

TERESA KOCIK

## Leptospiroza bydła – badania epizootologiczne w północnych województwach Polski \*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk-Oliwa

### Summary

#### Bovine leptospirosis — epizootiological studies

A total 13 800 cattle were examined serologically and 399 bacteriologically for leptospirosis. The samples of sera were tested by the microscopic agglutination test using 17 antigens from 16 serogroups of *Leptospira* spp. Specific antibodies were found in 29 per cent of animals. Most often there were recorded the titers against the antigens of serovars of the Sejroe serogroup (21%). The pathogens were isolated from 5 cows. The isolates were identified as belonging to the hardjo serovar.

Leptospiroza zwierząt domowych stanowi ważny problem ekonomiczny, a zakażone leptospirami zwierzęta są zagrożeniem dla zdrowia publicznego, dlatego światowa literatura weterynaryjna poświęcona zagadnieniom tej choroby jest bardzo obszerna.

Straty powodowane przez leptospirozę bydła uzależnione są od serowariantu leptospir wywołujących zakażenie. Przy zakażeniach endemicznych, wywoływanych przez serowarianty w serogrupy *Sejroe*, głównie przez adaptowany do bydła serowariant *hardjo*, straty dotyczą przede wszystkim spadku mleczności. Przy zakażeniach serowariantami przypadkowymi dla bydła np.: *pomona*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, straty w hodowli spowodowane są zaburzeniami w rozrodzie (ronienia, bezpłodność) i w odchowcie cieląt (8, 10, 11, 21, 22, 23, 26).

Doniesienia krajowe o stwierdzeniu wśród bydła seroreagentów z antygenami leptospirowymi są nieliczne i pochodzą sprzed wielu lat (14, 20, 28, 29). Toteż rozpoznanie dotyczące rozprzestrzenienia leptospirozy wśród bydła w Polsce wymaga uaktualnienia.

Celem niniejszej pracy, wykonanej w latach 1986—1990, było zebranie informacji o występowaniu leptospirozy w północnych województwach Polski oraz ustalenie, jakie serowarianty leptospir atakują bydło na tym terenie.

### Materiał i metody

**Badanie serologiczne.** Zbadano 13 800 surowic krowich odczynem aglutynacji mikroskopowej (OAM). Jako antygeny użyte zostały żywe hodowle następujących szczepów leptospir, reprezentujących piętnaście serogrup *Leptospira interrogans*: RGA (*Icterohaemorrhagiae*), Moskwa V (*Grippotyphosa*), M84 i Hardjoprajitno (*Sejroe*), Perepelicin (*Tarassovi*), Pomona (*Pomona*), Hond Utrecht (*Canicola*), Balico (*Australis*), Mus 127 (*Ballum*), Hebdomadis (*Hebdomadis*), Poi (*Javanica*), Celledoni (*Celledoni*), Zanoni (*Pyrogenes*), 3522C (*Cynopteri*), Akiyami A (*Autumnalis*), Van Tienen (*Bataviae*) oraz szczep Patoc I reprezentujący *L. biflexa*.

**Badanie bakteriologiczne.** Posiano 374 próbki moczu od krów. 87 próbek pobrano w rzeźni od krów podanych ubojowi, 287 próbek pobrano od krów podejrzanych o nosicielstwo leptospir, przyzyciowo po prowokacji furosemidem podanym domięśniowo w ilości 60 mg/szt. Posiewy moczu wykonano natychmiast po pobraniu (w ciągu 2—3 min). Ponadto posiano próbki nerek pięciu krów

i dwadziestu poronionych płodów krowich. Posiewy wykonano i inkubowano w sposób podany we wcześniejszej pracy (13).

**Identyfikacja izolatów leptospir.** W przypadku stwierdzenia w posiewie obecności drobnoustrojów morfologicznie odpowiadających leptospirom, hodowano je do osiągnięcia gęstości ok.  $10^8$  komórek/ml, po czym poddano je dwuetapowej identyfikacji. W pierwszym etapie izolaty testowano w OAM z króliczymi surowicami odpornościowymi przeciwko szczepom referencyjnym, w celu określania ich przynależności serogrupowej. W drugim etapie, w celu ustalenia przynależności serowariantowej badanych izolatów leptospir, wykonano w obrębie stwierdzonej serogrupy odczyn krzyżowej absorpcji aglutynin metodą bratysławską (4).

**Surowice odpornościowe.** W badaniach posłużono się surowicami odpornościowymi przeciwko szczepom wymienionym w punkcie 1, przeciwko szczepom Bratislava i Poland 493 z serogrupy *Sejroe* oraz przeciwko izolatom. Uzyskano je metodą hiperimmunizacji królików zalecaną przez Kmetygo (12).

### Wyniki i omówienie

**Badanie serologiczne.** Wyniki badania serologicznego 13 800 krów przedstawia tab. 1. Badane krowy pochodziły z trzynastu województw położonych w północnej Polsce. Stwierdzono, że 29% badanego bydła posiada przeciwciała przeciwko różnym serowariantom leptospir. Najczęściej, u 21% bydła, były to przeciwciała przeciwko serowariantom serogrupy *Sejroe*, u 3,5% przeciwko serogrupie *Grippotyphosa*, u 2,9 przeciwko *Cynopteri*. Przeciwciała przeciwko pozostałym serogrupom wykrywano sporadycznie i były to zawsze reakcje krzyżowe towarzyszące reakcjom z serowariantami serogrupy *Sejroe*. Reakcje krzyżowe znaleziono u 14% badanego bydła. Reakcje te mogą być wynikiem współistnienia u jednego zwierzęcia zakażenia więcej niż jednym serowariantem leptospir lub mogą one wskazywać na liczebność świeżych zakażeń. Bowiem w przebiegu leptospirozy, w początkowej jej fazie, występują tzw. paradoksalne reakcje serologiczne z innymi niż zakażający serowariantem leptospir. Zjawisko to jest spowodowane przez tzw. mniejsze antygeny leptospirowe niebrane pod uwagę przy klasyfikacji tych spirochet na serowarianty.

Reakcje w mianie wyższym niż 1/200 wykryto u 15% zwierząt badanych.

Zbadane serologicznie krowy reprezentowały 457 stad. Wśród nich było 113 stad zakażonych leptospirami. W stadach bydła zakażonych leptospirami stwierdzono wysoki odsetek seroreagentów. Na przykład w dwóch fermach z kliniczną leptospirozą z woj. zielonogórskiego seroreagentów było aż 72%.

Wśród badanych krów znajduje się grupa 733 porzutek. Wyniki badania serologicznego tych zwierząt zebrano w tab. 2. Przeciwciała leptospirowe, potwierdzające leptospirową etiologię ronienia, znaleziono u 23% porzutek. Były to przeciwciała przeciwko serowariantom z serogrupy *Sejroe* i *Grippotyphosa*.

Zaobserwowano wyraźną różnicę w liczebności ronień

\*) Praca zrealizowana w ramach CPBR 1/2, 12/25.

Tab. 1. Wyniki badania serologicznego bydła w kierunku leptospirozy

	Gdańskie	Elbląskie	Olsztyńskie	Bydgoskie	Zielonogórskie	Koszalińskie	Toruńskie	Ślupskie	Szczecińskie	Poznańskie	Konińskie	Białostockie	Suwańskie	Ogółem
Liczba zbadanego bydła	2306	6459	4312	369	235	63	38	41	10	7	8	5	188	13800
Seroreagenci ogółem	604 19%	1914 27%	1281 32%	32 9%	170 72%	22	0	16	4	7	7	0	2	4059 29%
Liczba zbadanych stad	29	52	30	350	2	1	1	1	1	1	1	1	5	475
Liczba stad zakażonych	24	32	16	32	2	1	0	1	1	1	1	0	2	113 23,7%
Seroreagenci z serowariantami (łącznie z reakcjami krzyżowymi)														
<i>icterohaemorrhagiae</i>	9	45	4	1										59
<i>grippotyphosa</i>	49	298	104	8	161	10		6	3	4			1	483 3,5%
<i>sejroe</i>	356	1249	1102	7	161	1		13	1	3			2	2905 21%
<i>tarassovi</i>	61	33	47	12		1		3		4				161 1,2%
<i>pomona</i>	5	21	6							1				33
<i>canicola</i>	3	9		1										13
<i>australis</i>		12												12
<i>ballum</i>		4												4
<i>hebdomadis</i>	4													4
<i>poi</i>	1	4	1	6		3							2	17
<i>celledoni</i>	40	42	24								5			111 0,8%
<i>pyrogenes</i>	13	14	3			19							1	50
<i>cynopteri</i>	66	288	38			1					4			397 2,9%
<i>autumnalis</i>	2	20	5								1			29
<i>bataviae</i>	13	126	5	1										145 1%
<i>hardjo</i>	325	1548	832	1	153			3					2	2915 21%
Seroreagenci reagujący krzyżowo	326	971	660	5	161	10		13		5	5		2	1984 14%
Seroreagenci z mianem 1/200	272 45%	933 49%	717 56%	6 19%	93 54%	10 45%			4	3	3		2	2103 15%

Tab. 2. Wyniki badania serologicznego krów — porzutek w kierunku leptospirozy

	Gdańskie	Elbląskie	Bydgoskie	Olsztyńskie	Ślupskie	Suwańskie	Ogółem
Liczba zbadanych porzutek	82	165	315	128	41	2	733
Liczba seroreagentów ogółem	26 32%	75 45%	27 9%	41 32%	16	2	167 23%
Seroreagenci z serowariantami (łącznie z reakcjami krzyżowymi)							
<i>icterohaemorrhagiae</i>	2	1					3
<i>grippotyphosa</i>	3	25	5	8	7	1	49 7%
<i>sejroe</i>	20	54	4	30	9	2	109 14%
<i>tarassovi</i>	4		12	1	3		20
<i>pomona</i>	1	2					3
<i>canicola</i>	1	1	1	2			5
<i>poi</i>	1	1		1			5
<i>celledoni</i>	3		5		4	2	12
<i>pyrogenes</i>		2		2		2	6
<i>cynopteri</i>	1	3					4
<i>hardjo</i>	15	41	1	17	3	2	79 11%
Seroreagenci reagujący krzyżowo	15	45	5	19	7	2	93 13%
Seroreagenci z mianem 1/200	8	39	4	8	3	2	63 9%

u bydła na tle leptospirozy pomiędzy województwem bydgoskim a województwami gdańskim, elbląskim i olsztyńskim. W woj. bydgoskim leptospirową etiologię poronienia potwierdzono w 9% badanych przypadków, w województwach gdańskim, elbląskim, olsztyńskim odpowiednio w 32%, 45% i 32% przypadków.

Dokładna ocena rozprzestrzenienia leptospirozy u bydła w oparciu o wyniki badań serologicznych jest trud-

na. Badania te mogą dawać z jednej strony wyniki zawyżone, ponieważ miana przeciwciał leptospirowych zazwyczaj utrzymują się u zwierząt przez długi czas po przebyciu zakażenia, z drugiej strony wiadomo, że czynna leptospiroza może przebiegać przy braku wykrywalnych mian przeciwciał aglutynujących.

Przedstawione badania serologiczne udokumentowały częste występowanie leptospirozy u bydła w północnych

Tab. 3. Przynależność serowariantowa izolatów leptospir OL59, OL60, OL61, OL62

Surowica przeciwcwko	Absorpcja szczepem (serowariant)	Odwrotność miana homologicznego		Procent miana homologicznego pozostającego po absorpcji
		przed absorpcją	po absorpcji	
OL59	M84 (sejroe)	3200	1600	50
	Hardjoprajitno (hardjo)		100	3,12
	Bratislava (istrica)		1600	50
	Poland 493 (polonica)		3200	100
OL60	M84 (sejroe)	12800	6400	50
	Hardjoprajitno (hardjo)		100	0,78
	Bratislava (istrica)		6400	50
	Poland 493 (polonica)		12800	100
OL61	M84 (sejroe)	3200	1600	50
	Hardjoprajitno (hardjo)		100	3,12
	Bratislava (istrica)		3200	100
	Poland 493 (polonica)		3200	100
OL62	M84 (sejroe)	12800	6400	50
	Hardjoprajitno (hardjo)		400	3,12
	Bratislava (istrica)		12800	100
	Poland 493 (polonica)		12800	100
Hardjoprajitno	OL59	12800	100	3,12
	OL60		100	3,12
	OL61		0	0
	OL62		0	0

województwach Polski oraz wskazały na znaczenie serogrupy *Sejroe* w etiologii tej choroby.

Badanie bakteriologiczne. Wykonano 399 posiewów materiału od krów podejrzanych o leptospirozę. Leptospiry wyhodowano w pięciu przypadkach.

Wszystkie izolaty uzyskano z próbek moczu. Oznaczono je numerami OL59, OL60, OL61, OL62, OL63. Izolat OL59 pochodził od porzutki z woj. gdańskiego, OL60 i OL61 od krów-seroreagentów ze stad, w których nie stwierdzono objawów klinicznych leptospirozy z woj. olsztyńskiego, OL62 i OL63 od krów ze stada podejrzanego o leptospirozę (ronienia, znaczny odsetek seroreagentów) z woj. zielonogórskiego.

W pierwszym etapie identyfikacji izolatów ustalono ich przynależność serogrupową. Do tego celu użyto 16 surowic diagnostycznych dla szczepów reprezentujących serogrupy wymienione w rozdziale „Materiał i metody”. Surowice te reagowały z homologicznymi szczepami w mianach od 1:1600 do 1:25 600. Stwierdzono, że badane izolaty należą do serogrupy *Sejroe*, reagowały bowiem jedynie z surowicą przeciwcwko M84 w mianach: OL59 — 1/800, OL60 — 1/1600, OL61 — 1/1600, OL62 — 1/800, OL63 — 1/800. Następnie, dla identyfikacji na

poziomie serowariantu, izolaty porównano z czterema szczepami z serogrupy *Sejroe*, mianowicie z M84, *Hardjoprajitno*, *Bratislava*, *Poland* 493, które reprezentują odpowiednio serowarianty: *sejroe*, *istrica* i *poland*. Wyniki tego porównania zawiera tab. 3.

Izolaty spełniają kryterium identityczności (procent miana homologicznego w parach surowic odpornościowych przeciwcwko badanym szczepom pozostający po krzyżowej absorpcji jest niższy niż 10%) ze szczepem *Hardjoprajitno*, zatem należą do serowariantu *hardjo*.

*Hardjo* występuje endemicznie w populacjach bydła w różnych częściach świata (1, 5, 6, 10, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 27).

Różnice w klinicznej manifestacji choroby przy zakażeniach *hardjo* w różnych populacjach bydła sugerowały możliwość istnienia pewnych różnic pomiędzy szczepami tego serowariantu. Jednakże identyfikacja szczepów metodą krzyżowej absorpcji aglutynin nie uwidoczniła żadnych różnic. Dopiero zastosowanie restrykcji endonukleazą DNA leptospirowego, jako metody identyfikacji leptospir, pozwoliło wyróżnić w serowariancie *hardjo* dwa genotypy — jeden *hardjoprajitno*, identyczny ze szczepem *Hardjoprajitno*, drugi dający odmienne fragmenty DNA po restrykcji endonukleazą, nazwany *hardjobovis*. W każdym z genotypów stwierdzono ponadto przynajmniej po dwa warianty (15, 17).

W Europie obecność zakażeń *hardjo* u bydła wykryto w Anglii (7, 17), Irlandii (7), Niemczech (2), Holandii (9), Portugalii (3), na Węgrzech (19).

Niniejsza praca przedstawia pierwszą w Polsce izolację *L. hardjo* oraz wskazuje na znamienne rolę tego serowariantu w etiologii leptospirozy bydła na objętym badaniami terenie.

#### Piśmiennictwo

- Bettelheim K. A., Fogg T. R.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 9, 355, 1986.
- Brem S., Schreyer K.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 101, 416, 1988.
- Collares-Pereira M.: Transactions Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 112, 1989.
- Dikken P., Kmety E.: Methods in Microbiology 2, 250, 1978.
- Durfee P. T., Allen J. D.: Australian Vet. J. 56, 574, 1980.
- Ellis W. A., O'Brien J. J., Neill S. D., Hanna J.: Vet. Rec. 110, 178, 1982.
- Hathaway S. C., Pritchard D. G., Little T. W. A.: Zbl. Bakt. Hyg. A. 257, 527, 1984.
- Hathaway S. C., Tood J. N., Headlam S. A., Jeffrey M.: Vet. Rec. 115, 623, 1984.
- Houwens D. J., Bokhout B. A., Koger P., Peterse D. J., Terpstra W. J.: Zoonoses Congress Intern. Particip. VIIIth Joint Meeting Europ. Leptospira Work., Brno, 29.08—1.09.1988, s. 7, 31.
- Kingscote B. F.: Can. Vet. J. 29, 647, 1988.
- Kingscote B. F.: Can. Vet. J. 26, 328, 1985.
- Kmety E.: Folia Fac. Med. Univ. Comenianae Bratisl. XV, 2, 1977.
- Kocik T.: Medycyna Wet. 45, 409, 1989.
- Konarska D.: Mat. Sesji Nauk. Leptospiroza ludzi i zwierząt, Wrocław, 19—20.11.1976, s. 5.
- LeFebvre R. B.: J. Clin. Microbiol. 25, 2256, 1987.
- Milner A. R., Wilks C. R., Calvert K.: Australian Vet. J. 56, 327, 1980.
- Marshall R. B., Winter P. J., Ellis W. A.: Vet. Rec. 177, 667, 1985.
- Myers D. M., Ruiz A., Applewhite L.: Trop. Anim. Hlth. Prod. 17, 239, 1985.
- Nagy G.: Magy. Allatorv. Lapja 44, 349, 1989.
- Nowak J.: Medycyna Wet. 32, 406, 1976.
- Prescott J. E., Miller R. B., Nicholson R. B., Martin S. W., Lesnik T.: Can. J. Vet. Res. 52, 210, 1988.
- Stee K. J., McOrist S., Skilbeck N. W.: Australian Vet. J. 60, 204, 1983.
- Songer J. G., Chitelli C. J., Marshall M. M., Meyer R.: Am. J. Vet. Res. 44, 1763, 1983.
- Tsuchimoto M., Yanagawa R., Inui S.: Jpn. J. Vet. Sci. 45, 811, 1983.
- White F. H., Sulzer K. R., Engel R. W.: Am. J. Vet. Res. 43, 1172, 1982.
- White F. H., Sutherland G. E., Raynor L. E., Cottrell C. R., Sulzer K. R.: Public Health Rep. 96, 250, 1981.
- Zamora J., Riedmann S., Frias M.: Arch. Med. Vet. 20, 136, 1988.
- Zwierż J., Karmańska K., Konarska D.: Medycyna Wet. 22, 85, 1966.
- Zwierż J., Karmańska K., Konarska D.: Medycyna Wet. 22, 154, 1966.

Adres autora: dr Teresa Kocik, ul. Telimieny 61, 80-124 Gdańsk