,038–0,047	0,039–0,048	0,018–0,022	0,018–0,024
	SD	0,003	0,002	0,001	0,002
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	0,042 \pm 0,001	0,042 \pm 0,001	0,020 \pm 0,001	0,0211 \pm 0,001

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ – średnia oraz błąd standardowy dla średniej

– the average and the standard error for average

SD – standardowe odchylenie – standard deviation

MIN.-MAX. – minimalny i maksymalny poziom danego pierwiastka w mleku

– minimum and maximum of the element in milk

1 – mleko pochodzące z terenów zanieczyszczonych – milk from polluted areas

2 – mleko z terenów uznawanych za czyste – milk from areas recognized as free of pollution

Tabela 4. Porównanie mleka krowiego oraz koziego pod względem zawartości poszczególnych metali i rejonu badań
 Table 4. Comparison of cow's and goat's milk regarding to concentration of particular metals and examination area

Grupa Group	Wskaźnik statystyczny Statistical ratio	n	Cu [ppm]	Ni [ppm]	Cd [ppb]	Pb [ppm]
Krowy – rejon 1	$\bar{x} \pm SD$	12	0,659 ± 0,041	0,239 ± 0,055	7,39 ± 0,52	0,042 ± 0,003
Krowy – rejon 2	$\bar{x} \pm SD$	12	0,228 ± 0,015	0,065 ± 0,003	3,88 ± 0,19	0,020 ± 0,001
Między grupami	p	12	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
Kozy – rejon 1	$\bar{x} \pm SD$	12	0,672 ± 0,038	0,226 ± 0,009	7,49 ± 0,35	0,043 ± 0,002
Kozy – rejon 2	$\bar{x} \pm SD$	12	0,249 ± 0,015	0,063 ± 0,003	3,73 ± 0,30	0,021 ± 0,002
Między grupami	p	12	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001

rejon 1 – obszar zanieczyszczony, Pyskowice i Zbrosławice – **area 1** – polluted area

rejon 2 – obszar czysty, Bystrzyca – **area 2** – area free of pollution

$\bar{x} \pm SD$ – średnia zawartość pierwiastka oraz standardowe odchylenie
 – average content of element and standard deviation

p – współczynnik istotności – Index of relevance

Wyniki badań własnych wskazują na istnienie wysoko istotnych różnic w zawartości metali ciężkich w mleku pochodzącym z regionów o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia (uprzemysłowienia). Dość wysokie stężenia tych pierwiastków można tłumaczyć lokalizacją gospodarstw, które są położone w regionie przemysłowym. Dodatkowo na podwyższenie ołowiu w mleku mogła wpływać bliskość szlaków komunikacyjnych. W przypadku regionu uznawanego za czysty należy sądzić, że zanieczyszczenie może być spowodowane nienależytym przestrzeganiem higieny doju oraz sprzętu używanego w budynkach gospodarczych. Kolejnym aspektem może być wpływ zanieczyszczeń nanoszonych przez wiatr, np. pyłów z terenów przemysłowych.

Ponieważ zwierzęta były karmione głównie paszami gospodarskimi, a więc nie było dopływu „obcej lokalizacyjnie” paszy, można założyć, że zanieczyszczenia mleka są związane przede wszystkim z wpływem czynników regionalnych takich jak np. zanieczyszczenie powietrza, gleby i roślin przez przemysł oraz inne czynniki odpowiedzialne za kontaminację metalami ciężkimi.

Mleko krowie charakteryzuje się naturalną zawartością miedzi w ilości 0,2 mg/l [Jan- dal 1996]. Polska norma [Zarządzenie MZiOS, 1993] zawartość miedzi w mleku surowym określa na poziomie 0,5 mg/l, lecz obecnie nie jest przedmiotem Rozporządzenia MZ [2004]. Badania Dobrzańskiego i in. [2005] przedstawiają wartości dla mleka krów z regionu śląskiego na poziomie 0,0796 mg/l. Podobne wyniki otrzymali Rodriguez i in. [2001] dla mleka krów z Wysp Kanaryjskich – 0,076 mg/l. Erdogan i in. [2004], porównu-

jąc dwa regiony tureckie, przemysłowy i wolny od zanieczyszczeń, nie wykazali występowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi, ani pomiędzy porą roku, w której były przeprowadzane badania. Średnia zawartość Cu dla regionu przemysłowego w zimie i lecie wyniosła odpowiednio 0,133 mg/l i 0,136 mg/l, a dla rejonu wolnego od zanieczyszczeń: 0,134 mg/l i 0,131 mg/l. Tripathi [1999] podaje w swoim zestawieniu zawartość Cu w mleku niemieckich i indyjskich krów. Wartości mieszczą się w zakresie od 0,033 do 0,043 mg/l. Ten sam badacz stwierdził, że w zależności od stopnia uprzemysłowienia regionu stężenie Cu może przyjmować wartości od 0,39 do 0,96 mg/kg.

W mleku kozim naturalna zawartość miedzi wynosi ok. 0,5 mg/l [Jamroz 1990, Niżnikowski i in. 2007]. Güler [2007] w badaniach własnych stwierdził bardzo zbliżone stężenie Cu w mleku kozim – 0,48 mg/l. Olano i in. [1997] w pracy porównawczej mleka owczego i koziego z rejonu Madrytu podają następujące wartości: dla mleka owczego 0,41 mg/l (0,48–0,32), a dla koziego 0,28 mg/l (0,25–0,35). Wyższe wyniki otrzymali włoscy naukowcy, którzy także porównywali mleko tych dwóch gatunków [Coni i in. 1996]. Zawartość Cu w mleku owczym, w zależności od pory roku i fermy, wahała się od 0,453 mg/kg do 0,784 mg/kg, natomiast w kozim od 0,605 do 0,615 mg/kg. Porównując otrzymane wyniki z wcześniejszymi badaniami mleka krowiego stwierdzili, że zawartość Cu, Ni jest dużo wyższa w mleku owczym i kozim. Nie odnotowali oni natomiast istotnych różnic w zawartości metali ciężkich w paszy pobieranej przez wszystkie trzy gatunki zwierząt. Na podstawie powyższych danych postawiono hipotezę, że różnice w zawartości badanych pierwiastków w mleku są wynikiem różnic o podłożu metabolicznym pomiędzy tymi gatunkami.

Zawartość Ni w ilości 0,027–0,1 mg/l oznaczył Grega [1977]. Dobrzański i in. [2005] podają średnią zawartość Ni w mleku krowim z regionu śląskiego na poziomie 0,061 mg/l. Praktycznie identyczne wyniki otrzymali Coni i in. [1996], którzy dla mleka owczego oznaczyli zawartość Ni w zakresie 0,040–0,064 mg/l, a w mleku kozim 0,015–0,230 mg/l. W badaniach przeprowadzonych przez Güler [2007] nikiel w mleku kozim występował w większym stężeniu i oznaczony został na poziomie 1,38 mg/kg.

Koncentracje ołowiu i kadmu w różnych rodzajach mleka porównali Rodriguez i in. [1999]. Ilość kadmu w mleku krowim wyniosła 4,88 µg/l (0,7–23,1 µg/l, n = 47), a w mleku kozim 7,81 µg/l (1,0–18,4 µg/l, n = 38). W opracowaniu przedstawionym przez tego samego autora, najwyższe stężenie Cd występowało w mleku krowim pochodzącym z Włoch (7 µg/kg), a najniższe w mleku duńskim – 0,035 µg/l.

Rubio i in. [1998] w badaniach mleka krowiego z okolic Santa Fe oznaczyli średnią zawartość kadmu w ilości 24,6 ng/ml przy zakresie od 0,0 do 106,0 ng/ml (n = 50). Vidovic i in. [2005] przedstawili wyniki badań mleka z Vojevodiny – głównego spichlerza dla Serbii i Czarnogóry, a równocześnie bardzo silnie uprzemysłowionego rejonu. Badania były przeprowadzane w okolicy miasta Kikinda, terenu przemysłowego, w którego obrębie zlokalizowana jest duża ilość farm mlecznych. Zawartość kadmu w próbkach mleka krowiego wyniosła średnio 0,0077 µg/l (0,001–0,016 µg/l, n = 96). Litwińczuk i in. [1999] w badaniach porównawczych mleka krowiego z terenów przemysłowych i typowo rolniczych otrzymali wyniki zawartości kadmu: dla terenów przemysłowych średnia wyniosła 3,0 µg/l (0,0–26,7 µg/l, n=103), natomiast dla rejonu rolniczego 1,4 µg/l (0,0–9,2 µg/l, n=101). Górska i in. [1996] podczas badań mleka krowiego pochodzącego z woj. siedleckiego określili średnią zawartość kadmu na poziomie 0,0035 mg/kg (0,0028–0,0042 mg/kg). Tripathi i in. [1999] podają zawartość Cd w mleku pochodzącym z różnych państw w przedziale od 0,07 do 0,1 µg/kg.

Wyniki czeskich badań dla mleka koziego podają Ayar i in. [2008]. Według autorów zawartość kadmu kształtuje się w zakresie 0,001–0,003 mg/kg, natomiast w badaniach własnych mleka krowiego wykazali obecność kadmu w ilości 0,017 mg/kg. Coni i in. [1996], porównując mleko kozie i owcze pod względem zawartości metali ciężkich, otrzymali koncentrację Cd od 0,130 do 0,161 $\mu\text{g/g}$ w mleku kozim oraz od 0,128 do 0,183 $\mu\text{g/g}$ dla mleka owczego. Wysoką zawartość kadmu w mleku kozim zanotował Güler [2007] – 0,63 mg/kg. Autor tłumaczył zaistniały stan faktem, że badany przez niego rejon Turcji charakteryzuje się dużym zapyleniem pochodzenia przemysłowego, a także skażeniem gleb na skutek stosowania nawozów fosforowych. Kozy są wypasane na poboczach dróg, co dodatkowo naraża zwierzęta na przedostawanie się kadmu do organizmu.

Zawartość ołowiu w mleku krowim w badaniach przeprowadzonych w Indiach przez Swarup i in. [2005] wahała się od 0,00 do 0,79 $\mu\text{g/ml}$ na terenach nieuprzemysłowionych oraz od 0,03 do 2,70 $\mu\text{g/ml}$ w pobliżu zakładów przemysłowych. Autorzy zauważyli, że zachodzi zależność pomiędzy zawartością ołowiu we krwi i mleku; jeżeli wzrasta zawartość ołowiu we krwi powyżej 0,20 $\mu\text{g/ml}$, to obserwuje się natychmiastowy wzrost zawartości tego pierwiastka w mleku.

Na podstawie zestawienia opracowanego przez Rodriguez i in. [1999] można stwierdzić, że najsilniej skażone ołowiem jest mleko krowie pochodzące z Japonii (260 $\mu\text{g/l}$), a najmniej mleko duńskie (0,78 $\mu\text{g/l}$). Autorzy podają również średnią zawartość ołowiu dla mleka polskiego w ilości 20 $\mu\text{g/kg}$. W badaniach własnych mleka krowiego Rodriguez i in. [1999] stwierdzili zawartość tego pierwiastka na poziomie od 12,21 do 17,31 $\mu\text{g/ml}$, natomiast w mleku kozim od 4,34 do 19,02 $\mu\text{g/ml}$. Średnia zawartość ołowiu w mleku kozim pochodzącym z tureckiego rejonu rolniczego wyniosła 0,06 mg/kg [Tripathi i in. 1999], natomiast w krowim 0,103 mg/kg (0,02–0,05 mg/kg) [Ayar i in. 2008]. W Czechach zawartość Pb w mleku kozim waha się w zakresie 0,02–0,04 mg/kg, natomiast we Włoszech w zależności od pory roku wynosiła 0,050 $\mu\text{g/g}$ w mleku kozim i 0,059–0,109 $\mu\text{g/g}$ w mleku owczym.

W Polsce badania nad zawartością metali ciężkich w mleku krowim prowadzili między innymi Litwińczuk i in. [1999]. Porównywali zawartość Pb i Cd w mleku pochodzącym z terenów przemysłowych i rolniczych; na terenach przemysłowych poziom ołowiu w mleku wyniósł 15,3 $\mu\text{g/l}$ (0,1–59,7 $\mu\text{g/l}$), wzdłuż szlaków komunikacyjnych 15,7 $\mu\text{g/l}$ (0,1–98,1 $\mu\text{g/l}$), natomiast na terenach rolniczych – 6,2 $\mu\text{g/l}$ (0,0–23,8 $\mu\text{g/l}$).

W badaniach własnych zawartość ołowiu w mleku krowim pochodzącym odpowiednio z terenu przemysłowego i uważanego za czysty ekologicznie wyniosła 0,042 i 0,021 mg/kg.

PODSUMOWANIE

1. Rejon, w którym użytkuje się zwierzęta przeżuujące ma istotny wpływ na skład mleka pod względem zawartości metali ciężkich (Cd, Cu, Ni, Pb).

2. Ustalone w aktach prawnych (rozporządzeniach) krajowych i unijnych wartości graniczne dla Pb (0,02 mg/kg) zostały przekroczone, zarówno w rejonach przemysłowych, jak i ekologicznie czystych. Natomiast stężenie Cd nie osiągało wartości granicznych (0,01 mg/kg) określonych w rozporządzeniu z 2003 r.

3. Stężenie badanych pierwiastków osiągały w mleku zbliżone wartości u zwierząt utrzymywanych w podobny sposób i w tym samym regionie, co sugeruje iż mechanizm przechodzenia metali ciężkich do mleka u krów i kóz jest podobny.

PIŚMIENNICTWO

- Ayar A., Sert D., Akin N., 2008. The trace metals level in milk and dairy products consumed in middle Anatolia – Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 06/2008.
- Bodak E., Dobrzański Z., 1997. Ekotoksikologiczne problemy chowu zwierząt w rejonach skażeń metalami ciężkimi. Wyd. Elma, Wrocław.
- Coni E., Bocca A., Coppolelli P., Caroli S., Cavallucci C. & Trabalza Marinucci M., 1996. Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. *Food Chemistry* 57(2), 253–260.
- Dittrich K., 1988. Absorpcyjna spektrometria atomowa. PWN, Warszawa.
- Dobrzański Z., Górecka H., Opaliński S., Chojnacka K., Kołacz R., 2005. Zawartość pierwiastków śladowych i ultraśladowych w mleku i krwi krów. *Med. Wet.*, 61(3), 301–304.
- Dobrzański Z., Bodak E., Kołacz R., 1996. Metody przeciwdziałania bioakumulacji metali ciężkich u zwierząt. *Med. Wet.*, 52(12), 763–768.
- Erdogan S., Celik S., Erdogan Z., 2004. Seasonal and Location Effects on Serum, milk, Liver and Kidney Chromium, Manganese, Copper, Zinc, and Iron Concentration of Dairy Cows. *Biological Trace Element Research*, 98, 51–61.
- Grego T., 1977. Przechodzenie mikro- i makroelementów zawartych w karmie do mleka. *Post. Nauk Rol.*, 5, 126–138 oraz *Post. Nauk Rol.*, 6, 57–68.
- Grego T., Barowicz T., 1977. Przenikanie do mleka chemicznych zanieczyszczeń środowiska. *Post. Nauk Rol.*, 2, 95–110.
- Górska A., Litwińczuk Z., 1996. Występowanie ołowiu i kadmu oraz substancji hamujących w mleku woj. siedleckiego. *Med. Wet.*, 52(9), 591–592.
- Güler Z., 2007. Levels of 24 minerals in local goat milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yo'gurt). *Small Ruminant Research* 71, 130–137.
- Jamroz D., Nowicki B., 1990. Kozy. Chów i hodowla. PWN, Warszawa.
- Jandal J.M., 1996. Comparitive aspect of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 22, 177–185.
- Kabata-Pendias A., 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa.
- Kołacz R., Dobrzański Z., Górecka H., Chojnacka K., Rudnicka A., 2004. The content of lead and cadmium in milk and blood of cows kept in industrial and typically agricultural region. *Chem. Agric.*, 5, 312–316.
- Litwińczuk A., Drozd-Janczak A., Florek M., Filozof A., 1999. *Rocz. Nauk. Zoot. T.* 26, z. 1, 219–228.
- Madej J.A., Klimentowski S., Kołacz R., Dobrzański Z., 1994. Rola metali ciężkich w patogenezie enzootycznej białaczki bydła (EBB). *Med. Wet.*, 50(8), 374–376.
- Niżnikowski R., Kowalski Z.M., Strzelec E., 2007. Chów kóz. OWH, Warszawa.
- Olano A., de la Fuente M.A., Juerez M., 1997. Distribution of calcium, magnesium, phosphorus, zinc, magnese, copper and iron between the soluble and colloidal phases of ewe's and goat's milk. *Lait*, 77, 515–520.
- Ołędzka R., 1999. Wpływ metali i innych substancji obcych na biodostępność mikroelementów. *Bromat. Chem. Toksykol.* XXXII, 3, 207–213.
- Popiołek-Pyrz M., 1998. Jakość higieniczna mleka surowego z rejonów środkowo-wschodniej Polski o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia środowiska. Cz. II. Obecność substancji

- hamujących, w tym antybiotyków beta-laktanowych oraz zawartość toksycznych jonów metali ciężkich. *Annales UMCS*, s. EE, Zootechnica, 16, 41, 313–320.
- Pulina G., 2008. *Dairy goats feeding and nutrition*. Cab International.
- Pyrz M., 2006. Transfer kadmu, ołowiu, cynku, miedzi i magnezu z organizmu matki do organizmu potomstwa poprzez zdrowy i chorobowo zmieniony gruczoł mlekowy owiec. Wyd. AR, Lublin.
- Rodriguez E.M., Delgado Uretra E., Díaz Romero C., 1999. Concentrations of cadmium and lead in different types of milk. *Z Lebensm. Unters. Forsch., A* 208, 162–168.
- Rodriguez Rodriguez E.M., Sanz Alaejos M., Diaz Romeo C., 2001. Mineral concentrations in cow's milk from Canary Island. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 419–430.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności (Dz. U. Nr 37, poz. 325 i 326).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności (Dz. U. Nr 120, poz. 1257).
- Rubio M.R., Sigrist M.E., Encinas T., Baroni E.E., Coronel J.E., Boggio J.C., Beldomenico H.R., 1998. Cadmium and lead levels in cow's milk from a milking region in Santa Fe, Argentine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 164–167.
- Ryś B., 1999. Pierwiastki śladowe w roślinach pastewnych, dawkach pokarmowych i mleku krów w rejonie oddziaływania przemysłu siarkowego. *Rozprawy Naukowe AR Kraków*, z. 253. Wyd. AR, Kraków.
- Seńczuk W., 2005. *Toksykologia współczesna*. PZWL, Warszawa.
- Swarup D., Patra R.C., Naresh R., Kumar P., Shekhar P., 2005. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. *Science of the Total Environment*, 349, 67–71.
- Tripathi R.M., Raghunath R., Sastry V.N., Krishnamoorthy U.T.M., 1999. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *The Science of the Total Environment*, 227, 229–235.
- Vidovic M., Sadibasic A., Cupic S., Lausevic S., 2005. Cd and Zn in atmospheric deposit, soil, wheat, and milk. *Environmental Research*, 97, 26–31.
- Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 31 marca 1993 r. w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i używkach (MP Nr 22, poz. 233).

THE EVALUATION OF MILK SELECTED TRACE ELEMENTS LEVELS IN RUMINANTS (COWS AND GOATS) REARED IN INDUSTRIAL AND NONPOLLUTED AREAS

Abstract. The aim of the examination was to evaluate the contamination of cow's and goat's milk. The following Cu, Ni, Cd and Pb mean concentrations was recorded: in cow's milk from polluted area 0.659, 0.2358, 0.007, 0.042 mg/kg; in cow's milk from area free of industrial pollution 0.227, 0.065, 0.003, 0.019 mg/kg; in goat's milk from industrial zone 0.671, 0.226, 0.007, 0.043 mg/kg; in goat's milk from area free of industrial pollution 0.248, 0.063, 0.003, 0.021 mg/kg.

The trace elements concentrations in milk from industrial area were significantly higher than the concentrations observed in samples from area free of industrial pollution. However, the Pb levels (0.02 mg/kg) exceeded the limit in both regions.

Key words: ruminants, milk, copper, nickel, lead, cadmium

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 12.03.2009

Do cytowania – For citation: Dobrzański Z., Skiba M., Brożyńska A., Kowalska-Górska M., 2009. Zawartość wybranych metali ciężkich w mleku przeżuwaczy (krów i kóz) z rejonów przemysłowych i czystych ekologicznie. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.* 8(1), 3–14.

STATUS SEROLOGICZNY POJEDYNCZEGO OSOBNIKA W KONTEKŚCIE INTERPRETACJI BADAŃ W KIERUNKU NEOSPOROZY BYDŁA*

Katarzyna Płoneczka-Janeczko¹, Krzysztof Rypuła¹,
Krzysztof Janeczko²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Vet-Trade Polska Sp. z o.o., Lesznowola

Streszczenie. Zarażenia pierwotniakiem *Neospora caninum* są w stadach bydła jedną z przyczyn strat w sektorze rozrodu (ronienia, resorpcje i powtarzanie rui, rodzenie cieląt z objawami klinicznymi neosporozy lub zdrowych klinicznie, ale trwale zarażonych). Obecność w stadach nawet jednego osobnika, będącego źródłem inwazji i rezerwuarem pierwotniaka (ang. „single reactor”) determinuje utrzymywanie się inwazji w stadzie. Przyjmując powyższe założenie, w roku 2007 badaniami przeglądowymi w kierunku neosporozy objęto 47 stad bydła (n = 476), w tym 25 stad małych „M” (n > 20 ≤ 50) oraz po 11 stad średnich „Ś” (n > 50 < 150) i dużych „D” (n ≥ 150). Materiał do badań stanowiła surowica, w której obecność przeciwciał oceniano testem ELISA (Idexx Herd Chek, USA), przyjmując jako poziom cut-off średnią wartość s/p ≥ 0,5, wyliczaną ze wszystkich prób indywidualnych dla danego stada. Interpretując wyniki indywidualnie, ich odsetek sięgał 27,73% badanej populacji (132/476), jednak przyjmując jako jednostkę podstawową do badań stado, w ponad 80% stad wykazano obecność przynajmniej 1 sztuki, dla której wynik badania serologicznego był dodatni. W poszczególnych typach stad łączna liczba pojedynczych seroreagentów w odniesieniu do ilości zwierząt badanych wynosiła odpowiednio 45/241 w stadach M, 41/110 w stadach Ś i 46/125 w stadach D. Liczba seroreagentów dodatnich w pojedynczym stadzie wahała się od 1 do 10 sztuk.

Słowa kluczowe: *Neospora caninum*, bydło, ELISA, pojedynczy seroreagent

*Praca finansowana z grantu nr 415/GW/07.

WSTĘP

W produkcji bydła straty w sektorze rozrodu pociągają za sobą zawsze konsekwencje ekonomiczne. Oprócz infekcji wirusowych czy bakteryjnych przyczyną omawianych problemów są także inwazje pasożytnicze. Pierwotniak *Neospora caninum* (*Protozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Eimeriorina, Sarcocystidae, Neospora*) uznawany jest powszechnie na świecie za jedną z głównych przyczyn ronień [Armengol i in. 2006, Bascadi i in. 2001, Campero i in. 1998, Dubey i Lindsay 1996, Pitel i in. 2001, Reiterova i in. 2009, Thompson i in. 2001]. Straty dla hodowcy wynikają nie tylko z poronień, ale i z kosztów ponownego zacielenia krów, zmienionego i zaburzonego okresu laktacji czy spadku mleczności [Moskwa i Cabaj 2004]. Badania dotyczące występowania w stadzie neosporozy nie są w naszym kraju wykonywane często. Mimo coraz szerszej świadomości praktykujących lekarzy wet. głównym problemem kojarzonym z ronieniami pozostaje nadal wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych (ang. Bovine Viral Diarrhea, Mucosal Disease BVD/ MD) oraz zakaźne zapalenie nosa i tchawicy i otręt bydła (ang. Infectious Bovine Rhinotracheitis, Infectious Pustular Vulvovaginitis IBR/IPV). Zatem dane nt. neosporozy, jakimi dysponujemy z terenu kraju, są danymi fragmentarycznymi. W okolicach Polski Północno-Wschodniej (rejon Wielkich Jezior Mazurskich, Gdańska, Bydgoszczy, Białegostoku, Morąga) odsetek surowic, w których wykazano obecność swoistych dla *N. caninum* przeciwciał, sięgał od kilku do kilkudziesięciu procent [Moskwa i Cabaj 2004]. W 2006 roku Wierzchoń i in. oceniając 32 stada ($n = 416$), badali w kierunku neosporozy wyselekcjonowane osobniki, u których odnotowano poronienia lub inne problemy związane z rozrodem. Wyniki dodatnie uzyskano u około 9% badanej populacji [Wierzchoń i in. 2006]. Kolejne badania przeprowadzone w roku 2007 w okolicach Lublina w małych i średnich gospodarstwach wykazały seroprewalencję na poziomie 3,72% (7/188) [Tomczuk i in. 2007].

Problem neosporozy w naszym kraju nie stanowi zagrożenia na skalę masową, jednak zarażenie wydaje się utrzymywać w opisywanych stadach na poziomie od kilku do kilkudziesięciu procent. Tak pojęta „stabilizacja” wynikać może z utrzymywania w stadach nawet pojedynczych osobników, będących źródłem inwazji i rezerwuarem pierwotniaka (ang. single reactor). Kontrolę zarażenia utrudnia dodatkowo brak szczepień oraz słaby monitoring stad w tym kierunku. Celem niniejszej pracy była ocena występowania w stadzie neosporozy w kontekście obecności w nim pojedynczych seroreagentów dodatnich oraz przedstawienie różnych możliwości interpretacji zagadnienia, zależnie od przyjętych kryteriów.

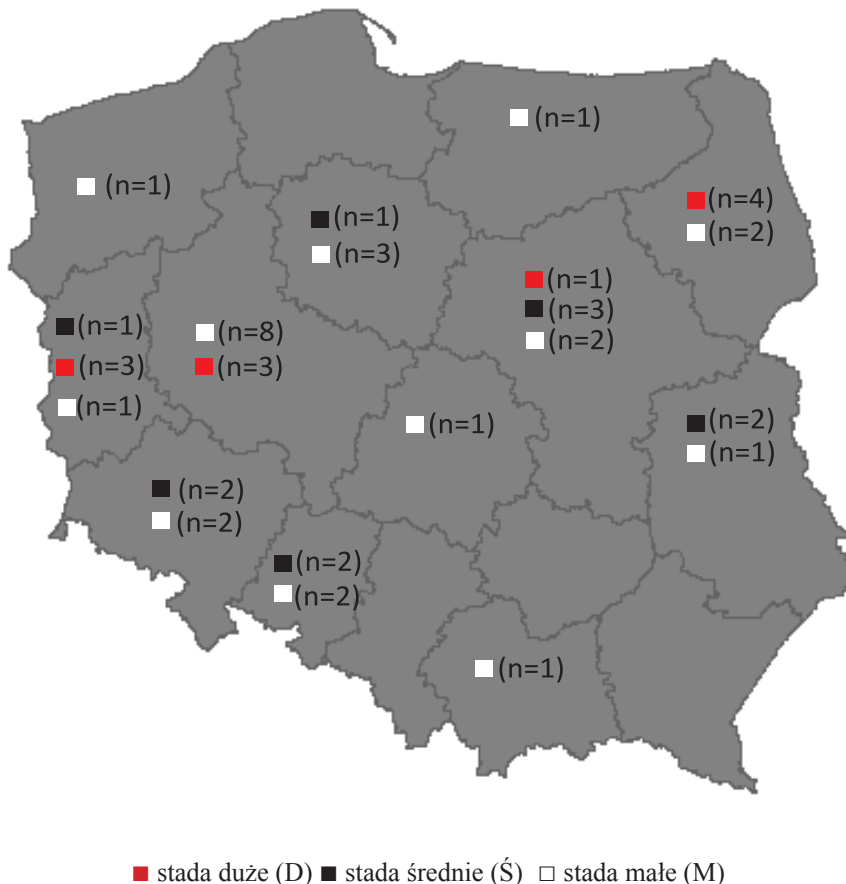
MATERIAŁY I METODY

Badania w kierunku neosporozy prowadzono w roku 2007 przy współpracy terenowych lekarzy weterynarii, opiekujących się stadami. Stada kwalifikowano na podstawie występowania w nich problemów w rozrodzie, w tym ronień. Podstawową jednostką zbiorczą, jaką przyjęto dla porównania uzyskanych wyników, było stado krów mlecznych ($n=47$). Wybrane do badań stada ze względu na ich zróżnicowanie pod względem liczebności podzielono na trzy grupy:

- stada małe (M) liczące od 20 do 50 sztuk bydła,

- stada średnie (\mathring{S}) >50 i <150 sztuk oraz
- stada duże (D) > 150 sztuk bydła.

Uwzględniając powyższy podział, badania objęły ostatecznie 25 stad „M” oraz po 11 stad „ \mathring{S} ” i „D”. Ich liczebność i lokalizację w poszczególnych województwach przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Lokalizacja zakwalifikowanych do badań w kierunku neosporozy stad małych, średnich i dużych

Scheme 1. Location of the small, medium and large herds examined for the presence of neosporosis

Materiał do badań stanowiła surowica. Krew pobierano od wybranych losowo krów powyżej 2 roku życia ($n = 476$), znajdujących się w okresie laktacji. Surowice oceniano ilościowym testem ELISA (Idexx Herd Chek, Lab. Inc. Westbrook, Maine, USA), który wykonano wg instrukcji producenta. Wynik testu kwalifikowano jako dodatni przy $s/p \geq 0,5$, przyjmując w tym wypadku wartość progową testu zalecaną przez producenta. Próbobranie przeprowadzano każdorazowo na poziomie 10% stada. Łącznie spośród 476 prób – 125 pochodziło ze stad M, 110 prób ze stad \mathring{S} i 241 ze stad D.

Interpretacja wyników badań na poziomie stada

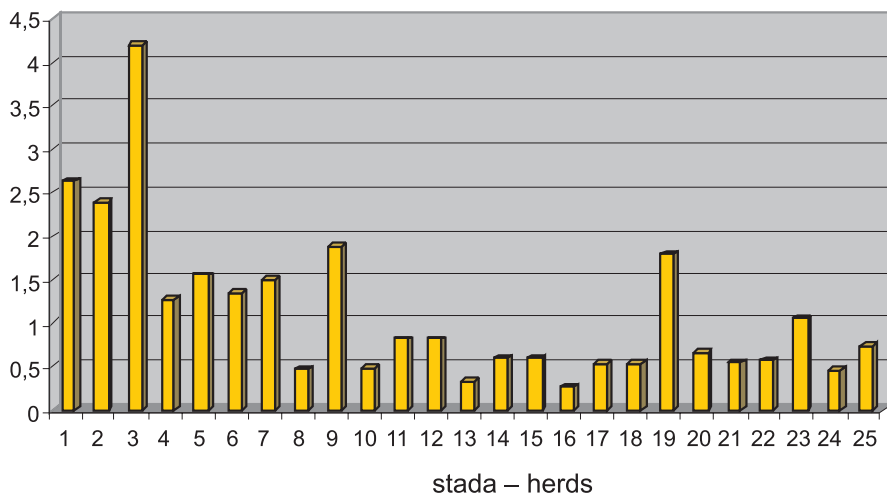
Za podstawową jednostkę przyjęto w badaniach stado. Jego status określano na podstawie wyników uzyskanych w próbach indywidualnych. Stado kwalifikowano jako „serologicznie dodatnie”, przy równoczesnym spełnieniu 2 założeń:

- co najmniej jednym indywidualnym wyniku dodatnim (ang. single-reactor) oraz
- średniej s/p wyliczanej ze wszystkich prób indywidualnych dla danego stada $\geq 0,5$ (cut-off).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Występowanie przeciwciał anti-*Neospora caninum* powyżej przyjętego do badań progu wykrywalności ($s/p \geq 0,5$) w obrębie stad małych, średnich i dużych obrazują ryc. 1, 2 i 3. Przyjmując założone do interpretacji badań poziomy, całkowita seroprevalencja wykazana na poziomie stad przekraczała 80%. Na 47 przebadanych stad – trzydzieści osiem (80,85%) sklasyfikowano jako „serologicznie dodatnie”. Odsetek stad z wynikiem dodatnim stanowił odpowiednio 72,72% wśród stad dużych D (8/11), 90,09% w stadach średnich Ś (10/11) i 84% w stadach małych M (21/25). Krzywe na ryc. 4 prezentują uzyskane w badaniach wartości s/p dla stad „serologicznie dodatnich” różnej wielkości.

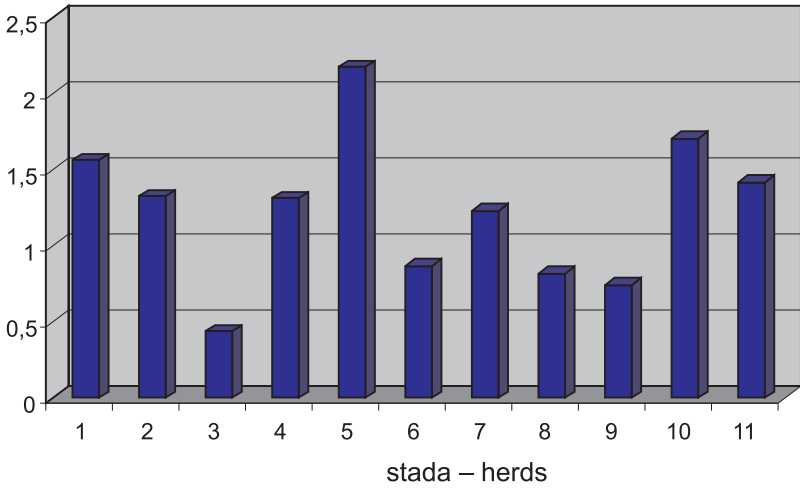
średnie wartości s/p w stadach małych (M)
average value s/p of small herds (M)



Ryc. 1. Występowanie przeciwciał anti-*Neospora caninum* w stadach małych (M)

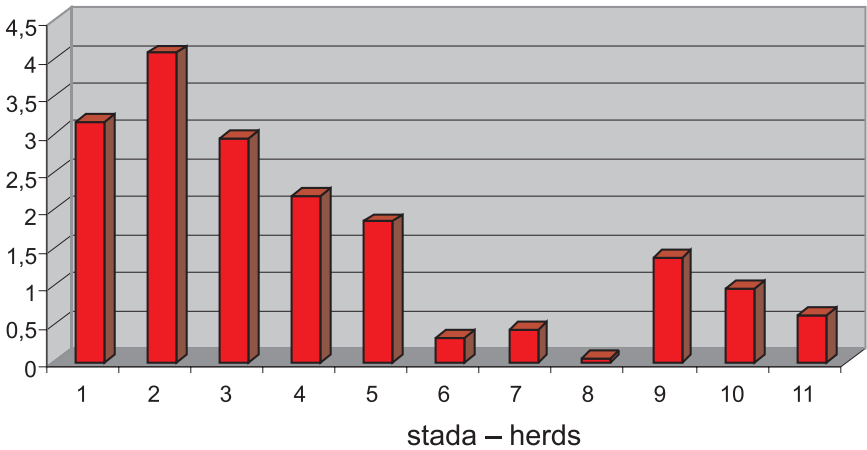
Fig. 1. Antibodies specific to *Neospora caninum* in the small herds (M)

średnie wartości s/p w stadach średnich (Ś)
 average value s/p of mean herds (Ś)

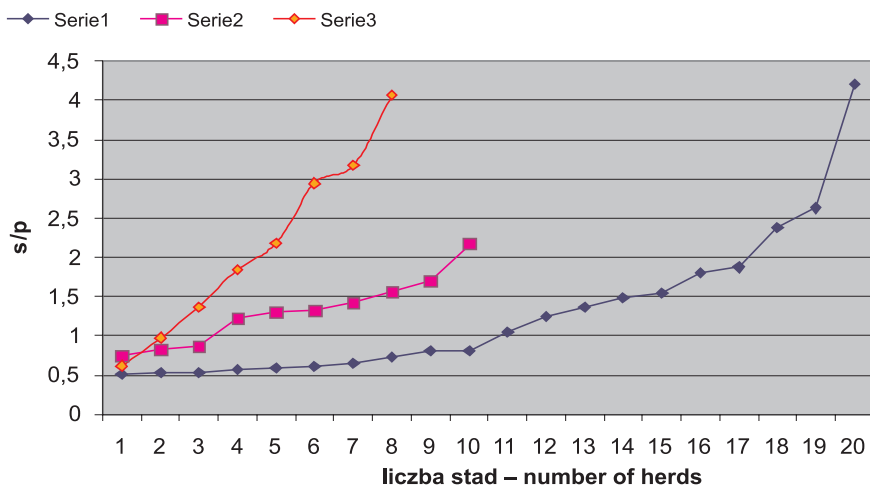


Ryc. 2. Występowanie przeciwciał anti-*Neospora caninum* w stadach średnich (Ś)
 Fig. 2. Antibodies specific to *Neospora caninum* in the medium herds (Ś)

średnie wartości s/p w stadach dużych (D)
 average value s/p of big herds (D)



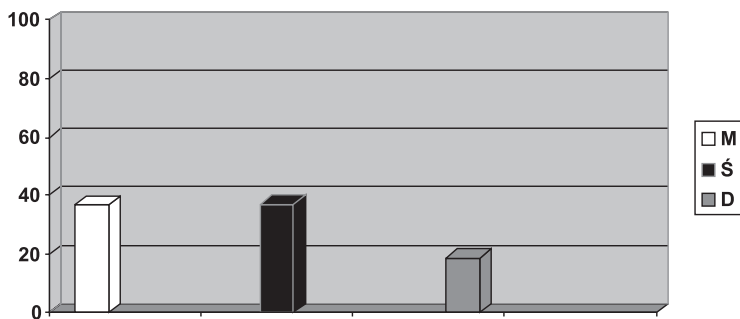
Ryc. 3. Występowanie przeciwciał anti-*Neospora caninum* w stadach dużych (D)
 Fig. 3. Antibodies specific to *Neospora caninum* in the large herds (D)



Ryc. 4. Wartości s/p obrazujące występowanie przeciwciał anti-*Neospora caninum* w stadach małych (serie 1), średnich (serie 2) i dużych (serie 3)

Fig. 4. S/P ratio as positive for *Neospora caninum* antibodies in the small (line 1), medium (line 2) and large (line 3) herds

Równocześnie odsetek indywidualnych wyników dodatnich stanowił 27,73% badanej populacji (132/476). W stadach D przeciwciała wykazano u 45 spośród 241 badanych sztuk bydła (18,67%), w stadach Ś u 41 krów na 110 badanych (37,27%), a w stadach M u 46 na 125 badanych (36,8%). Porównanie odsetka indywidualnych wyników dodatnich dla stad M, Ś i D obrazuje ryc. 5. Liczba pojedynczych sztuk bydła, dla których w badaniu uzyskano wynik dodatni, wahała się w stadach od 0 do 10. Tabela 1 odzwierciedla częstotliwość wykrywania minimum jednej takiej sztuki w poszczególnych typach stad.



Ryc. 5. Porównanie odsetka wyników dodatnich uzyskanych w ocenie indywidualnej bydła ze stad M, Ś i D

Fig. 5. Percentages of individual positives results in the M, Ś and D cattle herds

Tabela 1. Liczba pojedynczych wyników dodatnich („single reactor”) w poszczególnych typach stad
 Table 1. The number of single seropositive results („single reactor”) in the particular types of herds

Częstotliwość wykrywania pojedynczych wyników dodatnich w poszczególnych typach stad Frequency of detection single positives results in the particular types of herds			
Liczba wyników dodatnich The number of positives results	stada małe M small herds M	stada średnie Ś medium herds Ś	stada duże D large herds D
1 (+)	5	0	1
2 (+)	8	4	2
3 (+)	4	1	2
4 (+)	2	3	2
5 (+)	1	2	0
6 (+)	–	0	0
7 (+)	–	0	1
8 (+)	–	1	0
9 (+)	–	0	1
10 (+)	–	0	1

Ocena rozprzestrzenienia w stadzie neosporozy i jej ewentualnego związku z występowaniem problemów w rozrodzie oparta jest najczęściej o badania serologiczne. Od ich wyników uzależnia się też dalsze postępowanie w stadzie, np. eliminację krów, u których wykazano przeciwciała oraz potomstwa od takich matek. Ważna jest jednak interpretacja badania – czy oceniamy stado, traktując je jako jednostkę podstawową, czy też ocena serologiczna odnosi się do poszczególnych osobników badanej populacji? W dostępnym piśmiennictwie pojęcia te są wyraźnie oddzielone. Porównawcze dane nt. rozprzestrzenienia zarażenia w krajach o wysoce rozwiniętej hodowli bydła (Niemcy, Holandia, Hiszpania i Szwecja) prezentował w 2005 r. Bartels i in. [Bartels i in. 2006]. Badania te wykazały wyraźne zróżnicowanie nie tylko pomiędzy seroprevalencją notowaną w poszczególnych krajach, ale także w odniesieniu do typów stad (mleczne, mięsne). Różnice występowały także pomiędzy badanymi stadami w obrębie tego samego kraju. W odniesieniu do stad mlecznych seroprevalencja kształtowała się w przedziałach: od 10 do 24% w Szwecji, od 39 do 59% w Niemczech, od 57 do 69% w Hiszpanii i od 67 do 84% w Holandii. Rozpatrując zagadnienie w odniesieniu do wyników indywidualnych, różnice pomiędzy stadami były jeszcze bardziej wyraziste. O ile w Szwecji w bardzo nielicznych fermach wykazano ponad 10% wyników dodatnich, to w Hiszpanii w ponad 10% stad wykazano seroprevalencję na poziomie 50% do nawet 100% stada.

W kontekście oceny stada rozumianego jako jednostka podstawowa, w badaniach coraz częściej zwraca się uwagę na obecność w takim stadzie nawet jednego osobnika, u którego wykazane zostaną swoiste przeciwciała. Wykazanie w stadzie nawet jednego wyniku dodatniego może już stanowić podstawę do uznania całego stada za „serologicznie dodatnie” [Peregrine i in. 2004, Rinaldi i in. 2005]. Podobną interpretację przyjęto w programie zwalczania choroby Aujeszky’ego, choć dotyczyło to sytuacji, gdy poje-

dyncze reakcje ujawniano w kolejnych etapach badań monitoringowych. W przypadku neosporozy przyjęcie powyższego kryterium tłumaczy epidemiologia zarażenia i drogi rozprzestrzeniania się inwazji – nie tylko jej transmisja pionowa (przez łożysko), ale i zarażenia drogą poziomą. Rozróżnia się nawet kolejne pojęcia: endogennych i egzogennych inwazji transplacentalnych, precyzując tym samym źródła i drogi zarażenia [Trees i Williams 2005]. Mówiąc o drodze poziomej – dotyczy to zarażenia oocystą wydalaną przez psy, ale także zarażenia cieląt mlekiem/ siarą od matek czy krów dorosłych fragmentami łożyska, zawierającymi tachyzoity pierwotniaka. Tachyzoity wielkości 2–6 μm stanowią stadium inwazyjne – kształtem przypominają półksiężyc z centralnie umieszczonym jądrem komórkowym. Namnażają się one intensywnie wewnątrz komórek, przenikając między innymi do trofoblastu i łożyska. Sugeruje się również obecność w łożyskach innego stadium inwazyjnego – bradyzoitów, które także zachowują zdolność replikacji. Z punktu epidemiologii już sama masa łożyska przy potencjalnej obecności w nim pierwotniaka *Neospora* byłaby ważnym ogniwem w rozprzestrzenianiu się neosporozy [Dubey i in. 2006]. Badania dotyczące występowania pierwotniaka *Neospora caninum* w łożyskach pochodzących ze spontanicznych ronień bydła prowadzono z zastosowaniem różnorodnych technik diagnostycznych, m.in. immunohistochemii (IHC) i PCR. Wykrywalność pierwotniaka różniła się znacznie – IHC w porównaniu z techniką molekularną charakteryzuje się dużo niższą czułością. Z kolei w PCR zmienny odsetek wyników dodatnich w PCR (od 40 do 100%) uzależniony jest od typu zastosowanej reakcji (PCR, nested PCR) czy rodzaju i sposobu przygotowywania prób (skrawki parafinowane, materiał świeży, mrożony) [Baszler i in. 1999, Bergeron i in. 2001, Shivaprasad i in. 1989]. Ważnym wydaje się natomiast fakt, iż pierwotniaki izolowano nawet z kotyledonów łożysk wydalanych przy porodach klinicznie zdrowych cieląt z wrodzoną neosporozą [Fioretti i in. 2000].

Zarówno zarażenia pionowe, jak i poziome stanowią więc czynnik podtrzymujący inwazję w stadzie. Nawet jeżeli ich źródłem jest pojedynczy osobnik, stanowi on niejako ogniwo krytyczne w rozprzestrzenianiu się choroby [French i in. 1999]. Oceniając stada wg założonego powyżej kryterium (przynajmniej jeden osobnik, u którego w badaniach serologicznych wykazano przeciwciała), ich liczba i odsetek jest z reguły wysoki. Przykładowo: Włochy – 63/ 81 stad badanych (77,8%), Anglia 107/114 stad badanych (94%), Stany Zjednoczone 48/57 stad badanych (84,2%) [Rinaldi i in. 2005, Peregrine i in. 2004, Woodbine i in. 2008]. Przy takiej interpretacji również w Polsce mamy do czynienia z wysokim odsetkiem stad, w których przynajmniej jeden osobnik może stanowić rezerwuuar i źródło szerzenia się choroby. Przeprowadzone badania własne potwierdzają obecność pojedynczych seroreagentów w ponad 80% stad badanych. Interpretując uzyskane w badaniach rezultaty w kontekście odsetka wyników indywidualnych, wykazana seroprewalencja nie przekraczała 30%.

Różnice i rozbieżności – jeśli porównać tu dane z terenu Polski – wydają się wynikać ze sposobu, w jaki dobiera się próby do badań. W badaniach własnych osobniki dobierano losowo pod kątem identyfikacji w stadzie pojedynczych seroreagentów dodatnich – niemniej maksymalna liczba prób z danego stada stanowiła 10% jego liczebności. Ocena seroprewalencji w oparciu o wyniki indywidualne na poziomie stad nie przekroczyłaby zatem nigdy 10% – tyle bowiem przy założonych kryteriach można było uzyskać maksymalnie wyników pozytywnych w każdym z badanych stad. Podobny sposób doboru (losowy) stosował Tomczuk i in., wykazując 3,72% wyników pozytywnych (7/188),

przy czym na poziomie stada odsetek wyników dodatnich sięgał od 0 do 14,3% [Tomczuk i in. 2007]. Trudno jednak porównywać uzyskiwane na terenie Polski wyniki także i z tego powodu, iż najczęściej w opisywanych pracach ocenie podlegają tylko krowy po poronieniach. Automatycznie rozprzestrzenienie neosporozy jest więc oceniane w wyselekcjonowanej i zarazem mniejszej grupie osobników [Cabaj i in. 2000, Moskwa i in. 2002]. Jak zaznaczają sami autorzy – nieprzypadkowy wybór krów do badań nie pozwala na wyciągnięcie wniosków w stosunku do całości pogłowia w badanych stadach, a raczej na ocenę udziału neosporozy w problemach związanych z rozrodem bydła [Wierchoń i in. 2006]. Uwzględniając wyżej opisany dobór prób do badań, odsetek wyników dodatnich kształtuje się od kilku procent (2,6% – 3/114) do dwudziestu kilku procent (26,5% – 119/449) [Moskwa i in. 2002, Cabaj i in. 2000].

Kolejnym ważnym kryterium diagnostycznym w interpretacji badań jest przyjęcie określonego pułapu cut-off (wartość odcięcia) dla wykonywanego testu. Miana swoistych przeciwciał wykrywalnych u osobników badanych nie utrzymują się na stabilnych poziomach (fluktuacja). Nie korespondują zatem też z wystąpieniem lub możliwością wystąpienia poronienia. W infekcjach postnatalnych przeciwciała anti- *Neospora caninum* utrzymują się nawet do 3,5 roku. U części zwierząt z inwazją przejściową ich koncentracja narasta w trakcie serokonwersji, po czym stopniowo po 6–27 miesiącach stopniowo zanika (ujemne wyniki badań) [Dijkstra i in. 2008]. Wcześniejsze badania Dijkstra i in. potwierdziły natomiast, że to infekcjom postnatalnym częściej towarzyszą w stadach ronicia [Dijkstra i in. 2001]. Innymi słowy – poronici mogła zarówno krowa, u której w chwili badania koncentracja przeciwciał była niska, jak i taka, u której wykazane wartości s/p odzwierciedlają wysoką koncentrację przeciwciał. Dla większości analiz wynik badania surowicy uznaje się za dodatni powyżej wartości s/p $\geq 0,5$, ustalonej jako wartość progowa cut-off (ELISA) przez producentów testów. Wyniki uznawano jednak także za dodatnie, kwalifikując je przy s/p $\geq 4,5$ – czego konsekwencją przy analizach porównawczych z innymi badaniami byłby automatyczny wzrost odsetka osobników z wynikiem dodatnim, a więc i wyższa seroprewalencja [Peregrine i in. 2004]. Sugeruje się także wprowadzenie umownego podziału na wyniki słabo dodatnie (s/p od 0,5 do 1,5) oraz wysoce dodatnie (s/p $\geq 1,5$) [Dijkstra i in. 2003]. Nawiązując do tak ustalonego kryterium kwalifikacji stad i biorąc pod uwagę średnie wartości s/p w ich poszczególnych typach (ryc. 4), prawie 30% stad badanych (14/47, tj. 29,78%) nawet przy próbobraniu na poziomie tylko 10% zostałaby zakwalifikowana jako stada wysoce dodatnie. Stanowiłyby one odpowiednio 24% (6/25) stad małych, 27% (3/11) stad średnich i 36% stad dużych (4/11).

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania aktualizują dane nt. rozprzestrzenienia neosporozy w naszym kraju. Ocena skali występowania tego problemu w stadach jest w dużej mierze uzależniona od kryteriów przyjętych do interpretacji badania. Liczba indywidualnych wyników dodatnich i określana na tej podstawie seroprewalencja będzie zawsze niższa w porównaniu z wynikami, które uzyskiwane są, gdy za jednostkę podstawową do badań przyjmie się stado, a obecność w nim już jednego wyniku dodatniego będzie kwalifikowała stado jako „serologicznie dodatnie”. Na 25 przebadanych w kierunku neosporozy stad w 19 potwierdzono wcześniej występowanie BVD, a w 23 IBR (informacje uzy-

skane od lekarzy opiekujących się stadem). Przeciwciała anty-*Neospora caninum* występowały jednak niezależnie od opisanych zakażeń. W świetle uzyskanych wyników (ponad 80% stad z przynajmniej jednym wynikiem dodatnim), w przypadku występowania ronień w stadzie, celowym wydaje się poszerzenie diagnostyki o badanie w kierunku neosporozy. Uwzględniając 95% czy 99% prawdopodobieństwo wykrycia zarażenia na poziomie 10%, liczba prób pobranych szczególnie ze stad małych może nie wystarczać do wyciągnięcia wniosków nt. rozprzestrzenienia w nim choroby w oparciu o wykazaną seroprewalencję stada. Z tego powodu również wyliczenie współczynnika zarażenia stad byłoby nieprecyzyjne. Niemniej cel badań zakładał ocenę statusu stada w kontekście wykazania w nim przynajmniej jednego seroreagenta dodatniego. Liczba prób niezbędnych do badań zmniejsza się jednocześnie ze wzrostem wielkości stada, w praktyce koszty wykonania takich badań byłyby więc i dla hodowcy bardziej korzystne. Badanie wszystkich osobników stada dla oceny ryzyka rozprzestrzenienia choroby wydaje się zasadniczo konieczne tylko w końcowym etapie zwalczania neosporozy, przed uznaniem go za „wolne” od pierwotniaka *Neospora caninum*.

PIŚMIENICTWO

- Armengol R., Pabon M., Adelantado C., Lopez-Gatius F., Almeria S., 2006. First Report of *Neospora Caninum* Abortion in a Beef Cow-Calf Herd From Andorra, Europe. *J. of Parasitol.*, 92 (6), 1361–1362.
- Bartels C., Arnais-Seco J., Ruiz-Santa-Quitera A., Bjoerkman C., Froessling J., von Blumroeder D., Conraths F., Schares G., van Maanen C., Wouda W., Ortega-Mora L., 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.*, 137 (1–2), 17–27.
- Bascadi A., Bajmócy E., Matiz E., Kiss I., 2001. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Hungary. *Acta Vet. Hung.*, 49 (2), 185–189.
- Baszler T., Gay L., Long M., Mathison B., 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (12), 4059–4064.
- Bergeron N., Girard C.H., Pare J., Fecteau G., Robinson J., Baillargeon P., 2001. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 173–175.
- Cabaj W., Chromański L., Rodgers S., Moskwa B., Malczewski A., 2000. *Neospora caninum* infections in abortion dairy cows in Poland. *Acta Parasitol.*, 45, 113–114.
- Campero C., Anderson M., Conosciuto G., Odriozola H., Bretschneider G., Poso M., 1998. *Neospora caninum* associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.*, 143, 228–229.
- Dijkstra T., Lam T., Bartles C., Eysker M., Wouda W., 2008. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection, *Vet. Parasitol.*, 152, 220–225.
- Dijkstra T., Barkema H., Eysker M., Beiboer M., Wouda W., 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.*, 110, 161–169.
- Dijkstra T., Barkema H., Eysker M., Wouda W., 2001. Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds, *Int. J. Parasitol.*, 31 (2), 209–215.
- Dubey J., Buxton D., Wouda W., 2006. Pathogenesis of Neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, 134 (4), 267–289.
- Dubey J., Lindsay D., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67, 1–59.

- Fioretti D., Rosignoli L., Ricci G., Moretti A., Pasquali P., Polidori G., 2000. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow up. J. Vet. Med., Series B, 47, 47–53.
- Fondevila D., Añor S., Pumarola M., Dubey J., 1998. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. Vet. Parasitol., 77, 187–189.
- French N., Clancy D., Davison H., Trees A., 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle, transmission and options of control. Int. J. Parasitol., 29, 1691–1704.
- Moskwa B., Cabaj W., 2004. *Neospora caninum* – pierwotniak wywołujący duże problemy w rozrodzie bydła, Materiały Konferencyjne Międzynarodowej Sesji Naukowej – Problemy w rozrodzie bydła dziś i jutro, Polanica Zdrój, 44–47.
- Moskwa B., Cabaj W., Pastusiak K., 2002. Neosporoza w Polsce, Materiały konferencyjne Zoonozy – problem nadal aktualny, Warszawa 6 XII, 42–48.
- Peregrine A., Duffield T., Wideman G., Kelton D., Hobson J., Cramer G., Hietala S., 2004. Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. Prev. Vet. Med., 64, 101–112.
- Pitel P., Pronost S., Chatagnon G., Tainturier D., Fortier G., Ballet J., 2001. Neosporosis in bovine dairy herds from the West of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. Vet. Parasitol., 102, 269–277.
- Reiterova K., Špilovska S., Antolova D., Dubinsky P., 2009. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. Vet. Parasitol., 159, 1–6.
- Rinaldi L., Fusco G., Musella V., Veneziano V., Guarino A., Taddei R., Cringoli G., 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. Vet. Parasitol., 128, 219–230.
- Shivaprasad H., Ely R., Dubey J., 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. Vet. Parasitol., 34 (1–2), 145–148.
- Thompson G., Canada N., do Carmo Topa M., Silva E., Faz F., Rocha A., 2001. First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. Reprod. Dom. Anim. 36, 309–312.
- Tomeczuk K., Sadzikowski A., Studzińska M., Witkowska A., Puchalski A., 2007. Przeciwciała przeciwko *Neospora caninum* w surowicach krów ze średnich i małych gospodarstw okolic Lublina. Annales UMCS Lublin – Polonia, Sectio DD, Vol. LXVII (1), 50–54.
- Trees A., Williams D., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trend in Parasitol., 21, 558–561.
- Wierzchoń M., Katkiewicz M., Marciniak K., 2006. Występowanie neosporozy bydła w Polsce. Med. Wet. 62 (9), 1041–1044.
- Woodbine K., Medley G., Moore S., Ramirez-Villaescusa A., Mason S., Green L., 2008. A four year longitudinal sero-epidemiology study of *Neospora caninum* in adult cattle from 114 cattle herds in south west England: Associations with age, herd and dam-offspring pairs. Vet. Res., 4, s. 35.

THE SEROSTATUS OF THE SINGLE ANIMAL REGARDING BOVINE NEOSPOROSIS AND INTERPRETATION OF STUDY RESULTS

Abstract. *Neospora caninum* infection is one of the significant cause of losses in the cattle reproduction (abortion, resorption and repeat breeding, born congenitally infected calves with clinical symptoms of neosporosis or clinically normal but persistently infected calves). Even one animal, who is a source and reservoir of protozoon (single reactor) determined the stability of infection within the herd. In 2007 forty seven cattle herds were examined in the screening study to bovine neosporosis. Sera were obtained from 25 small herds ("M", $n > 20 \leq 50$), 11 medium ("Ś", $n > 50 < 150$) and large herds ("D", $n \geq 150$) respectively. Four hundred and seventy six serum samples were examined for the presence of *N. caninum* antibodies by an ELISA (Idexx, Cherd Check, USA). Results were considered positive at a cut-off level of $s/p \geq 0,5$. The antibody concentration was established for each of examined herds as a mean value of individual results. Of the 476 serum samples investigated, 27,73% (132/476) were confirmed to be positive. However at least one seropositive animal was identified in approximately 80% of all herds, for the herd-level. The number of seropositive reagents respectively to all examined animals was 45/241 within D, 41/110 within Ś and 46/125 within M herds. The minimum recorded number of positive results obtained in the single herd was 0 and the maximum was 10.

Key words: *Neospora caninum*, cattle, ELISA, single seropositive reagent

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 12.03.2009

Do cytowania – For citation: Płoneczka-Janeczko K., Rypuła K., Janeczko K., 2009. Status serologiczny pojedynczego osobnika w kontekście interpretacji badań w kierunku neosporozy bydła. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.*, 8(1), 15–26.

PROTEINOGRAM JAKO BADANIE UZUPEŁNIAJĄCE W DIAGNOSTYCE MONOCYTARNEJ ERLICHIOZY PSÓW*

Katarzyna Płoneczka-Janeczko

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Zachowanie się białek surowicy oceniano u psów ($n = 21$) z erlichiozą (*Ehrlichia canis*) potwierdzoną serologicznie testem immunofluorescencji pośredniej IFAT (miana od 1:20 do 1:1280). W porównaniu z grupą kontrolną 20 zdrowych klinicznie psów (wynik badania testem IFAT ujemny) – w grupie psów zakażonych wykazano statystycznie istotne zmniejszenie koncentracji białka całkowitego ($p \leq 0,05$), albumin ($p \leq 0,001$), wskaźnika albuminowo-globulinowego ($p \leq 0,001$) i gamma globulin ($p \leq 0,001$). W odróżnieniu od poprzednich frakcje alfa-2 globulin i beta globulin u psów zakażonych były wyraźnie podwyższone ($p \leq 0,01$). Reasumując, proteinogram może być zalecany w klinicznej diagnostyce erlichiozy jako badanie uzupełniające, porównywalne z badaniem hematologicznym czy oceną rozmazu krwi.

Słowa kluczowe: erlichioza monocytarna, *Ehrlichia canis*, białka surowicy krwi, proteinogram

WSTĘP

Monocytarna erlichioza psów (ang. CME Canine Monocytic Ehrlichiosis) wywoływana przez *Ehrlichia canis* mimo coraz szerszej, teoretycznej znajomości tematu praktycznie bywa nadal często nierozpoznana. Wynika to przede wszystkim z faktu, że klinicznie CME przypomina wiele innych chorób natury zakaźnej. Infekcja dotycząca początkowo tylko komórek krwi wraz z upływem czasu rozprzestrzenia się na cały organizm, przechodząc w trudno uleczalne schorzenie wielonarządowe [Greene i Harvey 1994]. Objawy „grypopodobne” obserwowane w pierwszym okresie zakażenia zanikają wraz z przejściem infekcji w stadium subkliniczne. Jeśli choroba przejdzie dalej, w stadium przewlekłe, rokowania odnośnie stanu zdrowia psa nie są, niestety, optymistyczne.

*Praca finansowana z grantu nr 3 P06K 015 23.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Katarzyna Płoneczka-Janeczko, Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław, e-mail: ploneczka@poczta.onet.pl

Mało charakterystyczny obraz kliniczny narzuca w praktyce konieczność zastosowania kompleksowej diagnostyki przy potwierdzaniu rozpoznania. Erlichioza diagnozowana jest głównie za pomocą testów serologicznych wykonywanych w specjalistycznych laboratoriach, spośród których „złotym standardem” jest immunofluorescencja pośrednia (IFAT). Wyniki PCR są uzależnione od tego, czy w momencie pobierania materiału udało się uchwycić okres bytowania riketsji we krwi (erlichemia). Sugeruje się, że ma ona charakter przejściowy, rzadko kiedy udaje się więc też wykazać riketsje w monocytach, w rozmazie krwi (ok. 5% psów zakażonych).

Pożądaną cechą metody badawczej jest możliwość uzyskiwania obiektywnego wyniku, niezależnie od fazy zakażenia. Proteinogram jest badaniem krwi, pozwalającym na określenie procentowej zawartości poszczególnych frakcji białka w surowicy. W weterynarii nie jest jak dotąd badaniem często zalecanym przez lekarzy mimo stosunkowo niskich kosztów w porównaniu z badaniem serologicznym czy PCR. Dysproteinemia będące wskaźnikiem różnych procesów chorobowych towarzyszą chorobom o słabo wyrażonych objawach, jak również chorobom o przebiegu przewlekłym. Pojawiają się także w chorobach przebiegających z zaburzeniami odporności. Erlichioza jest na tyle specyficzną jednostką, że łączy w sobie wszystkie wymienione przyczyny dysproteinemii. Przeprowadzone badania miały na celu ustalenie odchyłeń w proteinogramie psów, u których w badaniu testem immunofluorescencji pośredniej IFAT wykazano równoległe specyficzne dla *Ehrlichia canis* przeciwciała. Pozwoliłoby to ocenić przydatność proteinogramu jako uzupełniającej metody diagnostycznej stosowanej zamiast np. zlecanego o wiele częściej rozmazu, który z reguły daje wynik negatywny.

MATERIAŁY I METODY

Analizą objęto łącznie 41 psów, w tym 21 psów w grupie badanej i 20 w grupie kontrolnej. Do grupy badanej zakwalifikowano 21 osobników, wybranych spośród populacji poddanej uprzednio serologicznym badaniom przesiewowym w kierunku obecności przeciwciał dla *Ehrlichia canis*. Badania te przeprowadzono przy użyciu testu immunofluorescencji pośredniej IFAT uznawanego za „złoty standard” w diagnostyce erlichiozy [VMRD, Pullman, USA] [Płoneczka i Śmiełewska-Łoś 2003]. Aktualne dane na temat stanu zdrowia psów (w tym dane z ankiet dla właścicieli) i wykazane miana swoistych przeciwciał przedstawia tabela 1. Grupę kontrolną (n = 20) stanowiły psy zdrowe klinicznie, bez odchyłeń w badaniach hematologicznych i biochemicznych krwi, nie wykazujące obecności swoistych dla *Ehrlichia canis* przeciwciał. Analizy przeprowadzono w specjalistycznym, medycznym Centrum Laboratoryjnym DIAGNOSTYKA przy Instytucie PAN we Wrocławiu, każdorazowo oceniając koncentrację białka całkowitego, albumin (Alb.), globulin (Glob.), stosunek albumin do globulin (Alb./Glob.) oraz frakcje alfa 1, alfa 2, beta i gamma globulinową. Koncentrację białka całkowitego określano metodą biuretową. Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w żelu SDS-PAGE (sodium dodecyl biacrylamide gel electrophoresis), oceniając ilościowo koncentrację poszczególnych frakcji metodą densytometrii. Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej: aktualny stan zdrowia psów oraz miana swoistych dla *Ehrlichia canis* przeciwciał wykazanych w teście immunofluorescencji pośredniej (IFAT)
 Table 1. The characteristic of examined group: present clinical health-status of the dogs and titres of specific to *Ehrlichia canis* antibodies detected by indirect fluorescent antibody test (IFAT)

Lp. No.	Stan kliniczny psów w grupie badanej Clinical health-status in examined group	Miano Titre
1.	problemy związane z zaburzeniami rozrodu, niedonoszona ciąża	320
2.	nawracająca gorączka i kulawizna	320
3.	zmiany skórne z których wyizolowano <i>Staph. aureus</i>	1280
4.	przewlekłe, nawracające zmiany zapalne błony śluzowej jamy ustnej, anoreksja	20
5.	wymioty i biegunka, podejrzenie infekcji przewodu pokarmowego	1280
6.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	20
7.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	20
8.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	20
9.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	20
10.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	320
11.	klinicznie brak zmian (wizyta przed szczepieniem profilaktycznym)	320
12.	anoreksja, spadek masy ciała, duszność i drżenia, domieszka krwi w kale	1280
13.	klinicznie brak zmian – wizyta kontrolna	20
14.	poliarthritis, apatia, utrata masy ciała, anoreksja, zmiany skórne	320
15.	kaszel i duszność, anoreksja, okresowe wymioty i biegunki	20
16.	duszność, kaszel, opóźnione reakcje na bodźce	320
17.	klinicznie brak zmian – wizyta kontrolna	320
18.	bolesność okolicy miednicy, pies trafił do lecznicy z podejrzeniem urazu	20
19.	zapalenie gardła i podrażnienie tchawicy, kaszel, sztywność chodu, PUPD	20
20.	klinicznie brak zmian (wizyta przed szczepieniem profilaktycznym)	320
21.	klinicznie brak zmian, wizyta kontrolna	20

WYNIKI I OMÓWIENIE

Zestawienie wartości średnich parametrów badanych, uzyskanych u psów z grupy badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 2.

Analizując wyniki proteinogramu psów z grupy badanej, zmiany w koncentracji białek surowicy wydają się występować niezależnie od ich stanu zdrowia, stadium choroby, w którym pies mógł się znajdować w chwili badania czy wysokości wykazanych testem IFAT mian swoistych przeciwciał.

Różnice pomiędzy poziomem białka całkowitego w obu grupach obrazuje wyraźnie ryc. 1. Hypoproteinemia może być wynikiem gorączki towarzyszącej erlichiozie, występującej we wszystkich jej stadiach, niemniej jest to objaw trudny do uchwycenia dla właścicieli psów. Średnia wartość poziomu białka u psów badanych wynosiła $72,04 \text{ gL}^{-1}$, podczas gdy w grupie kontrolnej ponad 79 ($79,45 \text{ gL}^{-1}$). Jeszcze więcej informacji dostarcza analiza wartości mediany ukazująca, że u 75% psów zakażonych koncentracja białka mieściła się poniżej średniej grupy kontrolnej.

Przyjmuje się, że w stanach gorączkowych podstawowa przemiana metaboliczna BMR (Basal Metabolic Rate) wzrasta o 11 do 13% na każdy, przypadający powyżej prawidłowej temperatury ciała stopień Celsjusza, co wymagałoby zwiększenia koncentracji białka pod postacią aminokwasów o 10% [Allen 1991]. Nasilone procesy glu-

koneogenezy wątrobowej w stanach gorączkowych mobilizują białka organizmu. Klinicznie utrata białka na tym tle uwidacznia się z jednak dużym opóźnieniem i dopiero stadium chroniczne erlichiozy sugerowałoby taką możliwość. Proteinogram pozwalałby więc uchwycić w tym przypadku zmiany o charakterze hypoproteinemii dużo wcześniej, zanim będzie to widoczne w sensie klinicznym. Fakt ten wynika z występującej w CME, równolegle ze stanem gorączkowym, anoreksji. Podobne wartości hypoproteinemii uzyskali w swoich badaniach Harrus i in., wśród psów zakażonych *Ehrlichia canis* w Izraelu [Harrus i in. 1996].

Koncentrację albumin w grupie badanej wobec kontrolnej odzwierciedla rycinie 2.

Tabela 2. Proteinogram psów, u których stwierdzono obecność swoistych dla *E. canis* przeciwciał (IFAT) i grupy kontrolnej

Table 2. Serum protein profile in dogs with specific for *E. canis* antibodies (IFAT) and in the control group

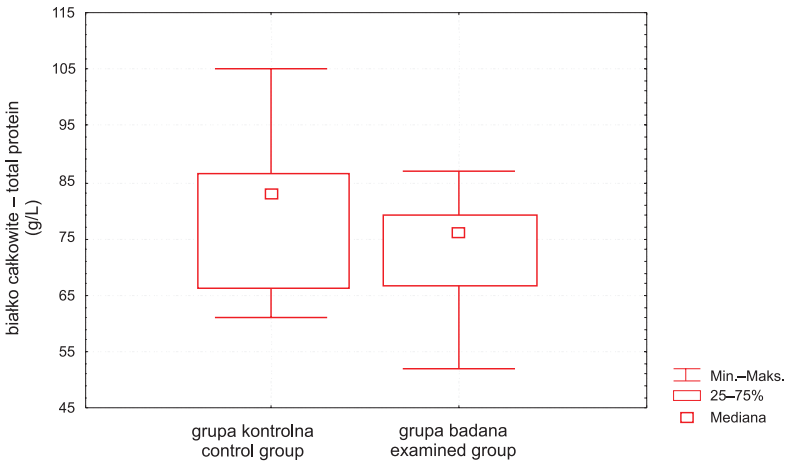
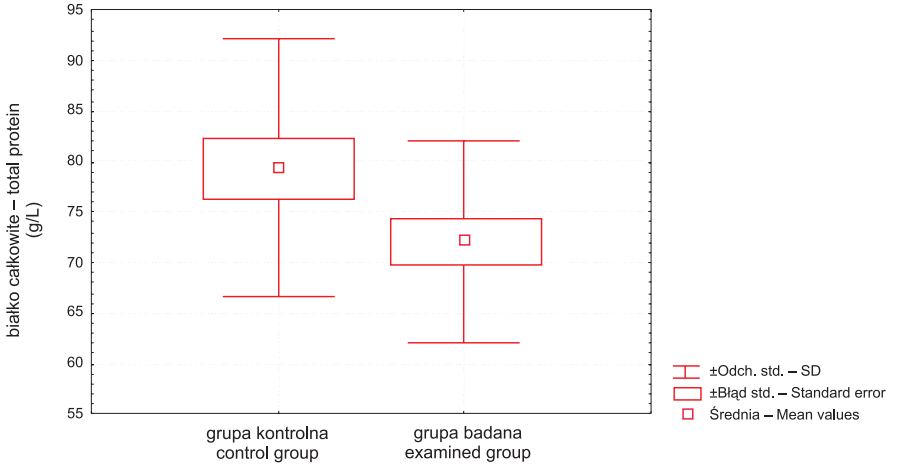
Wyszczególnienie Specification	Średnia ± SD Mean values + SD
GRUPA BADANA – EXAMINED GROUP	
białko całkowite [gL ⁻¹] total protein	72,04 ± 10,06*
albuminy [gL ⁻¹] albumin [gL ⁻¹]	28,63 ± 5,59***
globuliny [gL ⁻¹] globulin [gL ⁻¹]	43,40 ± 7,41
albuminy/ globuliny albumin/ globulin	0,66 ± 0,15***
globuliny alfa 1 [gL ⁻¹] alpha 1 globulin [gL ⁻¹]	3,89 ± 1,70
globuliny alfa 2 [gL ⁻¹] alpha 2 globulin [gL ⁻¹]	12,38 ± 3,84**
globuliny beta [gL ⁻¹] beta globulin [gL ⁻¹]	16,35 ± 4,04**
globuliny gamma [gL ⁻¹] gamma globulin [gL ⁻¹]	9,59 ± 4,33***
GRUPA KONTROLNA – CONTROL GROUP	
białko całkowite [gL ⁻¹] total protein	79,45 ± 12,73
albuminy [gL ⁻¹] albumin [gL ⁻¹]	36,16 ± 5,22
globuliny [gL ⁻¹] globulin [gL ⁻¹]	43,28 ± 9,17
albuminy/ globuliny albumin/ globulin	0,85 ± 0,16
globuliny alfa 1 [gL ⁻¹] alpha 1 globulin [gL ⁻¹]	4,07 ± 1,64
globuliny alfa 2 [gL ⁻¹] alpha 2 globulin [gL ⁻¹]	9,18 ± 2,84
globuliny beta [gL ⁻¹] beta globulin [gL ⁻¹]	12,86 ± 3,09
globuliny gamma [gL ⁻¹] gamma globulin [gL ⁻¹]	17,19 ± 4,22

* różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$ – significance in relation to the control group at $p \leq 0,05$

** różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$ – significance in relation to the control group at $p \leq 0,01$

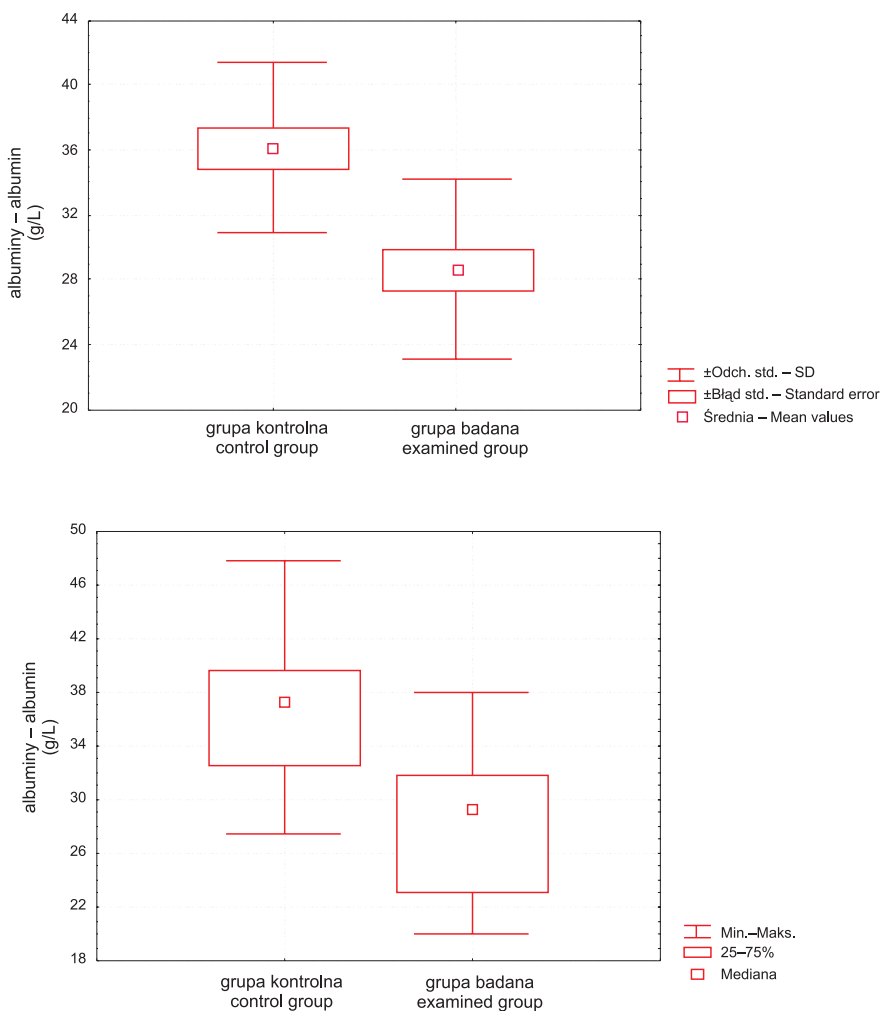
*** różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,001$ – high significance in relation to the control group at $p \leq 0,001$

SD – odchylenie standardowe – standard deviation



Ryc. 1. Białko całkowite (gL^{-1}) w grupie kontrolnej ($n = 20$) i badanej ($n = 21$)

Pict. 1. Total protein (gL^{-1}) in the control group ($n = 20$) and in examined group ($n = 21$)



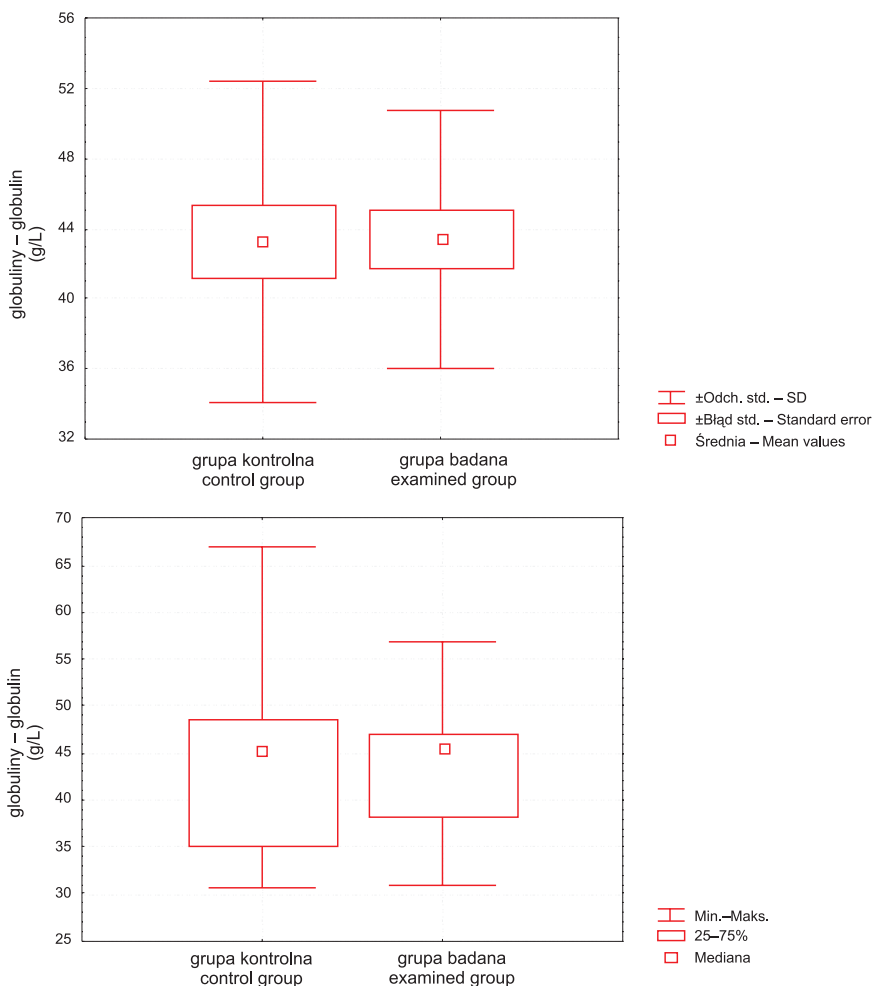
Ryc. 2. Koncentracja albumin (gL^{-1}) w grupie kontrolnej ($n = 20$) i badanej ($n = 21$)

Pict. 2. Albumine concentration (gL^{-1}) in the control ($n = 20$) and in examined group ($n = 21$)

Hypoalbuminemia zaznacza się w grupie badanej jeszcze wyraźniej niż hypoproteinemina. Maksymalna koncentracja albumin u psów zakażonych *Ehrlichia canis* nie osiąga nawet wartości średniej grupy kontrolnej, wynoszącej $36,16 \text{ gL}^{-1}$ i jest zbliżona do wartości mediany uzyskanej w tej grupie ($37,23 \text{ g/L}$). Odnosząc się do wartości referencyjnych, proponowanych w analizach biochemicznych przez Mollereau I in. [1978], wynoszących od 51 do 53% białka całkowitego, hypoalbuminemia wystąpiła w wszystkich psów w grupie badanej [Mollereau i in. 1978]. W ujęciu patofizjologicznym hypoalbuminemia wynika albo ze zwiększonej utraty albumin, albo z obniżonej ich syntezy w wątrobie [Allen 1991]. W przypadku erlichiozy jej przyczyny można upatrywać w towarzyszącej chorobie anoreksji, występowaniu tendencji do krwawień czy w zmianach zapalnych

w naczyniach (*vasculitis*). To głównie te zmiany powodują przemieszczanie się albumin z surowicy do tkanek objętych procesem zapalnym. U doświadczalnie zakażonych psów odnotowywano albuminurię nawet przy niewielkich zmianach w kłębuszkach nerkowych [Harrus i in. 1996]. Uruchamiany jest też prawdopodobnie mechanizm kompensacyjny, związany z obniżeniem syntezy frakcji albumin, pozwalający na utrzymanie ciśnienia onkotycznego oraz zapobiegający wzrostowi lepkości krwi [Allen 1991, Harrus i in. 1996]. Klinicznie anoreksja zauważona została u 4 psów. U jednego odnotowano poliurię z polidypsją (PU/PD), gdzie przyczyną hypoalbuminemii mogą być zmiany w obrębie nerek. U pozostałych psów występowały objawy ze strony układu oddechowego, zapalenia stawów bądź psy nie wykazywały objawów klinicznych. Nie jesteśmy jednak w stanie określić rozległości zmian naczyniowych, a zatem i utraty albumin surowicy przemieszczających się tą drogą w trakcie trwania choroby do tkanek.

Porównanie koncentracji globulin dla obu grup obrazuje rycina 3.

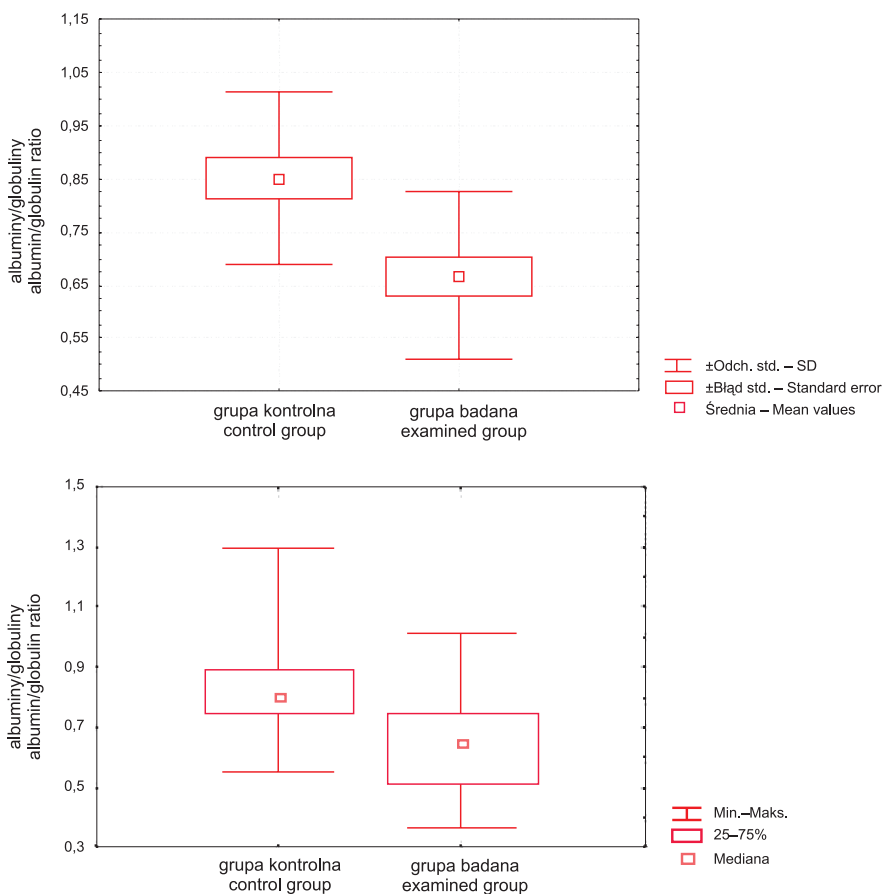


Ryc. 3. Koncentracja globulin (gL^{-1}) w grupie kontrolnej ($n = 20$) i badanej ($n = 21$)

Pict. 3. Globuline concentration (gL^{-1}) in the control ($n = 20$) and in examined group ($n = 21$)

W odniesieniu do całkowitej frakcji globulin proteinogram nie wykazał istotnych zmian u psów, które miały swoiste przeciwciała, mimo iż w zakażeniach doświadczalnych, opisywanych przez Wanera, odsetek psów z hyperglobulinemią towarzyszącą erlichiozie wynosił 30% [Waner i in. 1997]. Średnia koncentracja globulin była praktycznie identyczna ($43,40 \text{ gL}^{-1}$ u psów badanych i $43,28 \text{ gL}^{-1}$ w grupie kontrolnej). Przeprowadzone badania nie uwzględniały dynamiki narastania frakcji globulin, zatem jedynie stan kliniczny i znajomość przebiegu choroby mogą lekarzowi sugerować przypuszczalne jej stadium. Hyperglobulinemia może ujawnić się w przyszłości, jednorazowa ocena tego parametru proteinogramu nie może zatem być wyraźnym wskaźnikiem diagnostycznym erlichiozy.

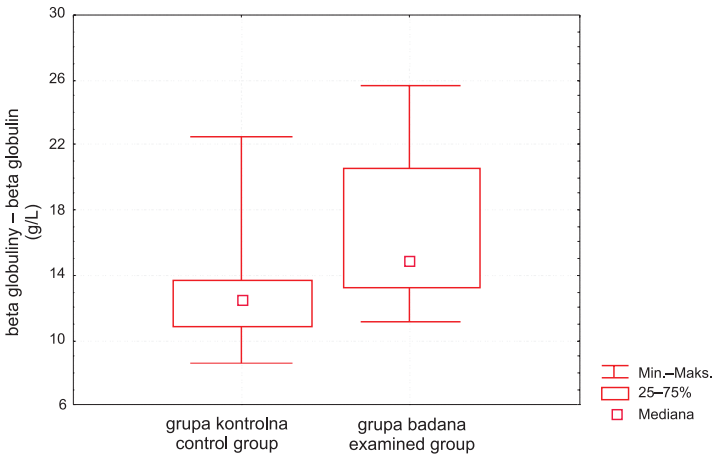
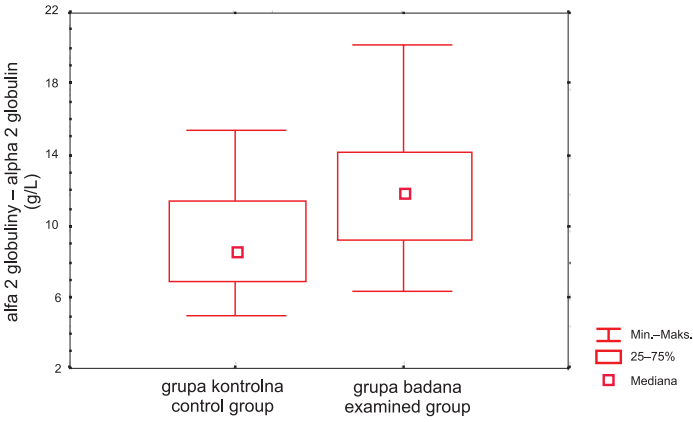
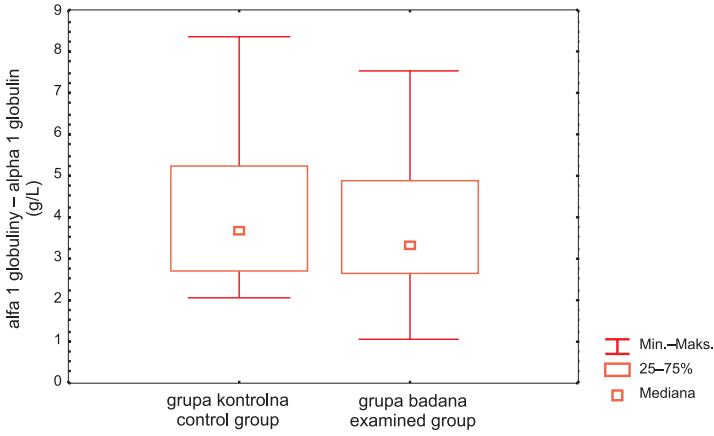
Wskaźnik albuminowo-globulinowy (ryc. 4) u psów z grupy badanej był obniżony, co wiąże się istotnie z wykazaną u nich hypoalbuminemią.

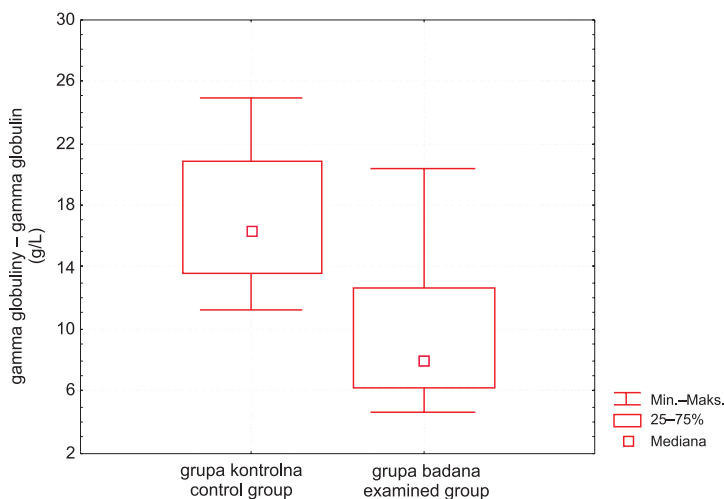


Ryc. 4 Wskaźnik albuminowo-globulinowy w grupie kontrolnej (n = 20) i badanej (n = 21)

Pict. 4. Albumin/Globulin ratio in the control (n = 20) and in examined group (n = 21)

Przesunięcia w alfa 1, alfa 2 i beta i gamma globulinach obrazuje rycina 5.





Ryc. 5. Koncentracja alfa 1, alfa 2, beta i gamma globulin (gL^{-1}) w grupie kontrolnej ($n = 20$) i badanej ($n = 21$)

Pict. 5. Alpha 1, alpha 2, beta and gamma globulin concentration (gL^{-1}) in the control group ($n = 20$) and in examined group ($n = 21$)

Średnia koncentracja alfa 1 globulin w grupie psów badanych nie odbiegała od średniej uzyskanej dla grupy kontrolnej ($4,07 \text{ gL}^{-1}$). Ten sam parametr badany u psów zakażonych doświadczalnie w Izraelu był jednak na nieco wyższym poziomie, były to jednak badania eksperymentalne, a nie infekcja naturalna [Harrus i in. 1996]. Mimo różnic w koncentracji alfa 1 globulin u psów zdrowych i zakażonych, odnotowywanych przez innych autorów, w badaniach własnych nie wykazano zmian istotnych statystycznie, umożliwiających jednoznaczną interpretację.

Przesunięciem we frakcji alfa 2 globulin (oraz częściowo alfa 1) towarzyszyć może synteza białek ostrej fazy (BOF), które w rozdziale elektroforetycznym wykazują czynność tych frakcji. Harrus i in. w eksperymentalnej erlichiozie zanotowali wzrost koncentracji alfa 2 globulin w grupie psów zakażonych, które równoległe nie wykazywały zmian o charakterze pancytopenii, co sugerowało wczesną fazę zakażenia [Harrus i in. 1996]. Również badania własne wykazały, iż alfa 2 globuliny są wyraźnie podwyższone u psów z erlichiozą (średnia koncentracja w grupie badanej wynosiła $12,38 \text{ gL}^{-1}$, podczas gdy w kontrolnej $9,18 \text{ gL}^{-1}$). Ponad 50% psów zakażonych wykazywało koncentrację powyżej wartości $11,32 \text{ gL}^{-1}$ charakteryzującej wg statystyki kwartył górny dla grupy kontrolnej. Przeprowadzone badania nie uwzględniały równoległego występowania pancytopenii, niemniej stosunkowo niskie miana wykazanych przeciwciał oraz stan kliniczny psów z grupy badanej sugerują raczej wczesną, a nie przewlekłą fazę zakażenia. Rozszerzeniem badania alfa 2 globulin mogłaby być ocena BOF, niemniej i bez tego parametr ten wydaje się mieć dużą wartość diagnostyczną.

Globuliny beta w proteinogramie obrazują częściowo syntezę BOF (podobnie jak alfa 2), częściowo zaś mogą odzwierciedlać syntezę wczesnych klas immunoglobulin klasy IgM czy IgA, które w elektroforezie wykazują czynność w regionie beta do gamma.

W zakażeniach naturalnych *E. canis* nie określono jednak czasu utrzymywania się i eliminacji przeciwciał klasy IgM, którym być może towarzyszą już IgG. Przeciwciała klasy IgG w zakażeniach doświadczalnych wykazywano bowiem testem IFAT stosunkowo wcześniej, bo już od 4 dnia p.i. [Harrus i in. 1998]. Frakcja globulin beta 2 była obniżona w doświadczalnych badaniach Wanera nad fazą subkliniczną erlichiozy [Waner i in. 1997]. W badaniach własnych globulin beta nie rozdzielono na podfrakcje. Analiza proteinogramu wykazała natomiast hyperglobulinemię w obrębie całkowitej frakcji globulin beta, korelującą prawdopodobnie z mechanizmami uruchamianymi w zakażonym organizmie we wczesnych fazach infekcji. Średnia koncentracja beta globulin w grupie psów badanych wynosiła $16,35 \text{ gL}^{-1}$ wobec $12,86 \text{ gL}^{-1}$ u psów z grupy kontrolnej. Ocena byłaby dokładniejsza, przy uwzględnieniu w badaniach serologicznych dynamiki przeciwciał klasy IgM, wykraczało to jednak poza ramy przeprowadzonych badań. Przesunięcie we frakcji beta wydaje się więc być ewidentnym dla choroby, niemniej jego charakter (hyper- bądź hypoglobulinemia frakcji beta) są zależne już od fazy zakażenia.

Waner i in. [1997] wykazali w swoich badaniach kolejną cechę erlichiozy – narastającej stopniowo koncentracji specyficznych dla *E. canis* globulin gamma, może towarzyszyć nieadekwatna produkcja przeciwciał nieswoistych. Rezultatem może zatem być hyperglobulinemia, którą notowano, ale dopiero w fazie subklinicznej choroby [Codner i in. 1985]. Badania własne wykazały obniżoną koncentrację frakcji gamma (średnia koncentracja $13,19 \text{ gL}^{-1}$ wobec $21,51 \text{ gL}^{-1}$ w grupie kontrolnej) – parametr ten zachowywał się zupełnie inaczej niż w badaniach przeprowadzonych przez Burghena i in., którzy wykazali hypergammaglobulinemię [1971]. Niemniej w badaniach własnych analizę wykonano tylko jednorazowo. Podobnie jak frakcja beta wskaźnik ten wydaje się być zależny od stadium zakażenia, wymagałby więc dalszego monitorowania. Niskie miana wykazanych dla *E. canis* przeciwciał (od 1:20 do 1:1280) pozwalają domniemywać, że większość psów jest jeszcze w początkowej fazie zakażenia, gdyż nie korespondują one z mianami z zakażeń doświadczalnych, uzyskiwanych w późniejszych stadiach choroby (od 1:2560 do 1:20480) [Waner i in. 1997].

PODSUMOWANIE

Zmiany we frakcjach białek surowicy zauważalne w proteinogramie psów zakażonych *Ehrlichia canis* występowały u większości osobników bez względu na fakt, czy psy wykazywały objawy kliniczne mogące sugerować erlichiozę, czy były to psy klinicznie zdrowe. W większości przypadków wykazano też, iż były to różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną. Wartość diagnostyczna proteinogramu wydaje się być porównywalna z badaniem hematologicznym (anemia czy trombocytopenia mogą sugerować erlichiozę) czy analizą rozmazu, niemniej rzadko kiedy lekarze praktykujący zalecają wykonanie takiego testu przy podejrzeniu erlichiozy [Kuehn i Gaunt 1985]. Wobec trudnego do zdiagnozowania klinicznie obrazu choroby kompleksowe badania diagnostyczne warto byłoby rozszerzyć o opisywaną analizę, wprowadzając ją do często rutynowo stosowanego panelu. Bez względu na charakter (wzrost bądź spadek koncentracji) – przesunięcia wykazane u psów zakażonych zwiększają precyzję stawianego rozpoznania.

PIŚMIENNICTWO

- Allen D.G., 1991. Small Animal Medicine, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 961–970.
- Burghen G.A., Beisel W.R., Walker J.S., Nims R.M., Huxsoll D.L., Hildebrandt P.K., 1971. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *Am. J. Vet. Res.* 32, 749–756.
- Codner E.C., Roberts R.E., Ainsworth A.G., 1985. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 166–169.
- Greene C.E., Harvey J.W., 1994. Canine ehrlichiosis, [w:] Greene C.E., *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of dog and cat*, 545–561.
- Harrus S., Waner T., Aizenberg J., Foley J.E., Poland A.M., Bark H 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *E. canis*. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 73–76.
- Harrus S., Waner T., Avidar U., Bogin E., Pek H., Bark H., 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.*, 66, 241–249.
- Kuehn F., Gaunt S., 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J. Am. Med. Vet. Assoc.* 186, 355–358.
- Mollereau H., Porcher C., Nicolas E., 1978. *Vademecum du Veterinaire*, Editions Vigot, 23, rue de l'Ecole de Medicine, Paris.
- Płoneczka K., Śmiełowska-Łoś E., 2003. Występowanie przeciwciał swoistych dla *Ehrlichia canis* u psów z terenu południowo-zachodniej Polski. *Med. Wet.*, 59, 1005–1008.
- Waner T., Harrus S., Bark H., Bogin E., Avidar Y., Keysary A., 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet. Parasitol.*, 69, 307–317.

SERUM PROTEIN PROFILE

AS A SUPPLEMENTARY EXAMINATION IN DIAGNOSE OF CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS

Abstract. Serum protein alterations in dogs ($n = 21$) with *Ehrlichia canis* infection determined by indirect fluorescent antibody test IFAT (titres 1:20 to 1:1280) were studied. Compared to the control group of 20 clinically healthy dogs (with the negative results in IFAT), significant decreases in the mean concentration of total protein ($p \leq 0,05$), albumin ($p \leq 0,001$), albumin/globulin ratio ($p \leq 0,001$) and gamma globulin ($p \leq 0,001$) in the infected group were determined. In contrast alpha-2 globulin and beta globulin fractions were significantly higher in infected group. In conclusion, serum protein profile can be used in the clinically diagnosis of monocytic canine ehrlichiosis as a supplementary examination, comparable with haematological or blood smears examinations.

Key words: monocytic ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, serum protein, serum protein profile

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 12.03.2009

Do cytowania – For citation: Płoneczka-Janeczko K., 2009. Proteinogram jako badanie uzupełniające w diagnostyce monocytarnej erlichiozy psów. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.* 8(1), 27–38.

ZASTOSOWANIE RÓŻNYCH FORM UODPORNIANIA BIERNEGO PROSIĄT W OKRESIE PRZEDODSADZENIOWYM W WARUNKACH HODOWLI WIELKOSTADNEJ

Krzysztof Rypuła¹, Tadeusz Stefaniak¹, Barbara Kotwica-Wojewoda¹,
Marek Popławski¹, Joanna Błach¹, Jarosław Kaba²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. W warunkach hodowli wielkostadnej często spotykanym problemem jest niedostateczne przekazywanie odporności siarowej na potomstwo, zatem używanie preparatów zawierających w swoim składzie immunoglobuliny powoduje wzrost stężenia krążących w organizmie przeciwciał ochronnych. Zastosowanie w warunkach doświadczalnych preparatów zawierających w swoim składzie frakcje immunoglobulin powodowało wzrost liczby komórek układu białokrwinkowego. Podobnie obserwowano zmiany w stężeniu albumin oraz frakcji α -, β - i γ -globulin w porównaniu do grupy kontrolnej. Koncentracja przeciwciał IgA, IgM i IgG przeciwko *E. coli*, *Streptococcus suis* typ 2 i *Erysipelothrix rhusiopathiae* uległa wahaniom w poszczególnych grupach, ale obserwowane wartości nie były w każdym z badanych okresów istotne statystycznie.

Słowa kluczowe: bakterie, odporność, immunoglobuliny, świnie

WSTĘP

Noworodki przychodzą na świat z wykształconym układem odpornościowym i już jako płody są zdolne do reakcji na kontakt z antygenem poprzez produkcję swoistych przeciwciał i wykształcenie odpowiedzi komórkowej. Jednakże zarówno w życiu płodowym, jak i w pierwszych tygodniach życia układ odpornościowy nie ma wykształconych mechanizmów odporności swoistej, by w pełni zabezpieczyć organizm przed „naporem patogenów środowiskowych”. Dodatkowo, nie u wszystkich gatunków zwierząt, w tym przypadku świń, nie dochodzi do transferu przeciwciał poprzez łożysko. Mechanizm ten jest jedynym naturalnym zabezpieczeniem biernym młodego organizmu w przeciwciała

i inne czynniki odporności przekazywane przez matkę [Haława i Stefaniak 2000, Kaper i in., 2004, Rooke i Bland 2002, Soto i Hultgren 1999].

Ponadto, w warunkach hodowli wielkostadnej często spotykanym problemem jest niedostateczne przekazywanie odporności siarowej na potomstwo. Konsekwencją powstałego niedoboru jest słaba ochrona błony śluzowej noworodka i wczesne zasiedlanie drobnoustrojami chorobotwórczymi poprzez wiązanie adhezyn bakteryjnych z ligandami błony śluzowej [Jakóbisiak 1998, Pejsak i Truszczyński 2007, Stefaniak i in. 2004].

Zagrożenie nowo narodzonych prosiąt w warunkach fermowych odnosi się do konieczności ochrony młodego organizmu przed patogenami obecnymi w środowisku. Działanie to jest jednym z elementów zwiększania statusu zdrowotnego stada, do których zaliczamy także poprawę warunków utrzymania oraz czynności pielęgnacyjne [Deptuła i Buczek 1981, Wiśniewski i in. 2004].

Celem przeprowadzonych u prosiąt badań jest ocena efektywności stosowania różnych form uodporniania biernego oraz czasu utrzymywania się odporności w okresie od urodzenia do momentu odsadzenia.

MATERIAŁY I METODY

Charakterystyka gospodarstwa. Stado podstawowe podczas obserwacji liczyło 450 loch rasy pbz x wbp (polska biała zwisłoucha x wielka biała polska). W gospodarstwie nie przestrzega się zasady całe pomieszczenie pełne – całe pomieszczenie puste. Grupy technologiczne liczące po 20 loch tworzone są w cyklu tygodniowym.

Prosięta odsadzano od loch między 21. a 28. dniem życia, średnio w wieku 24 dni. Dokarmianie prosiąt rozpoczynano od 7. dnia życia paszą pełnoporcjową. Do momentu odsadzenia prosięta wraz z matką przebywały w boksach porodowych. Średnia liczba prosiąt urodzonych od lochy wynosiła 10,7. Średnia liczba prosiąt odsadzonych – 9,5, a indeks wyproszeń liczony na przestrzeni roku – 2,1.

Status zdrowotny stada. Ogólny stan zdrowotny zwierząt w okresie obserwacji był dobry. W celu ograniczenia strat wykonywane są cykliczne szczepienia ochronne wśród zwierząt stada podstawowego przeciwko zakażeniom: *Escherichia coli*, włoskowcem różycy (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), parwowirusem (*Porcine parvovirus*) oraz *Pasteurella multocida* typ D. Prosiąt nie szczepiono przeciwko mykoplazmozie (*Mycoplasma hyopneumoniae*), a preparat żelazowy podawany jest między 4–5 dniem życia.

Do badań wykorzystano 5 miotów po 10 prosiąt pochodzących z tej samej grupy technologicznej loch. W obrębie każdego z miotów prosięta przydzielono losowo do grup doświadczalnych. Zatem każda z grup doświadczalnych wyjściowo liczyła po 12 prosiąt w grupach A, B, C, D, które otrzymywały:

- grupa A w 48 godz. życia preparat SUIGLOBIN,
- grupa B w 48 godz. życia preparat SUIGLOBIN oraz dekstran żelaza (Fe^{3+}),
- grupa C w 48 godz. życia preparat SUIFERROVIT,
- grupa D w 72 godz. życia dekstran żelaza (Fe^{3+}).

Przed rozpoczęciem obserwacji każda grupa prosiąt została trwale oznaczona przez założenie numerowanego kolczyka. Grupa A, B, C stanowiły grupy doświadczalne, a grupa D była grupą kontrolną.

Badanie kliniczne i pobieranie krwi do badań laboratoryjnych przeprowadzano w następujących terminach:

- dla oceny parametrów hematologicznych krew pobierano w dniu rozpoczęcia obserwacji (48 godz. życia zwierzęcia) dla zwierząt w grupie A, B, C i 72 godz. życia dla zwierząt w grupie D, w 24 godz. po podaniu preparatów, a następnie w 7., 14. dniu życia oraz w dniu odsadzenia.
- do badań immunologicznych krew pobierano w dniu rozpoczęcia obserwacji, a następnie w 14. dniu życia i w dniu odsadzenia.

Podczas badania klinicznego prosiąt prowadzonych oddzielnie dla każdego zwierzęcia wykonywano pomiar: wewnętrznej ciepłoty ciała, liczby oddechów, apetytu, pragnienia, łaknienia, aktywności ruchowej oraz nadwrażliwości ogólnej (obecność wymiotów, biegunki, kaszlu) i obecność objawów chorobowych (kaszel, duszność, wymioty, biegunka i odwodnienie).

Krew do badań pobierano do sterylnych probówek nieopłaszczonych i opłaszczonych antykoagulantem (EDTA K₂) z podciśnieniem, używając jałowych igieł \varnothing 0,9 mm z *v. cephalica antebrachii*. Z pozyskanej krwi wykonano badanie hematologiczne przy użyciu analizatora hematologicznego Cell-Dyn 3500 (Abbott), wykorzystując do oceny badanej krwi technologię optyczną M.A.P.S.S. i impedancję. Oceniano następujące wskaźniki hematologiczne: liczbę erytrocytów (RBC), hematokryt (HT), stężenie hemoglobiny (HB), MCV, MCH, MCHC, liczbę płytek krwi (PLT) oraz ogólną liczbę leukocytów (WBC), w tym liczbę neutrofilii (NEU), limfocytów (LIMF), monocytów (MON), eozynofili (EZ) i bazofili (BAZ). Natomiast z pozyskanej surowicy wykonano proteinogram uwzględniający stężenie białka całkowitego i poszczególnych frakcji w elektroforezie bibułowej, a także koncentrację przeciwciał klas IgA, IgG, IgM dla antygenów *E. coli*, *Streptococcus suis* typ 2, *Erysipelothrix rhusiopathiae* przy użyciu testu ELISA.

Oznaczanie IgG w surowicy wykonywano na szkiełkach podstawowych zalewanych 1,2 % agarom w 0,05M buforze weronalowym o pH 8,2, do którego dodawano surowicę króliczą anty IgG świni. Po zastygnięciu wycinano baseniki o średnicy 4 mm, do których наносono badane próbki. Po nałożeniu materiału badanego – szkiełka zawierające przeciwciała inkubowano przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Po upływie zaleczonego czasu dokonywano odczytu. Odczytywano średnicę pierścienia precypitacyjnego. Obliczano pole powierzchni i odczytywano koncentrację immunoglobulin klasy IgG na podstawie porównania z krzywą standardową.

Do obliczeń statystycznych dane transformowano wg wzoru $\sqrt{0,5 + x}$. Analizę statystyczną wykonano, wykorzystując analizę wariancji z analizą *post hoc* oraz testem Turkey'a dla równych lub nierównych grup. Powyższe obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 6.0 dla $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,001$.

WYNIKI I OMÓWIENIE

W tabelach 1–5 przedstawiono przeprowadzoną analizę statystyczną uzyskanych wyników. Różna liczebność prób badanych wynika z faktu, iż pozyskana od zwierząt krew ulegała hemolizie uniemożliwiającej wykonanie badań.

W tabelach 1 i 2 zestawiono wyniki badań hematologicznych prosiąt objętych obserwacją. Po podaniu preparatów w poszczególnych grupach doświadczalnych odnotowano

wzrost liczby erytrocytów oraz wzrost stężenia hemoglobiny i hematokrytu. Statystycznie istotne zmiany ($p \leq 0,05$) liczby krwinek czerwonych w kolejnych terminach badań oznaczono indeksem od ^{a)} do ^{k)}. Natomiast zmiany $p \leq 0,01$ oznaczono indeksem od ^{l)} do ^{r2)}. W kolejnych grupach widoczne są różnice między wartościami poszczególnych parametrów. Szczególnie niższe są wartości w kolejnych terminach u zwierząt w grupie C. Natomiast wyższe wartości uzyskiwane były w grupach A i B. Wskaźniki układu białokrwinkowego przedstawione zbiorczo w tab. 3 wskazują na wzrost liczby leukocytów w 48 godz. życia zwierząt we wszystkich grupach A, B i C oraz grupie D. Uzyskane różnice między grupami były statystycznie istotne $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$. Podobnie w grupach A, B, C nastąpił po podaniu preparatów wzrost liczby neutrofilii, limfocytów oraz krótkotrwały wzrost liczby monocytów. Nie obserwowano statystycznie istotnych zmian po 24 godz. od podania preparatów i utrzymującego się wzrostu ocenianych elementów morfotycznych krwi (tab. 3).

W grupach A, B, C i D po podaniu preparatów obserwowano spadek stężenia białka całkowitego, które w poszczególnych grupach były statystycznie istotne (^{a, b, k, i, j}) (tab. 4). Podobnie we wszystkich grupach odnotowano wzrost stężenia albumin, widoczny szczególnie wysoki w grupie B i C, tu także zmiany w poszczególnych terminach badań były statystycznie istotne (^{e, l, m, o}). Frakcja α -globulin uległa statystycznie istotnym zmianom jedynie w okresie między dniem podania a 48 godz. (^{d, t, u, x}), po czym odnotowano jej dalszy wzrost, jednakże zmiany te nie były statystycznie istotne. Podobnie frakcja β -globulin ulega statycznemu obniżeniu w grupach A, B, D (^{e, f, z}) w okresie między podaniem preparatów a pierwszym badaniem. W kolejnym dniu badania parametry wzrosły w grupach B i D, jednak różnica nie była statystycznie istotna między II a III badaniem. Także frakcja γ -globulin podlegała podobnym wahaniom, a różnice były statystycznie istotne w grupach A, B i C (^{a1, b1, c1, d1, e1, f1}). Koncentracja przeciwciał IgA przeciwko *E. coli* uległa obniżeniu w grupie A, B i C, a zmiany nie były istotne statystycznie. Podobnie wahania aktywności przeciwciał przeciwko *Streptococcus suis* typ 2 i *Erysipelothrix rhusiopathiae* były podobne jak w przypadku reakcji wobec *E. coli*.

Wahania w koncentracji przeciwciał klasy IgM były w kolejnych terminach badań statystycznie istotne u zwierząt w grupach A (^{a, b, c}), C (^{g, h}) oraz grupie D (ⁱ). Zmiany w grupie B nie były statystycznie istotne. Podobnie nie odnotowano różnic statystycznie istotnych w aktywności przeciwciał przeciwko *Erysipelothrix rhusiopathiae* w grupach A, B i D. Z kolei w grupie C zmiany te były statystycznie istotne między wartościami w pierwszych dwóch pomiarach (^d). Aktywność przeciwciał klasy IgG przeciwko *E. coli* była także statystycznie istotna u prosiąt w grupach A (^e), C (ⁱ), a w grupie A (ⁱ) i C (^k) przeciwko *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Natomiast u prosiąt we wszystkich grupach w odniesieniu do antygeny *Streptococcus suis* typ 2 nie obserwowano różnic statystycznie istotnych (tab. 5).

Statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,001$) stężenia albumin wykazano między prosiętami w grupach A, B i C w stosunku do grupy D w dniu rozpoczęcia obserwacji. Podobnie wykazano różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,001$) dla poziomu globulin między grupami A i D oraz B i D. Różnice statystycznie istotne wykazano między grupami B i C ($p \leq 0,05$). W kolejnym terminie badania nie wykazano statystycznie istotnych różnic, natomiast w trzecim terminie badania różnice te odnotowano między stężeniem albumin w grupie A i B, A i D ($p \leq 0,001$) oraz między grupami B i D, B i C, a także C i D przy poziomie ufności $p \leq 0,05$. Różnice statystycznie istotne odnotowano także dla frakcji α -globulin

Tabela 1. Wyniki badań układu czerwokrwinkowego krwi obwodowej prósiąt w kolejnych terminach badań
 Table 1. The results of the examinations of red blood system of piglets on subsequent test dates

Grupa zwierząt Group of animals	Termin badania Test date	n	Oceniaine parametry układu czerwokrwinkowego Assessed parameters of red blood system		
			RBC (10 ⁶ /μL)	HB (G/L)	PLT (10 ³ /μL)
A	I	10	3,96±0,57 ^{l,m}	87,24±11,12	0,26±0,03 ¹⁾
	II	10	3,53±0,53 ^{o,p}	80,88±10,74	0,25±0,03 ^{k,l}
	III	7	3,98±0,66 ^a	93,66±11,70	0,28±0,03
	IV	9	4,75±0,39 ^{a,l,n,o}	93,53±10,95	0,29±0,03
	V	9	5,21±0,18 ^{m,n,p}	90,33±9,75	0,32±0,03 ^{j,l,k,l)}
B	I	9	4,35±0,28 ^r	91,96±4,97	0,27±0,01 ^{l)}
	II	8	3,88±0,26 ^{b,c,d}	83,71±5,37	0,26±0,01 ^{m)}
	III	10	4,39±0,41 ^b	94,59±6,58	0,29±0,02 ⁿ⁾
	IV	10	4,80±0,41 ^o	94,05±11,86	0,29±0,03 ^{o)}
	V	8	5,57±0,38 ^{d,t}	94,98±11,85	0,34±0,03 ^{h,mi,ni,ol)}
C	I	9	3,23±0,92 ^{s,t}	68,93±16,33 ^{i,d)}	0,21±0,05 ^{g-pl,ri)}
	II	6	3,31±0,39 ^{e,u)}	73,13±5,96	0,23±0,02
	III	8	3,87±0,33 ^o	85,80±6,00 ^{f)}	0,27±0,02 ^o
	IV	8	4,46±0,38 ^{s)}	89,23±5,69 ^{d)}	0,28±0,02 ^{pl)}
	V	8	4,93±0,26 ^{t,u)}	85,29±13,85	0,31±0,05 ^{ri)}
D	I	8	3,69±0,26 ^{w,x,y)}	75,16±5,38 ^{f)}	0,23±0,02 ^{h,sl,tl)}
	II	8	3,55±0,37 ^{z,al,bl)}	74,64±6,48 ^{pl)}	0,24±0,02 ^{ul,w)}
	III	8	4,17±0,15 ^{w,z,el)}	88,29±3,38 ^{fl,gl,hl)}	0,28±0,01 ^{sl,ul)}
	IV	8	4,36±0,12 ^{x,al)}	77,39±2,32 ^{hl,tl)}	0,25±0,01 ^{b)}
	V	8	4,93±0,19 ^{y,bl,el)}	75,35±4,61 ^{tl,w)}	0,29±0,02 ^{tl,w)}

Objasnienia:

Explanations:

n – liczba zwierząt w grupie

n – number of animals in a group

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k) – p≤0,05

l,m,n,o,p,r,s,t,u,w,x,y,z,al,bl,cl,dl,el,fl,gl,hl,il,jl,kl,ll,ml,nl,ol,pl,rl,sl,tl,ul,wl,xl,yl,zl,al,b2,b2,c2,d2,e2,f2,g2,h2,i2,j2,k2,l2,m2,n2,o2,p2,r2) – p≤0,01

Tabela 2. Wyniki badań układu czerwono krwinkowego krwi obwodowej prósiat w zależności od zastosowanego preparatu
 Table 2. The results of the examinations of red blood system of piglets depending on applied preparation

Grupa zwierząt Group of animals	Termin badania Test date	n	Oceniane parametry układu czerwono krwinkowego Assessed parameters of red blood system		
			MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
A	I	10	66,79±4,18	22,14±1,64	331,40±9,61
	II	10	70,26±4,00	22,99±1,41	327,20±6,34
	III	7	69,84±8,77	23,94±4,33	342,86±48,02
	IV	9	60,87±6,03	19,72±2,26	323,89±9,84
	V	9	61,26±6,18	17,34±2,11	282,78±7,89
B	I	9	61,44±2,29	21,18±0,76	344,67±10,49
	II	8	66,26±2,77	21,61±0,74	326,38±6,70
	III	10	65,58±4,00	21,61±1,27	329,70±5,95
	IV	10	60,90±4,78	19,56±1,65	320,90±4,63
	V	8	60,21±4,25	17,05±1,69	282,63±8,45
C	I	9	64,01±2,80	21,77±1,69	339,89±18,66
	II	6	67,78±2,47	22,171,04	327,33±4,89
	III	8	68,34±5,29	22,24±1,68	325,75±8,08
	IV	8	62,60±6,06	20,11±1,86	321,63±7,67
	V	8	62,75±7,78	17,28±2,58	274,50±9,97
D	I	8	63,01±1,49	20,35±0,75	323,00±8,64
	II	8	67,93±3,11	21,10±1,15	310,63±12,86
	III	8	66,24±1,40	21,18±0,49	320,13±6,08
	IV	8	58,05±1,84	17,78±0,76	306,25±8,24
	V	8	57,76±3,04	15,31±1,11	264,88±7,66

Objaśnienia:

Explanations:

n – liczba zwierząt w grupie

n – number of animals in a group

Tabela 3. Wyniki badań układu białokrwinkowego krwi obwodowej prósiąt z uwzględnieniem ilości poszczególnych komórek w zależności od zastosowanego preparatu

Table 3. The results of the examinations of white blood system of piglets taking into consideration a number of individual cells depending on applied preparation

Grupa zwierząt Group of animals	Termin badania Test date	n	Oceniane parametry białokrwinkowe Assessed white blood parameters					
			WBC (10 ³ /μL)	NEU (10 ³ /μL)	LIMF (10 ³ /μL)	MON (10 ³ /μL)	EO (10 ³ /μL)	BAZ (10 ³ /μL)
A	I	10	5,12±1,67 ^(s)	2,87±1,15 ^(b)	1,39±0,38 ^(f,sl,tl,ul)	0,67±0,31	0,03±0,02	0,16±0,13
	II	10	9,03±3,25 ^(r)	5,71±2,56 ^(bl,el,dl)	2,28±0,43 ^(f,wl,xl,y)	0,85±0,39	0,07±0,04	0,12±0,08
	III	7	8,91±1,77 ^(s)	4,21±1,05	3,82±0,98 ^(sl,wt)	0,74±0,22	0,07±0,04	0,08±0,04
	IV	9	7,15±2,32	2,47±1,00 ^(el)	3,89±1,20 ^(tl,x)	0,63±0,21	0,07±0,05	0,09±0,05
	V	9	7,44±1,44	3,00±0,97 ^(dl)	3,58±0,91 ^(ul,y)	0,66±0,20	0,07±0,04	0,12±0,07
B	I	9	6,65±1,35 ^(l)	4,28±1,07 ^(el,fl)	1,66±0,42 ^(z1,a2,t2)	0,53±0,18 ^(k2)	0,06±0,04 ^(l)	0,11±0,06
	II	8	9,37±3,18 ^(w)	6,18±2,90 ^(gl,hl)	2,22±0,90 ^(e2)	0,79±0,32	0,08±0,06	0,09±0,04
	III	10	9,72±2,18 ^(s,w)	5,45±2,21 ^(tl,tl)	3,19±0,92 ^(z)	0,86±0,17 ^(j,k2,t2)	0,12±0,06 ^(l,m,n)	0,10±0,06
	IV	10	5,83±1,27 ^(w)	2,00±0,60 ^(gl,tl)	3,19±0,97 ^(dl)	0,52±0,15 ^(l2)	0,06±0,03 ^(m)	0,06±0,03
	V	8	6,91±1,22 ^(w)	1,97±0,57 ^(bl,tl)	4,24±1,25 ^(k2,e2)	0,56±0,14 ^(j)	0,05±0,03 ^(o)	0,09±0,04
C	I	9	4,24±1,88 ^(a,b,c)	2,75±1,47	0,80±0,15 ^(g,d2,e2,t2)	0,58±0,39	0,03±0,03 ^(e2,p2)	0,12±0,10
	II	6	6,58±0,76 ^(a)	4,35±0,83 ^(kl)	1,60±0,21 ^(g,h,l)	0,54±0,09	0,06±0,01	0,04±0,01
	III	8	6,38±1,70 ^(b)	2,98±1,16	2,41±0,89 ^(d2)	0,82±0,39	0,08±0,03 ^(e2)	0,10±0,04
	IV	8	6,67±2,10 ^(l)	3,04±1,60	2,58±0,47 ^(h,e2)	0,88±0,37	0,07±0,02	0,11±0,05
	V	8	5,34±0,81	1,61±0,65 ^(kl)	2,58±0,75 ^(l2)	0,95±0,36	0,10±0,05 ^(p2)	0,09±0,02
D	I	8	8,69±2,94 ^(d,x)	6,05±2,60 ^(tl,ml)	0,99±0,33 ^(g2,h2,i2,j2)	1,32±0,52 ^(k,m2,n2)	0,03±0,03 ^(o)	0,32±0,10 ^(z2,t2,u2)
	II	8	12,33±2,07 ^(d,y,z,ab)	8,25±1,70 ^(tl,ol,pl)	2,54±0,47 ^(e2)	1,30±0,12	0,13±0,12 ^(o)	0,13±0,06 ^(p,e2)
	III	8	7,23±1,86 ^(s,y)	3,94±1,23 ^(tl,tl)	2,40±0,70 ^(k2)	0,74±0,34	0,14±0,06	0,04±0,03 ^(p,s2)
	IV	8	4,42±1,08 ^(e,x,z)	1,48±0,27 ^(tl,ol)	2,24±0,75 ^(l2)	0,56±0,18 ^(m2)	0,09±0,07	0,06±0,04 ^(t2)
	V	8	6,13±1,78 ^(d)	2,30±1,01 ^(ml,pl,rl)	2,84±0,89 ^(j2)	0,79±0,25 ^(k,n2)	0,10±0,06	0,11±0,03 ^(u2)

Objaśnienia:

Explanations:
n – liczba zwierząt w grupie

n – number of animals in a group

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p) – p≤0,05

r, s, t, u, w, x, y, z, a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, p1, r1, s1, t1, u1, v1, x1, y1, z1, a2, b2, c2, d2, e2, f2, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, p2, r2, s2, t2, u2) – p≤0,01

Tabela 4. Ilość białka całkowitego z podziałem na frakcje u prosiąt
Table 4. Volume of total protein with a split into fractions in piglets

Grupa zwierząt Group of animals	Termin badania Test date	n	Białko całkowite Total protein		Frakcje białka całkowitego Fractions of total protein			
			(g/L)	(g/L)	Albuminy Albumins	α-globuliny α-globulins	β-globuliny β-globulins	γ-globuliny γ-globulins
A	I	10	67,69±3,29 ^{a)}	17,50±2,06 ^{r)}	16,19±1,01 ^{u,w)}	14,65±0,95 ^{t,p)}	19,34±1,87 ^{e1,f)}	
	II	10	58,42±2,71	28,68±1,55 ^{v)}	11,20±0,75 ^{v)}	10,80±1,09 ^{o)}	7,74±0,68 ^{e1)}	
	III	6	50,63±2,81 ^{a)}	20,56±1,64	10,60±0,51 ^{w)}	9,38±0,46 ^{q)}	10,10±0,86 ^{f)}	
B	I	10	66,37±3,82	11,81±0,56 ^{c,1)}	14,47±0,97 ^{d)}	14,79±1,58 ^{e)}	25,31±1,70 ^{a1,b)}	
	II	10	57,33±1,57	26,69±0,99 ^{l,m)}	11,41±0,54 ^{d)}	10,64±0,59 ^{e)}	8,59±0,51 ^{a1)}	
	III	6	61,56±2,21	17,40±1,43 ^{c,m)}	14,52±1,38	12,63±0,61	17,02±1,26 ^{b)}	
C	I	10	70,61±2,46 ¹⁾	15,76±0,73 ^{n,o)}	14,46±0,59 ¹⁾	14,99±0,88 ^{y)}	25,41±0,98 ^{e1,d)}	
	II	10	52,50±2,69 ^{i,j)}	25,10±1,54 ^{p)}	10,78±0,72 ^{o)}	9,21±0,69	8,28±0,54 ^{e1)}	
	III	9	67,54±3,62 ³⁾	38,53±2,25 ^{o,p)}	12,05±0,91	9,27±0,56 ^{y)}	7,68±0,42 ^{d)}	
D	I	10	67,82±2,65 ^{b,k)}	17,68±2,17 ^{s)}	14,73±0,92 ^{x)}	13,49±0,65 ^{h,z)}	21,93±1,38	
	II	10	57,46±1,44 ^{k)}	28,61±1,17 ^{s)}	11,29±0,42 ^{x)}	9,13±0,41 ^{z)}	8,44±0,39	
	III	6	56,51±2,94 ^{b)}	23,90±1,08	12,04±0,82	10,69±1,04 ^{b)}	9,88±0,71	

Objaśnienia:

Explanations:

n – liczba zwierząt w grupie

n – number of animals in a group

a, b, c, d, e, f, g, h) – p ≤ 0,05

i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, x, y, z, a1, b1, c1, d1, e1, f1) – p ≤ 0,01

Tabela 5. Koncentracja przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom *E. coli*, *Streptococcus suis* typ 2 oraz *Erysipelothrix rhusiopathiae* u prosiątTable 5. Concentration of antibodies directed against antigens *E. coli*, *Streptococcus suis* type 2 and *Erysipelothrix rhusiopathiae* in piglets

Grupa zwierząt Group of animals	Klasa przeciwciał Class of antibodies	Termin badania Test date	n	Ilość przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi Quantity of antibodies directed against antigens		
				<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus suis</i> typ 2	<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>
A	IgA	I	10	0,136±0,007	0,236±0,015	0,266±0,021
		II	10	0,131±0,020	0,209±0,031	0,203±0,032
		III	10	0,187±0,023	0,256±0,034	0,292±0,031
	IgM	I	10	0,113±0,007 ^{a)}	0,176±0,008 ^{c)}	0,202±0,014
		II	10	0,111±0,013 ^{b)}	0,236±0,022 ^{c)}	0,213±0,015
		III	10	0,226±0,051 ^{a, b)}	0,211±0,014	0,200±0,018
	IgG	I	10	1,677±0,165	1,243±0,124	1,457±0,164
		II	12	1,022±0,083 ^{e)}	1,036±0,085	0,921±0,070 ^{j)}
		III	10	1,879±0,262 ^{e)}	1,568±0,230	1,754±0,215 ^{j)}
B	IgA	I	10	0,173±0,027	0,235±0,022	0,248±0,022
		II	10	0,165±0,025	0,280±0,042	0,259±0,032
		III	10	0,128±0,012	0,221±0,018	0,224±0,017
	IgM	I	10	0,129±0,013	0,185±0,012	0,197±0,011
		II	10	0,102±0,012	0,205±0,022	0,196±0,011
		III	10	0,163±0,027	0,188±0,014	0,193±0,022
	IgG	I	10	1,468±0,198	1,300±0,159	1,466±0,180
		II	10	1,236±0,137	1,161±0,100	1,089±0,127
		III	10	1,648±0,177	1,237±0,146	1,387±0,168
C	IgA	I	10	0,150±0,012	0,241±0,015	0,241±0,017
		II	10	0,137±0,010	0,233±0,016	0,217±0,015
		III	10	0,152±0,009	0,219±0,019	0,238±0,014
	IgM	I	10	0,102±0,007 ^{g, h)}	0,184±0,008	0,198±0,014
		II	10	0,121±0,015 ^{e)}	0,209±0,010	0,229±0,015 ^{d)}
		III	10	0,224±0,027 ^{h)}	0,204±0,011	0,182±0,007 ^{d)}
	IgG	I	10	1,461±0,113	1,262±0,090	1,337±0,110
		II	10	1,260±0,086 ⁱ⁾	1,199±0,069	1,114±0,090 ^{k)}
		III	10	1,802±0,136 ⁱ⁾	1,399±0,122	1,564±0,124 ^{k)}
D	IgA	I	10	0,162±0,013	0,261±0,021	0,257±0,020
		II	10	0,167±0,024	0,249±0,027	0,246±0,035
		III	10	0,175±0,018	0,258±0,028	0,230±0,022
	IgM	I	10	0,110±0,016 ^{f)}	0,192±0,020	0,194±0,019
		II	10	0,135±0,014	0,218±0,019	0,256±0,026
		III	10	0,327±0,069 ^{f)}	0,259±0,031	0,216±0,024
	IgG	I	10	1,764±0,209	1,400±0,156	1,611±0,189
		II	10	1,183±0,154	1,196±0,100	1,108±0,139
		III	10	1,821±0,239	1,396±0,186	1,646±0,197

Objaśnienia:

Explanations:

n – liczba zwierząt w grupie

n – number of animals in a group

a, b, c, d) – p<0,05

e, f, g, h, i, j, k) – p<0,01

– grupa A i C oraz A i D. Między uzyskanymi wartościami frakcji β -globulin nie odnotowano statystycznie istotnych różnic. Z kolei różnice między wartościami γ -globulin były statystycznie istotne ($p \leq 0,001$) między grupami A i B, A i C oraz A i D.

Porównując uzyskane wyniki pomiaru w poszczególnych grupach w kolejnych terminach badań, widoczny jest wzrost poziomu IgG dla *E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* oraz *Streptococcus suis* typ 2. Natomiast analizując uzyskane wartości dla klas IgA i IgM w kolejnych terminach, widoczne są utrzymujące się na stałym, zbliżonym do siebie poziomie wartości dla obu klas immunoglobulin *E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* i *Streptococcus suis* typ 2.

PODSUMOWANIE

Celem stosowania preparatów zawierających w swoim składzie immunoglobuliny jest wzrost krążących w organizmie przeciwciał ochronnych, a tym samym poprawa ochrony zdrowia zwierząt i niedopuszczenie do ich zakażenia. Podczas prowadzonej obserwacji notowano wzrost liczby komórek układu białokrwinkowego, w tym także istotnych z punktu obrony organizmu neutrofilii, monocytów oraz limfocytów. Podobnie wzrost koncentracji albumin widoczny był we wszystkich grupach, a zmiany w poszczególnych terminach badań były statystycznie istotne ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$). Frakcja α -globulin uległa statystycznie istotnym zmianom jedynie w okresie między dniem podania a 48 godz. po podaniu preparatów. Także frakcja γ -globulin podlegała tym samym wahaniom, a zmiany te były statystycznie istotne w grupach A, B i C.

Natomiast w kolejnych terminach badań statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,001$) dla poziomu albumin wykazano między grupami A, B i C w stosunku do grupy D, a także między grupą A i D, B i D oraz B i C dla poziomu globulin. Między poszczególnymi frakcjami globulin różnice statystycznie istotne odnotowano między frakcją α -globulin (grupy A i C, A i D) i γ -globulin (grupy A i B, A i C, A i D). Poziomy swoistych przeciwciał wskazywały na różnice w kolejnych terminach badań oraz między grupami A, B i C a grupą otrzymującą tylko żelazo (grupa D), jednakże uzyskane wartości nie były statystycznie istotne.

Podsumowując uzyskane wyniki, które poddano analizie statystycznej, należy wskazać, że w sytuacjach obniżenia odporności, złych warunków utrzymania zastosowanie tych preparatów jest działaniem warunkującym skuteczną ochronę młodego organizmu przed zachorowaniami nie tylko drobnoustrojami chorobotwórczymi, ale i warunkowo-chorobotwórczymi, które stanowią istotny problem w chowie średnio- i wielkotowarowym świń.

PIŚMIENNICTWO

- Deptuła W., Buczek J., 1981. Rozwój swoistej odporności humoralnej u świń. *Med. Wet.*, 8, 452–456.
Haława W., Stefaniak T., 2000. Indeks immunoglobulin całkowitych u cieląt w Przedsiębiorstwie Rolnym „DS”, [w:] Ślebodziński A.: Noworodek a środowisko. Poznań, 45–49.
Gołąb J., Kamiński M., 1998. Dojrzewanie limfocytów, [w:] Jakóbiński M.: Immunologia, PWN, Warszawa, 121–153.

- Jones G.E., Mould D.L., 1984. Adaptation of the guayaacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Res. Vet. Sci.*, 37, 87–92.
- Kaper J.B., Nataro J.B., Mobley H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 123–140.
- Pejsak Z., Truszczyński M.: 2007. Uodparnianie noworodków i młodych zwierząt. *Życie Wet.*, 3, 183–186.
- Rooke J.A., Bland I.M., 2002. The acquisition of passive immunity in the new-borne piglet. *Liv. Prod. Sci.*, 78, 13–23.
- Soto G.E., Hultgren S.J., 1999. Bacterial adhesins: common themes variations architecture and assembly. *J. Bacteriol.*, 181, 1059–1071.
- Stefaniak S., Nikołajczuk M., Rząsa A., 2004. Odporność bierna i czynna noworodków zwierząt gospodarskich, [w:] Stefaniak S.: Noworodek i środowisko. Wyd. ELMA, Wrocław, 109–117.
- Wiśniewski J., Siwicki K.A., Wiśniewska M., 2004. Odporność nabyta przekazywana przez matkę, [w:] Wiśniewski J.: Wprowadzenie do ogólnej i klinicznej immunologii weterynaryjnej. Wyd. UWM, Olsztyn, 157–165.

APPLICATION OF VARIOUS FORMS OF PASSIVE IMMUNIZATION OF PIGLETS IN THE PERIOD BEFORE WEANING IN THE CONDITIONS OF PIG BREEDING FARMS

Abstract. In the conditions of pig breeding farms insufficient transfer of colostrum immunity onto the progeny is a frequently encountered problem, therefore application of preparations containing (in their composition) immunoglobulins brings about increase of protective antibodies circulating in a piglet's organism. Application of the preparations containing in their composition fractions of immunoglobulins in experimental conditions caused increase cells of white blood system. Similarly, changes in the concentration of albumins and fractions α -, β - and γ -globulin as compared to the control group, were observed. Concentration of antibodies IgA, IgM and IgG against *E. coli*, *Streptococcus suis* type 2 and *Erysipelothrix rhusiopathiae* ranged in individual groups, but the observed values were not statistically significant in each of the tested periods.

Key words: bacteria, immunity, immunoglobulin, swine

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 12.03.2009

Do cytowania – For citation: Rypuła K., Stefaniak T., Kotwica-Wojewoda B., Popławski M., Błach J., Kaba J., 2009. Zastosowanie różnych form uodporniania biernego prosiąt w okresie przedodsadzeniowym w warunkach hodowli wielkostadnej. *Acta Sci. Pol., Med. Vet.*, 8(1), 39–49.

PORÓWNAWCZE BADANIA ZAWARTOŚCI MAKROELEMENTÓW W SUROWICY I OSOCZU KRWI KONI

Krystyna Pogoda-Sewerniak, Ewa Popiela, Witold Janeczek,
Anna Burek, Marta Świeżowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem badań było porównanie zawartości określonych składników mineralnych w surowicy oraz osoczu krwi 12 klinicznie zdrowych koni, utrzymywanych w jednolitych warunkach środowiskowych. Na podstawie wykonanych analiz stwierdzono, iż zawartość wszystkich badanych pierwiastków w surowicy mieściła się w granicach norm podawanych w piśmiennictwie. W dwóch próbach zawartość Ca, Mg i Fe w osoczu była niższa niż granica wykrywalności aparatu. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne obniżenie zawartości Ca, Fe i chlorków oraz podwyższenie zawartości K w osoczu, w porównaniu z wynikami uzyskanymi po analizie surowicy. Różnice te zostały spowodowane obecnością w osoczu wersenianu potasu (EDTA-K₂), który jako antykoagulant zaburzył wyniki oznaczeń elektrolitów.

Słowa kluczowe: składniki mineralne krwi, osocze, surowica, EDTA, konie

WSTĘP

Związki mineralne warunkują prawidłowe funkcjonowanie każdego organizmu żywego. Uczestniczą w licznych procesach fizjologicznych i biochemicznych: wchodzi w skład enzymatycznych kofaktorów, są składnikami budulcowymi kości i tkanek miękkich, uczestniczą w przemianach energetycznych, odgrywają znaczącą rolę w syntezie niektórych witamin, aminokwasów i hormonów, a także biorą udział w regulacji pH oraz ciśnienia osmotycznego [Wiśniewski 1999, Kośla 1999, Odrowąż-Sypniewska i in. 2005, Jamroz i in. 2005, Gruszka i in. 2005].

Nawet niewielkie zmiany ich stężenia w organizmie powodują zaburzenia w pracy ważnych dla życia układów, takich jak układ nerwowy, mięśniowy, kostny, a także narządów, m.in. serca i nerek [Tomaszewski 2001, Dembińska-Kieć i Naskalski 2002, Schottdorf-Timm i Maier 2004, Stewart i in. 2004].

Adres do korespondencji – Corresponding author: Krystyna Pogoda-Sewerniak, Zakład Higieny Zwierząt i Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 38c, 51-630 Wrocław

Pierwiastkami niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania organizmu koni oraz najczęściej oznaczanymi dla celów diagnostycznych są między innymi należące do makroelementów: Ca, P, Na, Mg, K oraz Cl. Nie mniej istotne funkcje spełniają także mikroelementy takie jak Fe, Mn, Cu, Zn, I, Co czy Se [Kania 1998, Kośla 1999].

Ich niedobór lub nadmiar może być przyczyną różnych zaburzeń od zmniejszenia wydajności pracy do chorób i upadków koni. W celu uzyskania informacji o ogólnym stanie zdrowia zwierzęcia i ewentualnego zdiagnozowania wczesnego stanu chorobowego wykonuje się badania laboratoryjne, w trakcie których oznacza się między innymi składniki mineralne we krwi [Neumeister i in. 2001, Szarska 2003].

Zalecany materiał badawczy jest surowica, ponieważ antykoagulanty powszechnie stosowane w celu zapobiegania krzepnięciu osocza mogą wpłynąć na wyniki oznaczeń elektrolitów w tym materiale. Aby wyeliminować błędy, konieczne jest zapoznanie się z zagadnieniami przedlaboratoryjnych problemów diagnostyki medycznej [Demińska-Kieć i Naskalski 2002].

Celem niniejszych badań było porównanie zawartości określonych składników mineralnych w surowicy oraz osoczu krwi 12 klinicznie zdrowych koni, utrzymywanych w jednakowych warunkach środowiskowych.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na 12 klinicznie zdrowych koniach, pochodzących z obszaru Dolnego Śląska. Sposób utrzymania i żywienia był jednakowy dla wszystkich osobników. Krew do badań biochemicznych pobrano jednorazowo we wczesnych godzinach rannych przed zadaniem obroku i pojeniem, z żyły szyjnej zewnętrznej (*vena jugularis externa*). Od każdego konia uzyskano po dwie próbki krwi.

W celu otrzymania osocza krew pobrano do dostępnej na rynku gotowej próbówki zawierającej odmierzoną ilość antykoagulantu – wersenianu potasu (EDTA-K₂). Do analiz surowicy materiał pobrano na skrzep do próbek z granulatem i natychmiast próbki zostały przewiezione do laboratorium analitycznego, gdzie pobraną krew odwirowano, a pozyskaną surowicę i osocze zamrożono w -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

W surowicy jak i osoczu oznaczono stężenie: Ca, P, Mg, Na, K, Fe oraz Cl⁻ przy użyciu aparatu analitycznego ABX Pentra 400 (Horriba ABX). Oznaczenie Ca, Mg, P, Fe wykonano metodą kolorymetryczną, stosując komercyjne odczynniki firmy Horriba ABX, natomiast Na, K i Cl⁻ – wykorzystując metodę potencjometryczną przy użyciu przystawki jonoselektywnej na tym samym aparacie. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i scharakteryzowano za pomocą wartości średnich oraz odchyłeń standardowych. Oceny porównawczej między osoczem a surowicą dokonano metodą jednoczynnikowej analizy wariancji, przeprowadzając ocenę statystyczną istotności różnic dla średnich testem t-Studenta (Statistica 8.0).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Średnie stężenia wybranych składników mineralnych w surowicy krwi koni we wszystkich przypadkach mieściły się w zakresach wartości referencyjnych, podawanych w literaturze krajowej i światowej. Wyniki badań własnych zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość wybranych składników mineralnych w surowicy i osoczu krwi koni (n = 12)
 Table 1. Content of selected mineral component in blood serum and plasma of horses (n = 12)

Składnik mineralny Mineral component	Materiał biologiczny Biological material	
	Surowica Serum x ± SD	Osocze Plasma x ± SD
K (mmol/l)	3,37 ± 0,62A	15,64 ± 1,5B
Cl (mmol/l)	106,14 ± 2,41A	95,35 ± 5,98B
Mg (mmol/l)	0,85 ± 0,10	pgw
Ca (mmol/l)	3,16 ± 0,15	pgw
P (mmol/l)	0,98 ± 0,18	0,95 ± 0,20
Na (mmol/l)	137,64 ± 2,74A	129,93 ± 8,50B
Fe (μmol/l)	29,33 ± 7,73A	3,30 ± 2,48B

AB – istotność różnic między grupami przy $p \leq 0,01$

AB – significant differences between groups at $p \leq 0,01$

pgw – poniżej granicy wykrywalności

pgw – below limit detection

Zawartość Ca w badaniach własnych wyniosła średnio 3,16 mmol/l. Podobne wyniki uzyskali Colahan i in. [1991], Lopez i in. [2006] oraz Mohri i in. [2007].

Fosfor kształtował się na średnim poziomie 0,98 mmol/l, natomiast Mohri i in. [2007] donoszą, że poziom tego pierwiastka we krwi koni wyniósł średnio $1,2 \pm 0,44$ mmol/l. Colahan i in. [1991] oznaczyli tę wartość na poziomie od 0,5 do 1,3 mmol/l, a Rose i Hodgson [1994] między 0,75 a 1,25 mmol/l. Szerszy zakres wartości referencyjnych podają Porter i McCashin [1997] – 0,39 do 2,10 mmol/l.

Stężenie sodu w badaniach własnych w surowicy wyniosło średnio $137,64 \pm 2,74$ mmol/l. Według Winnickiej [2002] stężenie tego pierwiastka u koni klinicznie zdrowych nie powinno wychodzić poza zakres 139,1–156,5 mmol/l, natomiast Colahan i in. [1991] wyznaczyli zakres wartości referencyjnych mieszczący się w granicach 132–140 mmol/l. Nieco szerszy przedział podaje Eikmeier [1982], 125–150 mmol/l. Stężenie jonów Na związane jest z aktywnością $\text{Na}+\text{K}^+ - \text{ATP-azy}$, której aktywność z kolei zależy od gatunku, płci, wieku osobnika oraz intensywności treningu fizycznego. Stąd mogą pojawiać się różnice w zakresach zawartości Na w surowicy krwi przedstawianych przez różnych autorów [Everts 2001].

Zawartość potasu w badaniach własnych wyniosła średnio $3,37 \pm 0,62$ mmol/l. Zakres stężenia jonów pierwiastka w surowicy krwi koni, wg Winnickiej [2002], powinien się mieścić w przedziale od 3,5 do 4,7 mmol/l. Colahan i in. [1991] uzyskali wyniki w zakresie 3,1–4,8 mmol/l. Eikmeier [1982] podaje zakres fizjologiczny od 2,8 do 4,5 mmol/l, natomiast Toribio i in. [2007], $4,2 \pm 0,3$ mmol/l.

Stężenie chlorków w badaniach własnych stwierdzono na poziomie średnio $106,14 \pm 2,41$ mmol/l. Winnicka [2002] podaje przedział od 90,2 do 107,2 mmol/l. Krumrych i in. [1995] oznaczyli zawartość Cl^- w surowicy krwi koników polskich na poziomie $99,37 \pm$

8,44 mmol/l. W literaturze światowej stężenie Cl⁻ w surowicy krwi koni określane jest na podobnym poziomie [Rose i Hodgson 1994, Colahan i in. 1991, Eikmeier 1982].

W badaniach własnych stężenie Mg wyniosło średnio $0,85 \pm 0,10$ mmol/l. Według Winnickiej [2002] wartość ta nie powinna wykraczać poza przedział 0,70–1,15 mmol/l. Podobne wartości podają Lopez i in. [2006], Toribio i in. [2007] oraz Mohri i in. [2007].

Zawartość Fe w badaniach własnych wyniosła średnio $29,33 \pm 7,73$ μ mol/l. Według Winnickiej [2002] zakres stężenia tego pierwiastka w surowicy krwi koni powinien się mieścić w zakresie 13,1–25,1 μ mol/l. Wyższą średnią koncentrację żelaza stwierdzili Kumrych i in. [1995] u koników polskich $26,97 \pm 8,25$ μ mol/l oraz Cieśla i Janiszewska [2001] u klaczy wyżrebionych w ciągu 12 godz. – $45,7$ μ mol/l. Mohri i in. [2007] podają zawartość tego parametru w przedziale $45,26 \pm 4,21$ μ mol/l. Stężenie Fe oznaczone w badaniach wymienionych autorów, pokrywało się z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych.

W osoczu krwi średnie stężenie wybranych składników mineralnych koni znacząco różniło się od wartości podawanych w piśmiennictwie. Wyniki uzyskane w badaniach własnych różnią się od tych podawanych przez Pikulę i in. [2001], uważanych za referencyjne. Szczególnie jest to widoczne w stężeniach Ca, Mg, Fe oraz K. Stężenie tych pierwszych pierwiastków było za niskie, natomiast potasu za wysokie; jest to związane z obecnością jonów tego pierwiastka w EDTA-K₂ użytego przy pobieraniu surowicy. Ponadto stężenie Ca i Mg, jak i stężenie Fe w 2 spośród 12 próbek, w osoczu było poniżej wykrywalności aparatu.

Zawartość fosforu wyniosła średnio $0,95 \pm 0,20$ mmol/l, sodu $129,93 \pm 8,50$ mmol/l, potasu $15,64 \pm 1,5$ mmol/l, natomiast zawartość chlorków w badaniach własnych oznaczono średnio na poziomie $95,35 \pm 5,98$ mmol/l. Średnie stężenie Fe wyniosło $3,30 \pm 2,48$ μ mol/l. Dla porównania, wyniki uzyskane przez Pikulę i in. [2001] w badaniach na koniach rasy wielkopolskiej i szlachetnej półkrwi pokazują, że zawartość Fe we krwi koni rasy wielkopolskiej wyniosła średnio $35,13 \pm 3,56$ mmol/l, podobnie w osoczu koni rasy szlachetnej półkrwi $34,50 \pm 3,41$ mmol/l. Niższe wartości w swoich badaniach uzyskał Mohri i in. [2007], $22,83 \pm 3,54$ μ mol/l.

Zawartość Mg oznaczona przez Pikulę i in. [2001] kształtowała się średnio w granicach $0,92 \pm 0,08$ mmol/l dla pierwszej rasy i $0,89 \pm 0,08$ mmol/l dla drugiej. Mohri i in. [2007] podaje stężenie Mg w osoczu krwi koni na poziomie $0,12 \pm 0,02$ mmol/l. W badaniach własnych zawartość tego pierwiastka była poniżej granicy wykrywalności.

Stężenie Ca w osoczu krwi koni wielkopolskich wyniosło średnio $2,63 \pm 0,16$ mmol/l, natomiast koni rasy szlachetna półkrwi $2,65 \pm 0,17$ mmol/l [Pikulę i in. 2001]. Według Mohri i in. [2007] stężenie Ca w osoczu krwi koni wyniosło $0,26 \pm 0,06$ mmol/l. Średnia zawartość fosforu i chlorków dla koni rasy wielkopolskiej liczyła odpowiednio $1,41 \pm 0,21$ mmol/l i $102,46$ mmol/l, a dla koni rasy szlachetnej półkrwi $1,28 \pm 0,16$ mmol/l oraz $102,86 \pm 3,87$ mmol/l. Podobną wartość dla tego pierwiastka podają Mohri i in. [2007], $1,17 \pm 0,37$ mmol/l.

Porównując zawartość wapnia w badanym materiale, stwierdzono, że jego średnie stężenie w surowicy wyniosło $3,16 \pm 0,15$ mmol/l, natomiast w osoczu nie stwierdzono obecności tego pierwiastka, ponieważ jego stężenie było poniżej wykrywalności aparatu.

Nie odnotowano różnic statystycznie istotnych między średnim stężeniem fosforu w surowicy krwi – $0,98 \pm 0,18$ mmol/l a stężeniem w osoczu – $0,95 \pm 0,20$ mmol/l. Wykazano natomiast statystycznie istotnie niższe ($p \leq 0,01$) średnie stężenie Na w oso-

czu, które wyniosło $129,93 \pm 8,50$ mmol/l w porównaniu z zawartością tego pierwiastka w surowicy – $137,64 \pm 2,74$ mmol/l.

Stwierdzono statystycznie istotnie wyższe ($p \leq 0,01$) stężenie potasu w osoczu krwi koni, gdzie liczyło średnio $15,64 \pm 1,5$ mmol/l w porównaniu z surowicą, gdzie stężenie tego pierwiastka było znacząco niższe i wyniosło średnio $3,37 \pm 0,62$ mmol/l.

Średnia zawartość chlorków w surowicy krwi, oznaczona w badaniach własnych, kształtowała się następująco $106,14 \pm 2,41$ mmol/l i była statystycznie istotnie wyższa ($p \leq 0,01$) od średniego stężenia w osoczu, gdzie wynosiła $95,35 \pm 5,98$ mmol/l.

Według przeprowadzonych badań średnie stężenie Mg w surowicy krwi koni wynosiło $0,85 \pm 0,10$ mmol/l, natomiast w osoczu nie stwierdzono obecności magnezu, ponieważ jego stężenie nie mieściło się w granicy wykrywalności aparatu.

W przypadku Fe stwierdzono statystycznie istotnie wyższe ($p \leq 0,01$) stężenie tego pierwiastka w surowicy krwi koni, gdzie średnio wynosiło $29,33 \pm 7,73$ μ mol/l niż w osoczu – $3,30 \pm 2,48$ μ mol/l.

PODSUMOWANIE

Stężenie Ca, Mg, Fe, Na oraz Cl⁻ w osoczu krwi, w badaniach własnych, jest zbyt niskie w porównaniu ze stężeniami odnotowanymi w surowicy krwi, jak również z danymi w piśmiennictwie fachowym. Przyczyną tego są właściwości chelatujące wersenianu potasu (EDTA-K₂), które polegają na tworzeniu kompleksów z jonami metali. Stężenie potasu w osoczu krwi koni jest znacznie podwyższone w porównaniu z jego stężeniem w surowicy, co także jest spowodowane oznaczaniem potasu w obecności wersenianu potasu.

Oznaczanie składników mineralnych w materiale biologicznym, jakim jest osocze, ze względu na używanie probówek z antykoagulantem nie jest zalecane. Antykoagulanty, do których zaliczamy m.in. EDTA-K₂, stosowane w trakcie pozyskiwania osocza powodują zaburzenia w oznaczaniu stężenia składników mineralnych, a tym samym uzyskiwanie błędnych wyników. W celu pozyskania jak najbardziej miarodajnych wyników zalecanym materiałem badawczym jest surowica krwi.

PIŚMIENICTWO

- Cieśla A., Janiszewska J., 2001. Koncentracja magnezu, cynku, miedzi i manganu w surowicy krwi ogierów różnych ras. *Fol. Univ. Agricult. Stetin. Zoot.*, 42(224), 23–26.
- Colahan P.T., Mayhew I.G., Merrit A.M., Moore J.N., 1991. *Equine Medicine and Surgery*. 4th edition. Am. Vet. Publ., Inc., Goleta. California.
- Dembińska-Kieć A., Naskalski W.J., 2002. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Urban & Partner, Wrocław.
- Eikmeier H., 1982. Arbeitswerte in der Laboratoriumsdiagnostik beim Pferd. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 95, 5, 85–86.
- Everts M.E., 2001. Potassium homeostasis during exercise in domestic species: The role of the sodium-potassium pump in skeletal muscle. *Vet. Sci. Tomorrow*, 1, 1–13.
- Gruszka M., Odrowąż-Sypniewska G., Pater A., 2005. Znaczenie fosforu i fosforanów w organizmie. *In Vitro Explorer*, 2(4), 9–12.

- Jamroz D., Buraczewski S., Kamiński J., 2005. Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. T. 1, Fizjologiczne i biochemiczne podstawy żywienia zwierząt. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Kania B., 1998. Znaczenie magnezu dla zwierząt. *Med. Wet.*, 54(6), 378-381.
- Kośla T., 1999. Biologiczne i chemiczne zanieczyszczenia produktów rolnych. Wyd. SGGW, Warszawa.
- Krumrych W., Wiśniewski E., Dąbrowska J., Danek J., 1995. Biochemical blood indexes of Polish Primitive Horses kept in stable breeding. *Arch. Vet. Pol.*, 35, 3-4, 169-179.
- Lopez I., Mendoza F.J., Mayer-Valor R., Augilera-Tejero E., 2006. Fractionation of calcium and magnesium in equine serum. *Am. J. Vet. Res.*, 67, 3, 463-466.
- Mohri M., Allahyari L., Sardari K., 2007. Effects of Common Anticoagulants on Routine Plasma Biochemistry of Horse and Comparison with Serum. *J. Equine Vet. Sci.* 27, 7, 234-238.
- Neumeister B., Besenthal I., Liebich H., 2001. Diagnostyka laboratoryjna. Volumed, Urban & Partner, Wrocław.
- Odrowąż-Sypniewska G., Pater A., Gruszka M., 2005. Rola magnezu w ustroju. *In Vitro Explorer*, 2(4), 13-16.
- Pikuła R., Janus K., Smugała M., Grzesiak W., Tabiszewska I., 2001. Stężenie wybranych pierwiastków w osoczu krwi koni. *Folia. Univ. Agric. Stetin. Zoot.*, 41, 63-66.
- Porter B., McCashin F.B., 1997. Analysis of normal equine serum using the SMA 12/60 Auto-Analyser. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 72, 1629-1635.
- Rose R.J., Hodgson D.R., 1994. Hematology and Biochemistry in Principles and Practice of Equine Sport Medicine The Athletic Horse. Wyd. W.B. Saunders Comp. USA., 63-78.
- Schottdorf-Timm C., Maier V., 2004. Badania laboratoryjne: odczytywanie wyników. Muza, Warszawa.
- Stewart A.J., Hardy J., Kohn C.W., Toribio R.E., Hinchcliff K.W., Silver B., 2004. Validation of diagnostic testes for determination of magnesium status in horses with reduced magnesium intake. *Am. J. Vet. Res. Vol.*, 65, 4, 422-430.
- Szarska E., 2003. Znaczenie badań diagnostycznych krwi w ocenie stanu zdrowia oraz efektywności treningu koni wyścigowych i sportowych. Wyd. AR, Wrocław.
- Tomaszewski J., 2001. Diagnostyka laboratoryjna: podręcznik dla studentów medycyny. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa.
- Toribio R.E., Kohn C.W., Rourke K.M., Levine A.L., Rosol T.J., 2007. Effects of hypercalcemia on serum concentration of magnesium, potassium and phosphate and urinary excretion of electrolytes in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 68, 5, 543-554.
- Winnicka A., 2002. Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wyd. SGGW, Warszawa.
- Wiśniewski E., 1999. Zaburzenia metabolizmu wapnia i fosforu u koni. *Nowa Wet.*, 4, 24-27.

COMPARATIVE STUDIES OF THE CONTENT OF CALCIUM, MAGNESIUM, SODIUM, PHOSPHORUS, POTASSIUM, CHLORIDES AND IRON IN HORSES BLOOD SERUM AND PLASMA

Abstract. The aim of this study was compared the content of the mineral components in twelve clinically healthy horses, kept under the same environment conditions. The concentration of all analyzed elements in serum was within normal range according to professional literature. Whereas, content of Ca, Mg and Fe in two samples of blood plasma was below the minimum detection limit of a device. On the other hand, it was detected significantly decrease of Ca, Fe and chlorides contents and increase of K content in plasma in comparison with performances of serum analyses. These differences were affected by the presence of Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt dehydrate (EDTA -K₂), which as an anticoagulant disturbed results of electrolyte determination.

Key words: horses, blood plasma, blood serum, blood mineral components, EDTA

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 12.03.2009

Do cytowania – For citation: Pogoda-Sewerniak K., Popiela E., Janeczek W., Burek A., Świeżowska M., 2009. Porównawcze badania zawartości makroelementów w surowicy i osoczu krwi koni. Acta Sci. Pol., Med. Vet. 8(1), 51–57.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Zbigniew Dobrzański, Magdalena Skiba, Aleksandra Brożyńska, Monika Kowalska-Górska

Zawartość wybranych metali ciężkich w mleku przeżuwaczy
(krów i kóz) z rejonów przemysłowych i czystych ekologicznie
The evaluation of milk selected trace elements levels in ruminants
(cows and goats) reared in industrial and nonpolluted areas 3

Katarzyna Płoneczka-Janeczko, Krzysztof Rypuła, Krzysztof Janeczko

Status serologiczny pojedynczego osobnika
w kontekście interpretacji badań
w kierunku neosporozy bydła
The serostatus of the single animal regarding bovine neosporosis
and interpretation of study results 15

Katarzyna Płoneczka-Janeczko

Proteinogram jako badanie uzupełniające
w diagnostyce monocytarnej erlichiozy psów
Serum protein profile as a supplementary examination
in diagnose of canine monocytic ehrlichiosis 27

Krzysztof Rypuła, Tadeusz Stefaniak, Barbara Kotwica-Wojewoda, Marek Popławski, Joanna Błach, Jarosław Kaba

Zastosowanie różnych form uodporniania biernego prosiąt
w okresie przedodsadzeniowym w warunkach hodowli wielkostadnej
Application of various forms of passive immunization
of piglets in the period before weaning
in the conditions of pig breeding farms 39

Krystyna Pogoda-Sewerniak, Ewa Popiela, Witold Janeczek, Anna Burek, Marta Świeżowska

Porównawcze badania zawartości makroelementów
w surowicy i osoczu krwi koni
Comparative studies of the content of calcium, magnesium, sodium,
phosphorus, potassium, chlorides and iron in horses blood serum and plasma 51