

Leptospiroza owiec na podstawie badań serologicznych

MIROŚLAW KRAWCZYK

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Antczaka 39/41, 87-100 Toruń

Krawczyk M.

Serological studies on leptospirosis in sheep

Summary

The purpose of the study was to determine the degree of leptospiral infection in sheep within the Toruń province. Altogether 647 ovine sera originating from 5 farms were examined. The microscopic agglutination test with 17 pathogenic serovars and 1 non-pathogenic (patoc) was performed. Sera reacting to the antigen in dilution at a minimum ratio of 1:100 were considered to be positive. The mean seroprevalence of the examined sheep population was 3.4%; whereas in individual farms the following results were obtained: 1.6%, 18.2%, 9.1%, 14.1%, 4.5%. Most of the positive reactions were with serovar patoc (25%), then with sejroe, autumnalis and australis (up to 13%). Significant statistical differences were found when analysing the frequency in which positive results occurred. In the group of animals at the age of 8 to 10 years infection amounted to 26% of individuals whereas animals with the fewest positive results were noted in the 0 to 2 years group (no positive results).

Keywords: leptospirosis, sheep, leptospira serovars in Poland.

Owce wrażliwe są na zakażenie różnymi serowariantami leptospir. Wrażliwość ta po raz pierwszy została udowodniona eksperymentalnie przez Melanidiego w 1933 r. Objawy chorobowe u tego gatunku zwierząt notuje się jednak stosunkowo rzadko i są one bardzo zróżnicowane. W ostrych przypadkach obserwuje się hemoglobinurię, podwyższenie ciepłoty wewnętrznej (od 0,5 do 2°C powyżej normy na 4-6 dzień po ekspozycji na zarazek), która zazwyczaj trwa 4-5 dni (10), anemię, zaburzenia ze strony układu pokarmowego (atonia przedżołądków i jelit) oraz niekiedy żółtaczkę (3, 14). W podoстрыm i przewlekłym przebiegu stwierdza się: spadek produktywności, charłactwo, przewlekłe zapalenie nerek. Najczęściej objawy kliniczne występują u młodych zwierząt (do 1 roku życia). Nierzadko w trakcie choroby dochodzi do poronień lub rodzenia słabych, niezdolnych do życia jagniąt (8, 14). McKeown i wsp. (15) opisali przypadek bezmleczności owiec na skutek zakażenia serowariantem *hardjo*. Leptospiry wykazują silne powinowactwo do nerek, usadawiając się zwłaszcza w proksymalnej części kanalika nerkowego. Stamtąd okresowo lub stale wydalane są wraz z moczem do środowiska. Takie siewstwo nerkowe może trwać miesiące, a nawet lata (6, 16) i stanowić poważne zagrożenie epizootyczne. Mimo iż wielokrotnie udawało się izolować zarazek z poronionych płodów, a także wykazywać u nich miana diagnostycznie istotne (5, 8), do tej pory nie udało się w sposób jednoznaczny stwierdzić, czy leptospiry zasiedlają na dłuższy czas układ rozrodczy. Farina i wsp. (9) zakazili 9 owiec (6 nieciężarnych samic i 3 samce) serowariantem *hardjo*, następnie poddali ba-

daniom bakteriologicznym, immunohistochemicznym jądra, prostatę, macicę, gruczoły opuszkowo-cewkowe. W żadnym przypadku nie udało się stwierdzić obecności zarazka w tych narządach, natomiast w nerkach wykazywano obecność leptospir. Podobne wyniki uzyskał Cerri i wsp. (4) u naturalnie zakażonych owiec.

Celem pracy było określenie, na podstawie badań serologicznych, stopnia zakażenia leptospirami owiec oraz najczęściej występujących u nich serowariantów na obszarze województwa toruńskiego. Uwzględniono także częstość zakażenia w poszczególnych grupach wiekowych.

Materiał i metody

Badaniami serologicznymi objęto łącznie 647 owiec pochodzących z 5 gospodarstw znajdujących się na terenie jednego województwa. Zwierzęta podzielono na grupy wiekowe (tab. 1). Owce nie były szczepione przeciw leptospirozie. Materiałem do badań była surowica, którą uzyskiwano przez odwirowanie krwi pobranej z żyły jarzmowej w ilości nie mniejszej niż 10 ml. Surowice, jeśli nie były badane tego samego lub następnego dnia, zamrażano w temp. -20°C i przechowywano aż do czasu badania. W analizie serologicznej wykorzystano odczyn aglutynacji mikroskopowej (OAM), wykrywający przeciwciała z grupy IgM oraz IgG (13) wg Instrukcji nr 35 Min. Roln. z 1974 r. z użyciem żywych hodowli leptospir należących do 17 serowariantów gatunku *Leptospira interrogans*: *icterohaemorrhagiae* (szczep RGA), *grippotyphosa* (szczep Moskva V), *sejroe* (szczep M84), *hardjo* (szczep hardjoprajitno), *trassovi* (szczep Perepelicin), *pomona* (szczep Pomona), *canicola* (szczep Hond Utrecht IV), *australis* (szczep

Balico), *ballum* (szczep Mus 127), *hebdomadis* (szczep Hebdomadis, *poi* (szczep Poi), *caledoni* (szczep Caledoni), *zanoni* (szczep Zanoni), *cynopteri* (szczep 3522CO), *autumnalis* (szczep Akiyami A), *bataviae* (szczep Van Tienen), *bratislava* (szczep Jeźbratislava) oraz jednego serowariantu *Leptospira biflexa*: *patoc* (szczep Patoc I). Antygenem użytym do wykonania odczynu aglutynacji mikroskopowej były żywe 7-10 dniowe hodowle leptospir namnożone w temperaturze 28°C na podłożu płynnym wyprodukowanym przez firmę Difco Laboratories (Bacto-Leptospira Medium Base EMJH + Bacto Leptospira Enrichment EMJH). Musiał on spełniać 3 podstawowe warunki:

– czystości – badanie przez posiew na podłoże z krwią i inkubacja 37°C przez 24 h (brak wzrostu),

– aglutynabilności – reakcja w odczynie aglutynacji mikroskopowej z homologiczną dla danego szczepu surowicą odpornościową,

– gęstości – ok. 10⁸ leptospir/ml, wykazujących intensywne ruchy.

Do badanej surowicy rozcieńczonej wstępnie 1:50 dodawano w jednakowej objętości antygen i inkubowano w temp. pokojowej przez 90 min. (końcowe rozcieńczenie 1:100). Jednocześnie nastawiano próby kontrolne bez surowicy (z wodą destylowaną), celem sprawdzenia czy antygen nie ma skłonności do tworzenia samoistnych zlepów. Aglutynację przynajmniej 50% leptospir uznawano za wynik dodatni świadczący o kontakcie zwierzęcia z zarazkiem. W przypadku reakcji pozytywnej z surowicą rozcieńczoną 1:100, nastawiano kolejne rozcieńczenia aż do uzyskania wyniku ujemnego. Otrzymane dane poddano analizie statystycznej stosując test χ^2 .

Wyniki i omówienie

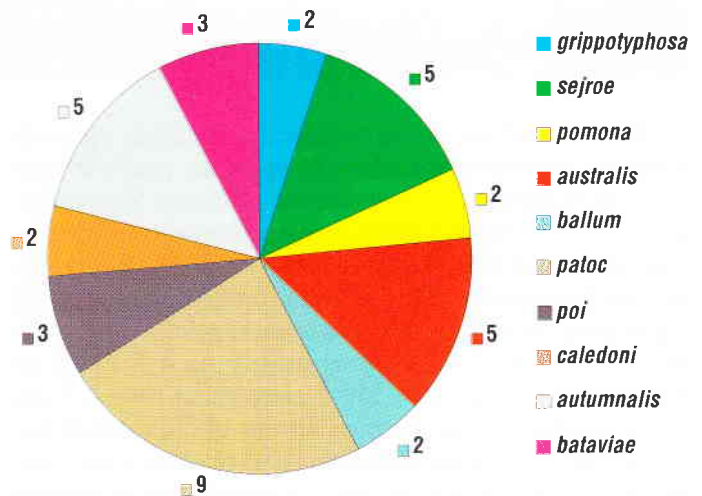
Wyniki badań serologicznych przedstawione zostały w tab. 2.

Średnie zakażenie badanej populacji owiec wyniosło 3,4%. Zaobserwowano pewną prawidłowość polegającą na tym, że im stado liczyło więcej osobników, tym mniejszy był odsetek zwierząt dodatnio reagujących. W przypadku gospodarstwa B liczącego 33 osobniki, reakcje dodatnie stwierdzano u 18,2% badanych zwierząt; w stadzie składającym się z 64 sztuk (gosp. D) u 14,1%; w gospodarstwie E liczącym 112

Tab. 1. Wiek badanych owiec (liczba sztuk)

Gospodarstwo	Wiek (lata)						Razem
	>0 >2	>2 >4	>4 >6	>6 >8	>8 >10	>10 >12	
A	98	144	69	56	1	4	372
B	4	4	16	8	1	0	33
C	5	25	36	0	0	0	66
D	0	4	37	3	14	6	64
E	21	51	33	4	3	0	112
Razem	128	228	191	71	19	10	647

sztuk dodatkowo reagowało 4,5% osobników, natomiast w najliczniejszym, bo złożonym z 372 osobników stadzie (z gosp. A), tylko 1,6% zwierząt posiadało przeciwciała aglutynacyjne na poziomie diagnostycznie istotnym. Nie można było ustalić przy zastosowaniu metod statystycznych czy prawidłowość ta ma charakter przypadkowy, czy też związana jest z małą liczbą gospodarstw, z których pochodził materiał do badań. Analizę występowania reakcji dodatnich z poszczególnymi serowariantami przedstawia ryc. 1. Większość



Ryc. 1. Procentowy udział poszczególnych serowariantów, które reagowały z badanymi surowicami

Tab. 2. Występowanie przeciwciał przeciwko poszczególnym serowariantom *Leptospira interrogans* oraz *Leptospira biflexa* (serowariant *patoc*) w badanych gospodarstwach

Gospodarstwo	Serowariant																		Zakażenie stada (%)
	icter.	grip.	sej.	taras.	pom.	can.	austr.	bal.	hebd.	patoc	poi	caled.	zanoni	cynop.	aut.	bat.	hardjo	brat.	
A	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1,6
B	0	0	5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	18,2
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	5	0	0	0	9,1
D	0	0	0	0	0	0	4	2	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	14,1
E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	4,5
Razem	0	2	5	0	2	0	5	2	0	9	3	2	0	0	5	3	0	0	3,4*

Objaśnienia: icter. – icterohaemorrhagiae, grip. – grippotyphosa, sej. – sejroe, taras. – tarassovi, pom. – pomona, can. – canicola, austr. – australis, bal. – ballum, caled. – caledoni, cynop. – cynopteri, aut. – autumnalis, bat. – bataviae, brat. – bratislava;

* – niektóre surowice reagowały z więcej niż jednym serowariantem, dlatego podany wynik nie jest równoznaczny z rezultatem jaki zostałyby otrzymane w wyniku sumowania wszystkich reakcji dodatnich.

Tab. 3. Reakcje serologiczne u owiec w poszczególnych przedziałach wiekowych (liczba)

Reakcje	Wiek (lata)						Razem
	>0 >2	>2 >4	>4 >6	>6 >8	>8 >10	>10 >12	
Dodatnie	0	3	7	5	5*	2*	22
Ujemne	128	225	184	66	14	8	625
Razem	128	228	191	71	19	10	647

Objaśnienie: * – różnica statystycznie istotna przy $p < 0,001$.

dotatnich reakcji (25%), stwierdzono z serowariantem *patoc* należącym do saprofitycznego gatunku *Leptospira biflexa*. Uwzględniając patogenne leptospiry najczęściej notowano reakcje pozytywne z serowariantami *autumnalis*, *australis* oraz *sejroe* po 13%, rzadziej z *poi* oraz *bataviae* po 8%. Badania przeprowadzone w Anglii i Walii wykazały, że najczęściej reakcje dodatnie występowały z antygenem *autumnalis* – 7,3%, *hardjo* – 6,4%, *bratislava* – 3,4% oraz *hebdomadis* – 2% (11). Inaczej przedstawiają się wyniki badań wykonane w Australii. Na 731 surowic w odczynie aglutynacji mikroskopowej dodatnie wyniki uzyskano w: 32,3% z serowariantem *hardjo*, 1,9% z *tarassovi*, a 1,1% z *pomona* (7). Serowariant *hardjo* uznawany był za patogen zaadaptowany do organizmu bydła i typowy dla tego gatunku. Pojedyncze dodatnie reakcje u owiec wiązano z przypadkowym zakażeniem od krów, które razem z owcami korzystały z tych samych pastwisk. Sądzono, że u owiec nie dochodzi do zajęcia nerek oraz do aktywnego siewstwa. Cousins i wsp. (6) udowodnili jednak możliwość wydalania z moczem tego zarazka nawet przez 11 miesięcy. Hathaway i wsp. (12) wykazali, że 6,3% surowic owiec posiadało przeciwciała przeciw serowariantowi *hardjo*. W badaniach własnych nie zaobserwowano żadnej dodatniej reakcji z tym serowariantem. W innym doświadczeniu Hathaway i wsp. (11) wykazali, że krzyżowe reakcje z antygenem *autumnalis* mogą wystąpić w przypadku zakażenia owiec leptospirami z serogrupy *australis*. W przeprowadzonych badaniach własnych na 5 reakcji dodatnich z serowariantem *australis* i 5 z *autumnalis* nie stwierdzono ani jednego takiego przypadku. Odnotowano natomiast występowanie reakcji krzyżowych między antygenami *australis* i *ballum* oraz *australis* i *bataviae*.

Większość reakcji dodatnich zachodziła w rozcieńczeniu surowicy 1:100, tylko 6 surowic reagowało w rozcieńczeniu 1:200 (przeważnie z *sejroe*), a tylko 1 w rozc. 1:400 (*sejroe*). Analizując częstość zakażeń leptospirozowych w odniesieniu do grup wiekowych (tab. 3) stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p < 0,001$). Stopień zakażenia leptospirami wyraźnie zwiększał się wraz z wiekiem zwierząt, by w przedziale 8-10 lat dawać najwięcej reakcji dodatnich. Jest to o tyle zrozumiałe, że zwierzęta żyjące dłużej mają większą szansę zetknięcia się z zarazkami, przy czym kontakt taki nie zawsze musi kończyć się chorobą, ale zazwyczaj łączy się z długim okresem utrzymywania się przeciwciał w organizmie. Nieznaczne obniżenie

wskaznika reakcji dodatnich z 26 do 20% notowano w grupie najstarszych owiec (od 10 do 12 lat). Może to być związane z faktem, że zwierzęta o obniżonej produktywności (więc także i te trwale zakażone) są z hodowli eliminowane.

Bez wykonania badań hodowlanych i izolacji zarazka nie jest możliwe określenie odsetka aktywnych siewców. Technika hodowli leptospor z moczu jest jednak czasochłonna i często obarczona dużym błędem, gdyż zwierzęta zazwyczaj wydalają leptospiry okresowo. Natomiast OAM, mimo iż jest pracochłonny, zwłaszcza przy użyciu dużej ilości serowariantów cechuje się dostateczną czułością i swoistością. Badania serologiczne umożliwiają ocenę sytuacji epizootycznej i podjęcie zwalczania (metafilaktyka streptomycyną), a w dalszym etapie szczepień zapobiegawczych. Ponieważ leptospiroza jest groźną zooantroponozą, istnieje potencjalne niebezpieczeństwo transmisji zarazka na człowieka. W Nowej Zelandii udowodniono, że 1-3,8% populacji owiec rozsiewa leptospiry z moczem (1). Największe ryzyko zakażenia ludzi niesie praca w rzeźni, zwłaszcza przy nieostrożnym obchodzeniu się z pęcherzem moczowym i nerkami, udzielanie pomocy porodowej bez odpowiedniego zabezpieczenia oraz bezpośrednia opieka nad hodowlą (2). Hodowcy, a także lekarze weterynarii powinni zdawać sobie sprawę z faktu, że stado pozornie zdrowe, może być zakażone leptospirami. Każde poronienie, czy rodzenie słabych jagniąt, a także spadek wydajności hodowlanej stada powinno nasuwać podejrzenie leptospirozy.

Przedstawione wyniki badań oparte na materiale pochodzącym tylko z jednego województwa potwierdzają obecność zakażonych osobników w stadach owiec, co może stanowić istotny problem z punktu widzenia zdrowia człowieka i zwierząt gospodarskich. Dlatego też bardzo ważną sprawą jest stały serologiczny monitoring stad owiec, z uwzględnieniem badań w kierunku tej choroby.

Piśmiennictwo

1. Bahaman R.: The serological and cultural prevalence in sheep of leptospiral infection in the North Island of New Zealand. Praca dokt., Massey University Palmerston North, 1981.
2. Blackmore D. K., Schollum L.: N. Z. Med. J. 28, 494, 1982.
3. Bokori J., Kemenes F., Szemeredi Gy., Szeky A.: Acta vet. Acad. Sci. Hung. 10, 2, 1960.
4. Cerri D., Nuvoloni R., Elbani V., Pedrini A., Mani P., Andreani E., Farina R.: New Microbiol. 19, 175, 1996.
5. Clark A. M.: Vet. Rec. 134, 283, 1994.
6. Cousins D. V., Ellis T. M., Parkinson J., McGlashan C. H.: Vet. Rec. 124, 123, 1989.
7. Cousins D. V., Robertson G. M.: Aust. Vet. J. 63, 36, 1986.
8. Ellis W. A., Bryson D. G., Neill S. D., McParland P. J., Malone F. E.: Vet. Rec. 112, 291, 1983.
9. Farina R., Cerri D., Renzoni G., Andreani E., Mani P., Elbani V., Pedrini A., Nuvoloni R.: New Microbiol. 19, 235, 1996.
10. Faine S.: Guidelines for the control of leptospirosis. WHO offset Publication No 67, 61, 1982.
11. Hathaway S. C., Little T. W. A., Stevens A. E.: Vet. Rec. 110, 99, 1982.
12. Hathaway S. C., Wilesmith T. W., Little T. W. A.: Vet. Rec. 114, 428, 1984.
13. Heath S. E., Johnson R.: JAVMA 205, 1518, 1994.
14. Manickavel K., Kalyanasundaram C. K., Venkataraman K. S., Rao V. N. A., Thangavelu S.: Indian Vet. J. 68, 503, 1991.
15. McKeown J. D., Ellis W. A.: Vet. Rec. 118, 482, 1986.
16. Michna S. W.: Vet. Rec. 86, 484, 1970.

Adres autora: lek. wet. Miroslaw Krawczyk, ul. Antczaka 39/41, 87-100 Toruń