

# Występowanie i diagnostyka zakażeń mykoplazmami u przeżuwaczy

MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, KATARZYNA DUDEK, DARIUSZ BEDNAREK

Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Szymańska-Czerwińska M., Dudek K., Bednarek D.

## Occurrence and diagnosis of mycoplasma infections in ruminants

### Summary

The article concentrates on diagnostic aspects of the major mycoplasma diseases in ruminants. Among them particular attention is given to: bovine contagious pleuropneumonia and contagious agalactia of sheep and goats, and an involvement of mycoplasmal etiological agent in bovine respiratory disease (BRD). The diagnosis of mycoplasma infections is based on serological methods such as: Elisa test, complement fixation test (CFT), and Western blot. The culture and identification of *Mycoplasma* spp. are possible through the use of specific liquid or solid Eaton's media. The doubtful cases are confirmed by molecular biology methods (PCR and DGGE).

**Keywords:** mycoplasma, ruminants, diagnosis

Mykoplazmy są drobnoustrojami pozbawionymi sztywnej ściany komórkowej, posiadają tylko trójwarstwową błonę cytoplazmatyczną, co powoduje, że są bardzo wrażliwe na działanie czynników środowiskowych. Trudno wyhodować je też w warunkach laboratoryjnych. Drobnoustroje te są wrażliwe na działanie światła słonecznego i wysuszenie. Uważane są za warunkowo chorobotwórcze, to znaczy, że mogą wywołać chorobę u zwierząt dopiero przy zmniejszonej ich odporności na zakażenie. Następuje to zwykle wtedy, gdy zwierzęta znajdują się w niekorzystnych warunkach zoohigienicznych i żywieniowych. Mykoplazmy bardzo często są przyczyną różnorodnych zaburzeń zdrowotnych u przeżuwaczy (6).

Jedną z najważniejszych chorób układu oddechowego wywoływaną przez drobnoustroje z rodzaju *Mycoplasma* jest zaraza płucna bydła (contagious bovine pleuropneumonia – CBPP). Zpb występuje głównie u bydła i gatunków pokrewnych, takich jak: bawoły, bizony, renifery i antylopy (6). U bydła w odniesieniu do CBPP występuje wyraźne zróżnicowanie rasowe pod względem podatności na zachorowanie. Europejskie rasy bydła są bardziej wrażliwe na tę chorobę niż bydło afrykańskie. CBPP jest wysoce zaraźliwą ostrą, podostrą lub przewlekłą chorobą wywoływaną przez *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*Mmm*SC), przebiegająca w postaci włóknikowego zapalenia płuc i surowiczego-włóknikowego zapalenia opłucnej. Klinicznie zaraza płucna manifestuje się u bydła objawami ze strony układu oddechowego, takimi jak: przyspieszony oddech, duszność, wypływ z nozdrzy, kaszel, czasami obrzęki śródpiersia oraz objawami ogólnymi, jak: wysoka gorączka, apatia, brak apetytu, spadek wydajności mlecznej. U niektórych krów choroba może przebiegać przez dłuższy czas w formie subklinicznej, trudnej do rozpoznania. Zaraza płucna bydła wpisana jest

obecnie na tzw. jednolitą listę chorób zakaźnych (Grupa II. Choroby bydła) zgłaszanych do Office International des Epizooties (O.I.E) i podlega obowiązkowi zwalczania z urzędu. CBPP jest chorobą występującą endemicznie w Afryce i Azji. W przeszłości epidemie zarazy płucnej występowały również w Europie (8). W większości krajów europejskich eradykowano jednak chorobę na początku XX wieku (16). W Polsce ostatnie kliniczne przypadki zpb notowano w 1936 r. Antygenowo pokrewne do form SC *M. mycoides* subsp. *mycoides* są szczepy LC (large colonies), które uważane są za patogenne zwłaszcza dla do owiec i kóz. Ponadto mogą być przyczyną stanów zapalnych stawów (polyarthrititis) i spojówek (conjunctivitis) u cieląt oraz rzadziej *mastitis* u krów.

Inną ważną chorobą wywoływaną przez mykoplazmy u małych przeżuwaczy jest zakaźna bezmleczność owiec i kóz (contagious agalactia, CA). Pierwotnym czynnikiem etiologicznym tej choroby jest *Mycoplasma agalactiae*. W Polsce ta jednostka chorobowa podlega obowiązkowi rejestracji. Z notowanych przypadków zapalenia i stawów u kóz o przebiegu klinicznym zbliżonym do klasycznego obrazu choroby, którym często towarzyszą również stany zapalne płuc, izolowano również inne gatunki mykoplazm, takie jak: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*) oraz *M. putrefaciens*. Zakażenia na tle *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*Mmm*LC) występują głównie u kóz, a objawiają się przede wszystkim: zapaleniem wymienia z objawami bezmleczności, stanem zapalnym stawów, opłucnej i płuc oraz zapaleniem spojówek i rogówki. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*) jest szeroko rozpowszechnionym patogenem w Afryce Północnej. Do zakażeń tym gatunkiem mykoplazm dochodzi stosunkowo rzadko i to zazwyczaj u kóz (7).

*Mycoplasma putrefaciens* dość często występuje w zachodniej Europie u kóz, wywołując zapalenia wymienia i bezmleczność oraz ciężkie zapalenia stawów. W USA patogen ten powodował liczne ronieńca i śmierć samic oraz bezgorączkowe, ciężkie stany zapalne stawów u matek i ich potomstwa (10).

Mykoplazmy są również jednym z istotnych czynników w złożonej etiologii enzootycznej bronchopneumonii cieląt (EBC). Choroba ta u cieląt początkowo przebiega z objawami zapalenia oskrzeli o różnym stopniu nasilenia, a następnie przechodzi w zapalenie płuc. Od zwierząt chorych oraz z materiału patologicznego pochodzącego od padłych cieląt izoluje się oprócz wirusów (BRSV, BHV-1) i innych drobnoustrojów również mykoplazmy, takie jak: *M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* i *Ureoplasma diversum* (5). Na terenie UK i Stanów Zjednoczonych odnotowano też udział obcej gatunkowo mykoplazmy w etiologii EBC, tj. *Mycoplasma canis*. Prawdopodobnym źródłem infekcji był kontakt bydła z psami będącymi nośnikami tej bakterii. Na tej podstawie uważa się obecnie, że *Mycoplasma canis*, którą izolowano wyłącznie od bydła z problemami oddechowymi, może być istotna w etiologii zapalnia płuc również u przeżuwaczy (15).

Bardzo często izolowanym obecnie gatunkiem mykoplazm od bydła jest *M. bovis*, którą po raz pierwszy wyosobniono od krów mających kliniczne objawy *mastitis*. Do zakażeń tym patogenem u bydła dochodzi często za pośrednictwem układu rozrodczego w trakcie inseminacji. Patogen ten występuje również u owiec i kóz, które mogą być źródłem infekcji dla bydła. Ponadto *M. bovis* jest przyczyną: zapalenia płuc, stawów, uszu i rogówki, bezpłodności oraz ronień u bydła. Zakażenia bydła *M. bovis* przebiegają w postaci stanów zapalnych: płuc, stawów, wymienia, rogówki i spojówki (18), jajników, jajowodu, błony śluzowej macicy, pęcherzyków nasennych, a nawet wywołują mogą poronienia (21). *M. bovis* odgrywa również czołową rolę w etiologii syndromu oddechowego bydła (bovine respiratory disease complex, BRDC), odpowiedzialnego za poważne straty ekonomiczne i padnięcia u tego gatunku zwierząt (10).

### Badania serologiczne

Diagnostyka zakażeń mykoplazmowych opiera się głównie na badaniach serologicznych wykorzystujących: test ELISA, OWD oraz Western blot.

OWD został zaopiniowany jako urzędowa metoda w serologicznej diagnostyce zakażeń *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*). Czulość tej metody wynosi 70%, natomiast jej specyficzność dochodzi prawie do 100% (98%) (3, 9). Obserwowane między laboratoriami badawczymi różnice w stosowaniu tej metody i osiągniętych rezultatach wynikać mogą z szeregu przyczyn, m.in.: odmienności używanych odczynników, czasu i warunków inaktywacji surowic, kwalifikacji personelu itp. W odniesieniu do pozytywnych przypadków OWD jako metoda przesiewowa najlepiej sprawdza się w diagnostyce przeciwciał anty-*MmmSC* u zwierząt będących w ostrej fazie choroby. Czulość metody jest wysoka w sytuacji, gdy pobranie prób do badań następuje nie później niż 3 miesiące od momentu pojawienia się choroby w stadzie (12). Zdarzają się jednak wyniki fałszywie dodatnie

w krajach, w których zaraza płucna bydła nie występuje (21). Stanowią one prawdopodobnie rezultat reakcji krzyżowych *MmmSC* z innymi gatunkami mykoplazm wywodzącymi się z „*M. mycoides* cluster” (18) czy też z gatunkami mniej spokrewnionymi, takimi jak. *M. bovirhinis* (20).

W serologicznej diagnostyce zakażeń *M. agalactiae* OWD znalazło również zastosowanie. Test ten stosowany jest do oceny epizootycznej stada. W tym celu należy przebadac przynajmniej 10 surowic z danego stada, od osobników z ostrymi objawami choroby lub będących w okresie rekonwalescencji (3).

Z kolei test ELISA, w tym jego pośrednia odmiana (Indirect ELISA), stosowane są w serologicznej diagnostyce zakażeń *M. bovis* i *M. agalactiae*. W kierunku *M. agalactiae* pośredni test Elisa stanowi metodę urzędową i bardziej pożądaną niż OWD (3). Test ten okazał się jednak za mało czuły w odniesieniu do detekcji przeciwciał anty-*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (13). W tym przypadku z powodzeniem wykorzystywany jest natomiast kompetycyjny test ELISA (c-ELISA), w którym użyto specyficznych przeciwciał monoklonalnych MA b 117/5. C-Elisa stanowi wysoce specyficzną i czułą metodę diagnostyczną (13). Zgodnie z OIE Terrestrial Manual 2008, czulość i specyficzność dla tej metody diagnostycznej wynosi, odpowiednio: 70% i 99,9% (2, 13, 15). W porównaniu do OWD c-ELISA wydaje się mieć większe zastosowanie w chronicznych przypadkach CBPP (13). C-ELISA wykorzystuje się również w serologicznej diagnostyce innej, ważnej jednostki chorobowej powodowanej przez *Mycoplasma sp.*, tj. zakaźnego zapalenia płuc i opłucnej kóz (contagious caprine pleuropneumonia, CCPP) wywołwanego przez *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*MmmLC*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* i *M. mycoides* subsp. *capri* (23).

W serologicznej diagnostyce zakażeń *MmmSC*, tj. powodującej zpb, znalazły również zastosowanie testy aglutynacji szkiełkowej (SAT) i lateksowej (1, 4, 25). SAT jest jednak mało czułym testem, może stanowić źródło fałszywie dodatnich wyników (1) i sprawdza się jedynie w ostrych przypadkach zarazy płucnej bydła (13). Jeżeli wyniki uzyskane przy użyciu standardowych metod serologicznych są wątpliwe, zastosować można wówczas metodę potwierdzającą, jaką jest Western blot. Jest to technika badawcza zalecana przez referencyjne laboratorium OIE, do niedawna było to LNIV Lizboa w Portugalii, natomiast obecnie jest nim laboratorium referencyjne CBPP w Teramo. Immunobloting w tym przypadku jest techniką badawczą stosowaną do analizy specyficznych polipeptydów, wchodzących w skład obecnych w surowicy zakażonych zwierząt przeciwciał anty-*MmmSC*. Poddane elektroforetycznemu rozdziałowi na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i rozfrakcjonowane pod względem ciężaru cząsteczkowego wspomnianych białek, zostają przeniesione na filtr nitrocelulozowy, a detekcja odbywa się przy użyciu metod immunoenzymatycznych. W przypadku zarazy płucnej bydła próbka surowicy uważana jest za dodatnią, jeżeli występuje równocześnie pięć immunodominantnych prążków o masie cząsteczkowej: 110, 98, 95, 62/60 i 48 kDa (8).

## Izolacja i identyfikacja mykoplazm

Izolację mykoplazm z materiału biologicznego (wymazy, fragmenty tkanek, próbki mleka i innych płynów ustrojowych) przeprowadza się z wykorzystaniem płynnego podłoża Eatona (bulion PPLO, zawierającego wyciąg drożdżowy, roztwór soli sodowej kwasu dezoksyrybonukleinowego z grasicy cieląt, glukozę, surowicę końską, czerwień fenolową, roztwór ampicyliny i wodę destylowaną). Posiane podłoże inkubuje się w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Wskaźnikiem wzrostu mykoplazm może być zmiana zabarwienia koloru bulionu z czerwonego na żółty lub pomarańczowy oraz pojawienie się charakterystycznego biofilmu. Zmiana koloru pożywki spowodowana jest zdolnością fermentacji glukozy przez niektóre gatunki mykoplazm, na przykład *MmmSC*, *M. dispar* czy *M. bovirhinis* (17). Hodowlę mykoplazm można również prowadzić na podłożu stałym Eatona. Wówczas można obserwować typowe kolonie mykoplazm przy użyciu mikroskopu świetlnego, które wyglądem przypominają sadzone jajko. *Mycoplasma mycoides* spp. *mycoides* SC jest drobnoustrojem polimorficznym, z przewagą form owalnych i okrągłych, wielkości 0,2-0,8 µm, występujących głównie w starych hodowlach. W młodych hodowlach mykoplazma ta wytwarza długie, rozgałęzione nitki dochodzące do 150-240 µm o średnicy 0,075 µm (8). Z pożywki płynnej uzyskuje się czyste izolaty mykoplazm, które następnie poddaje się testom biochemicznym; do najważniejszych zaliczane są: rozkład glukozy, hydroliza argininy i mocznika oraz biosynteza karotenoidów. Możliwe jest też przeprowadzenie dodatkowych testów biochemicznych, takich jak: rozkład innych węglowodanów poza glukozą, wytwarzanie fitazy, hydroliza eskuliny, aktywność proteolityczna, redukcja tetrazolium, właściwości hemadsorbcyjne i hemolityczne (24).

W celu identyfikacji antygeny *M. bovis* w badanym materiale, tj. w wymazach z nosa, płynie stawowym, mleku, wycinkach narządów wewnętrznych itp. zastosowanie znalazł pośredni test ELISA (Pulmotest), w którym użyto mikroplutek opłaszczonych specyficznym przeciwciałem anty-*M. bovis*.

W identyfikacji kolonii mykoplazm można posłużyć się również metodą mikroskopową wg Diensa. W metodzie tej wycinek różnicującego podłoża stałego o powierzchni 1 cm<sup>2</sup>, na którym obserwowany jest wzrost kolonii mykoplazm umieszcza się na szkiełku podstawowym, a następnie przykrywa go uprzednio zabarwionym szkiełkiem nakrywkowym przy zastosowaniu mieszaniny zawierającej błękit metylenowy, maltozę, NaCl oraz wodę destylowaną. W wyniku barwienia kolonie mykoplazm pochłaniają błękit metylenowy, który jest jednym ze składników mieszaniny barwiącej, adsorpcja barwnika umożliwia wizualizację kolonii (14).

Jednak badaniami jednoznacznie potwierdzającymi obecność mykoplazm w ocenianym materiale biologicznym są techniki biologii molekularnej (PCR i DGGE). W badaniach tych wykorzystuje się najczęściej: wymazy z górnych dróg oddechowych, próbki mleka lub innych płynów ustrojowych, a w przypadku zwierząt padłych badaniu poddawane są próbki tkanek, wymazy i błony stawowe. Metoda PCR i DGGE pozwala na jednoznaczną identyfikację mykoplazm, z możliwością ustalenia ich gatunków. DGGE polega na przeprowadzeniu procesu roz-

działu elektroforetycznego produktów amplifikacji w gradiencie czynnika denaturującego, przy czym możliwy jest rozdział mieszaniny zawierającej DNA pochodzącej od różnych gatunków mykoplazm i tą drogą ich szczegółowa identyfikacja.

## Piśmiennictwo

1. Adler H. E., Etheridge J. R.: Contagious bovine pleuropneumonia: a comparison of two slide agglutination blood tests with the complement fixation test. Aust. Vet. J. 1964, 40, 38-43.
2. Amanfu W., Sediadie S., Masupu K. V., Benkirane A., Geiger R., Thiaucourt F.: Field validation of a competitive ELISA for the detection of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1998, 51, 189-193.
3. Anon.: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Chapter 2.4.9. Contagious bovine pleuropneumonia, p. 717; Chapter 2.7.5. Contagious agalactiae, Terrestrial Manual – OIE Biological Standards Commission and adopted by the International Committee of the OIE Paris 2008, s. 996.
4. Ayling R. D., Regalla J., Nicholas R. A. J.: A field test for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC using the latex slide agglutination test, [w:] Stipkowitz L., Rosengarten R., Frey J. (eds.): *Mycoplasmas Pathogenicity, Diagnosis, Epidemiology and Molecular Genetics*. T. 3, Brussels 1999, 155-158.
5. Bednarek D.: Postępy w zwalczaniu enzoptycznej bronchopneumonii cieląt. Magazyn Wet. Suplement – Bydło 2005, 13-18.
6. Bednarek D.: Zaraza płucna bydła (pleuropneumonia contagiosa bovum, contagious bovine pleuropneumonia – CBPP) Magazyn Wet. 2005, 14, 45-46.
7. Bednarek D., Kondracki M.: Zakaźna bezmleczność owiec i kóz. Medycyna Wet. 2005, 61, 637-641.
8. Bednarek D., Regalla J.: Zaraza płucna bydła. Medycyna Wet. 2004, 60, 137-142.
9. Bellini S., Giovannini A., Di Francesco C., Tittarelli M., Caporale V.: Sensitivity and specificity of serological and bacteriological tests for contagious bovine pleuropneumonia. Rev. Sci. Tech. OIE Int. Epiz. 1998, 17, 654-659.
10. Da Massa A. J., Brooks D. L., Adler H. E.: Caprine mycoplasmosis: wide-spread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* (large-colony type). Am. J. Vet. Res. 1983, 44, 322-325.
11. Dudek K., Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M.: Szczepienia ochronne przeciwko zakażeniom wywołanym przez *Mannheimia haemolytica* i ich znaczenie w profilaktyce syndromu oddechowego bydła. Monografia, Lecznicza Dużych Zw. Apra - wetpress, Bydgoszcz 2009, 4, 61-66.
12. Le Goff C., Lefevre P. C.: Péripneumonie contagieuse bovine: test immunoenzymatique et cinétique d'apparition des anticorps au cours d'une infection expérimentale: relation entre la fixation du complément, l'excrétion et la recherche de l'antigène circulant. Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop. 1989, 42, 365-369.
13. Le Goff C., Thiaucourt F.: A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Vet. Microbiol. 1998, 60, 179-191.
14. Malinowski E., Klossowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. PIWet-PIB, Puławy 2002.
15. Megid R., Nicholas R. A. J., Miles R. J.: Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. Vet. Res. Comm. 2001, 25, 1-12.
16. Miles K., Churchward C. P., McAuliffe L., Ayling R. D., Nicholas R. A.: Identification and differentiation of European and African/Australian strains of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small-colony type using polymerase chain reaction analysis. J. Vet. Diagn. Invest. 2006, 18, 168-171.
17. Nicholas R. A. J., Ayling R. D.: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Res. Vet. Sci. 2003, 74, 105-112.
18. Pfützner H., Sachse K.: *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Rev. Sci. Tech. 1996, 15, 1477-1494.
19. Poumarat F., Perrin M., Belli P., Longchambon D., Le Goff C., Martel J. L.: Recherches sur l'origine de fausses réactions positives dans le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine. Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop. 1989, 42, 371-378.
20. Regalla J.: La réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine: applications et interprétation des résultats. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1995, 14, 631-644.
21. Runhke H. L.: Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections, [w:] Whitford H. W., Rosenbush R. F., Lauerma L. H. (ed.): *Mycoplasmosis in Animals*. Iowa State University Press, Ames 1994, 56-61.
22. Stärk K. D. C., Vicari A., Kihm U., Nicolet J.: Surveillance of contagious bovine pleuropneumonia in Switzerland. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1995, 14, 621-629.
23. Thiaucourt F., De Swetchin C., King G. E., Libeau G.: The use of a blocking ELISA for the specific detection of antibodies to *Mycoplasma* sp type F38 (CCPP). IOM Lett. 1994, 3, 21-22.
24. Tomczyk G.: Określenie właściwości szczepów *Mycoplasma* spp. izolowanych od gęsi i kaczek barbarie na terenie kraju. Praca dokt. PIWet-PIB, Puławy 1996.
25. Turner A. W., Etheridge J. R.: Slide agglutination tests in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. Aust. Vet. J. 1963, 39, 445-451.

Adres autora: mgr Monika Szymańska-Czerwińska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: monika.szymanska@piwet.pulawy.pl