

ZDZISŁAW LARSKI
Olsztyn

artykuł przeglądowy

Trudności serologicznej diagnostyki brucelozy bydła

Badania serologiczne stanowią cenny sposób rozpoznawania zakażeń, jednak interpretacja uzyskanych wyników wymaga uwzględnienia wielu czynników omówionych szczegółowo w innym artykule (6). Dotyczy to także brucelozy. Polska została uznana za kraj wolny od tej choroby już w 1980 r. na podstawie spełnienia wymagań wynikających z ustaleń międzynarodowych – odsetek stad wolnych od tej choroby większy niż 99,8% a badania pogłównia wykazują nie więcej niż 0,5% zwierząt reagujących serologicznie dodatnio (5); ten stan monitorowany jest przez coroczne badania przy użyciu testów serologicznych i stosowania kryteriów ich oceny omówionych przez Królaka i wsp. (5).

Już we wczesnych latach 80. na jednym z posiedzeń Komitetu Mikrobiologii PAN skierowano pod adresem weterynarii pytanie jak można pogodzić likwidację brucelozy bydła z wciąż dużą liczbą stwierdzanych serologicznie nowych zakażeń u ludzi. Wyjaśniliśmy wtedy, że te dodatnie wyniki mogą być następstwem zakażenia człowieka innymi bakteriami wykazującymi pokrewieństwo antygenowe z *Brucella abortus*, głównie pałeczką *Yersinia enterocolitica* serotyp O9 (najczęstszym źródłem tego zarazka są świny); ponieważ brak pewnych metod umożliwiających odróżnienie reakcji na oba antygeny, rozstrzygające znaczenie mają dodatkowe dane epidemiologiczne i kliniczne.

Ostatnio wiele doniesień zagranicznych wskazuje na problem fałszywie dodatnich wyników serologicznego badania bydła, będących wyrazem krzyżowych reakcji *Brucella abortus* z innymi bakteriami. Nie można wykluczyć, że takie trudności nie wystąpią także u nas i dlatego wydaje się celowe omówienie prac dotyczących tego zagadnienia wykonanych za granicą.

Johnson i wsp. (2) podjęli odpowiednie badania w Kanadzie uznanej za wolną od brucelozy w 1985 r. (a więc 5 lat później niż nasz kraj). Około 4% surowic badanych w ostatnich dwu latach dało wynik dodatni w płytowej buforowanej aglutynacji, który następnie zweryfikowano jako fałszywie dodatni w bardziej swoistym odczynie wiązania dopełniacza. Autorzy ci omawiają poznane dotąd dane dotyczące krzyżowych reakcji z brucelami, innych zarazków a mianowicie, oprócz wspomnianej już *Y. enterocolitica* O9; *E. coli* serotyp O157, *Pseudomonas mal-*

tophilia i *Salmonella urbana* O30, po sztucznym zakażeniu nimi bydła. Johnson i wsp. (2) badali też krzyżowe reakcje w przebiegu naturalnych zakażeń bydła *E. coli* O157 H7 przy użyciu aglutynacji płytowej i probówkowej oraz odczynu wiązania dopełniacza i wykazali w tych testach rzadkie występowanie fałszywie dodatnich reakcji u zwierząt eksponowanych na ten patogen.

Obecnie powszechnie wiadomo, że najważniejszym źródłem fałszywie dodatnich wyników serologicznej diagnostyki brucelozy zwierząt i ludzi są zakażenia wywołane przez *Yersinia enterocolitica* serotyp O9. Ta krzyżowa reaktywność obu zarazków, będąca wyrazem posiadania przez nie niemalże identycznego lipopolisacharydowego (LPS) łańcucha O, stanowi wciąż ważny problem. Wielu krajom udało się bowiem uwolnić od brucelozy, niestety od 1990 r. stwierdza się znaczny wzrost liczby stad bydła, w których występują dodatnie wyniki badań serologicznych, np. w Belgii u 3,3%, we Francji u 2,08%, a w niektórych regionach wskaźnik ten osiąga wartość 10% (cyt. wg 11). W tych stadach tylko nieliczne zwierzęta były seropoztywne, przy czym wyniki te potraktowano jako fałszywie dodatnie wobec braku klinicznych i innych dowodów istnienia tam brucelozy. Sprawa ta wymaga jednak ostrożnej oceny, zwłaszcza w związku z doniesieniami o wybuchu w 1995 r. wielu ognisk brucelozy w północnej Holandii; według otrzymanych informacji choroba ta została zawleczona z Francji poprzez Belgię (1). Grupa międzynarodowych specjalistów z Nowej Zelandii, Belgii, Francji, Australii, Argentyny, USA, Niemiec, Szwecji i Kanady (3, 4) oraz zespół badaczy belgijskich (10, 11) przystąpiły do prac, których celem jest znalezienie pewnej serologicznej metody różnicowania brucelozy i jersiniozy. Prób takich podejmowano poprzednio już wiele, m.in. jedną z pierwszych było użycie do serologicznego badania antygeny rzęskowego *Yersinia enterocolitica*, którego *B. abortus* nie posiada (7). Inne próby, m.in. przy użyciu EDTA inaktywującego nieswoiste aglutyniny dla *B. abortus* lub przez uprzednie poddanie badanej surowicy działaniu czynnika redukującego przypominają autorzy najnowszych prac (3, 4, 10, 11).

Kittelberger i wsp. (3) opierając się na wynikach innych autorów, którzy wykazali, że białka zewne-

trzonej otoczki, OMP (outer membrane proteins) mogą być przydatne do swoistego wykrywania zakażeń *B. abortus*, podjęli próbę identyfikacji immunodominujących (najważniejszych immunologicznie) antygenów metodą immunoblottingu w odniesieniu do surowic zwierząt naturalnie i sztucznie zakażonych *B. abortus*. Tu warto krótko przybliżyć istotę tego coraz częściej stosowanego odczynu, być może szerzej nieznanego naszym kolegom nie pracującym w laboratoriach rozpoznawczych. Metoda ta pozwala wykryć oddzielnie obecne w badanej surowicy przeciwciała dla poszczególnych antygenów zarazka. Zakładając istnienie pewnych różnic antygenowych między omawianymi drobnoustrojami, umożliwić powinna bardziej precyzyjną ocenę odpowiedzi immunologicznej. Istotę odczynu przedstawia ryc. 1.

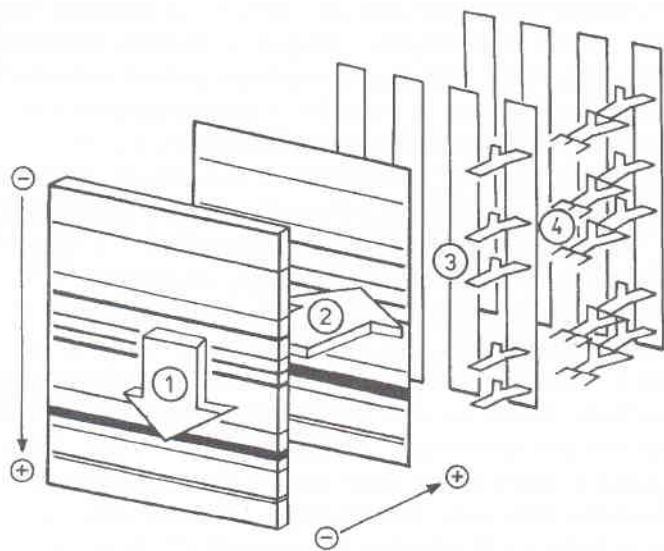
Wymienieni autorzy (3) stosując metodę immunoblottingu z użyciem jako antygenów różnych ekstraktów szczepów *B. abortus* i *Y. enterocolitica* badali surowice bydła naturalnie i sztucznie zakażonego jednym lub drugim zarazkiem. Omawiając swe badania, autorzy dochodzą do wniosku, że uzyskane wyniki nie stwarzają podstaw do opracowania prostego, czulego i swoistego testu różnicowej serodiagnosticski naturalnych zakażeń bydła *B. abortus* i *Y. enterocolitica*.

W następnej pracy poświęconej temu celowi Kittelberger i wsp. (4) użyli do badań zewnętrznych białek *Yersinia enterocolitica* serotypu O9, YOPs (*Yersinia* outer proteins) jako antygenów w immunoblottingu. Uzyskanie YOPs jest proste, gdyż *Y. enterocolitica* namnażana w pożywce pozbawionej wapnia uwalnia je do podłoża. Przydatność YOPs w odczynie ELISA i immunoblottingu wykazali inni

autorzy do rozpoznawania jersiniozy owiec, ludzi i królików a także do różnicowania brucelozy i jersiniozy u ludzi (cyt. wg 4). Posługując się YOPs w immunoblottingu Kittelberger i wsp. (4) stwierdzili przydatność tych antygenów do rozpoznawania jersiniozy bydła, jednak nie pozwala to na wykrycie zwierząt fałszywie dodatnio reagujących z antygenem brucelozowym. Do takich samych wniosków doszli Weynants i wsp. (11) używający w swych badaniach YOPs w pośrednim teście ELISA. Dalszy istotny problem w różnicowaniu infekcji omawianymi zarazkami może stanowić podwójne zakażenie a także możliwość stymulacji naturalnego zakażenia jersiniami przez *B. abortus* (4). Jersinioza u bydła przebiega bezobjawowo (11), co stwarza dodatkową trudność diagnostyczną.

Niewiarygodność wszystkich używanych dotąd metod serologicznych, wyrażających immunitet humoralny (obecność przeciwciał swoistych dla danego zarazka) do różnicowania brucelozy i jersiniozy bydła, skłoniła badaczy do zastosowania bardziej złożonych testów odzwierciedlających immunitet komórkowy. Taki właśnie jest indukowany przez drobnoustroje rodzaju *Brucella*, będące zarazkami wewnątrzkomórkowymi. Chukwa (cyt. wg 10) wykazał przydatność do tego celu testu transformacji blastycznej limfocytów T, który jest jednak dość kłopotliwy w technicznym wykonaniu i wymaga kilku dni dla otrzymania wyników. Zakażenie brucelami, indukując swoistą odpowiedź komórkową, umożliwia również alergiczne, DTH (delayed-type hypersensitivity) rozpoznawanie brucelozy przez śródskórne wprowadzenie alergenu. Także ta metoda ma pewne wady: wymaga dwukrotnego badania zwierząt, intensywność odczynu jest zwykle dość mierna (na ogół osiąga jedną czwartą do jednej trzeciej występującej w dodatnim teście tuberkulinowym) a wyniki otrzymuje się po 2-3 dniach (10).

Weynants i wsp. (10) opierając się na danych innych autorów wskazujących na dobrą korelację między testem DTH (*in vivo*) a indukowaniem *in vitro* interferonu gamma (IFN – gamma) przy gruźlicy bydła, opracowali analogiczny do diagnostyki brucelozy. Do heparynizowanej całej badanej krwi dodaje się brucelinę, stanowiącą swoisty bodziec antygenowy a po 18-24 godz. inkubowania w 37°C w komorze wilgotnej zawierającej 5% CO₂, oznacza się w zebranym supernatancie ilość IFN – gamma przy użyciu handlowego zestawu ELISA. Ten gamma – interferonowy test sprawdzono na 24 zwierzętach (10 sztucznie i 14 naturalnie zakażonych). Pozwolił on wykazać zakażenie u większej liczby zwierząt niż przy użyciu jakiejkolwiek kombinacji następujących prób serologicznych: odczynu powolnej (probówkowej) aglutynacji w obecności EDTA (kwasu etylenodwuaminoctero-octowego), odczynu wiązania dopełniacza, testu płytowego z różem bengalskim (odpowiednik używanego w Polsce odczynu



Ryc. 1. Istota odczynu immunoblottingu (wg 8); rozdział elektroforetyczny białek zarazka w żelu poliakrylamidowym (1); przeniesienie frakcji białkowych na nitrocelulozę (2); pocięcie nitrocelulozy na paski i inkubowanie ich z badanymi surowicami (3); stwierdzenie związania przeciwciał za pomocą koniugatu – znakowanych enzymem antyglobulin dla IgG badanych gospodarzy (4); przy obecności w badanej surowicy przeciwciał dla białek zarazka nastąpi wiązanie koniugatu i dodany substrat ulegnie rozkładowi pod wpływem enzymu, co wyrazi się powstaniem barwnych prążków

kwaśnej aglutynacji płytowej, OKAP) i ELISA; obecność przeciwciał w mleku stwierdzano próbą pierścieniową i ELISA.

Test gamma – interferonowy umożliwił również wykazanie zakażenia wcześniej niż przy użyciu prób serologicznych, np. już po 25 dniach, test ELISA po 47 dniach. Testem interferonowym wykryto największy odsetek zakażonych zwierząt, jednak nie wszystkie, natomiast łączne jego użycie z badaniami serologicznymi pozwoliło wykryć 90% zakażonych już po 25 dniach a 100% po 35 dniach. Wszystkie użyte w pracy zwierzęta poddano ubojowi i badaniu bakteriologicznemu, które objęło: węzły chłonne pozagardłowe, przyuszne, żuchwowe, nadłopatkowe, nadwymieniowe, wewnętrzne biodrowe i śródpiersiowe; u zwierząt ciężarnych ponadto błony płodowe oraz wątrobę, płuca i zawartość żołądka płodu. Bakteriologicznie badano również na obecność jersinii kał zwierząt w stadach, w których wystąpiły fałszywie dodatnie wyniki prób serologicznych w kierunku brucelozы. U żadnego z 23 zwierząt wykazujących taką reakcję test na IFN – gamma nie był dodatni.

Na podstawie wyników swych badań Weynants i wsp. (10) uważają, że ten test zapewnia szybkie rozpoznanie i stanowi doskonałą pomoc w interpretacji niejasnych wyników badań serologicznych. Autorzy zwracają jednak uwagę na konieczność używania jako bodźca antygenowego preparatu wolnego od lipolisacharydu (LPS), który może upośledzać test aktywując nieswoistą odpowiedź komórkową, np. komórki NK, albo bezpośrednio albo pośrednio w następstwie syntezy interleukiny 12. Test interferonowy jest obecnie używany we Francji i w Belgii w sytuacjach gdy podejrzewa się występowanie fałszywie dodatnich wyników badań w kierunku brucelozы bydła. Autorzy sądzą, że metoda ta znajdzie zastosowanie także w eliminacji takich wyników u innych zwierząt.

Dotyczyć to może zwłaszcza brucelozы świń i warto tę sprawę krótko omówić, gdyż może się okazać aktualną też u nas. Wrathall i wsp. (12) podali, że w W. Brytanii do 1987 r. dodatnie miana serologiczne stwierdzano w odczynie aglutynacji probówkowej u 0,05% a w odczynie wiązania dopełniacza (OWD) u 0,005% badanych świń; w 1988 r. odsetek reagujących w odczynie aglutynacji nie uległ zmianie, natomiast w OWD wzrósł do 0,42% (1,04% w ostatnim kwartale roku). W 1989 r. wartości te wzrastały dalej, jednak z przewagą OWD. Badania chlewni, w których u zwierząt stwierdzano dodatnie wyniki, nie wykazywały objawów typowych dla brucelozы. Na początku 1990 r. izolowano od świń *Y. enterocolitica* serotyp O9, drobnoustrój nie stwierdzany uprzednio u tych zwierząt w W. Brytanii. Właśnie jego rozprzestrzenianiu się przypisuje się

wzrost liczby zwierząt reagujących fałszywie dodatnio z antygenem *B. abortus*.

Próbie rozwiązania tej trudności diagnostycznej podjęli Spencer i wsp. (9); celem było zidentyfikowanie antygenów wykazujących większą swoistość, zapewniających rozstrzygające serologiczne rozpoznanie brucelozы świń. W badaniach posłużono się metodą immunoblottingu, tak jak to robiono w odniesieniu do diagnostyki brucelozы bydła (3). Niestety wyniki tych badań nie przyniosły oczekiwanego rozwiązania i być może jedyną w tej chwili nadzieję rozwiązania tego problemu stwarza użycie opracowanego testu gamma – interferonowego (10).

Piśmiennictwo

1. Anon.: Medycyna Wet. 52, 203, 1996.
2. Johnson R. P., Boag L., Anderson S., Holtslander R., Rahn K., Clarke R. C., Renwick S. A., Alves D., Wilson J. B., Spika J.: Vet. Rec. 135, 382, 1994.
3. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M. F., Penrose M., de Lisle G. W., Letesson J. J., Garin-Bastuji B., Searson J., Fossati C. A., Cloeckaret A., Schurig G.: Vet. Microbiol. 47, 257, 1995.
4. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M. F., Ross G. P., Joyce M. A., Fenwick S., Heesemann J., Wolf-Watz H., Nielsen K.: Vet. Microbiol. 47, 271, 1995.
5. Królak M., Kołacz J., Stryszak A., Pilaszek J.: Życie wet. 69, 257, 1994.
6. Larski Z.: Medycyna Wet. 37, 385, 1981.
7. Mittal K. R., Tizard I. R.: Res. Vet. Sci. 26, 248, 1979.
8. Porstmann T., Porstmann B., Kiessig S., Nugel E., Scholz D., Grunow R., Volk H. D., Baer R.: Medizin aktuell 13, 448, 1987.
9. Spencer S. A., Broughton E. S., Hamid S., Young D. B.: Vet. Microbiol. 39, 47, 1994.
10. Weynants V., Godfroid J., Limbourg B., Saegerman C., Letesson J. J.: J. Clin. Microbiol. 33, 706, 1995.
11. Weynants V., Tibor A., Denoel P. A., Saegerman C., Godfroid J., Thiange P., Letesson J. J.: Vet. Microbiol. 48, 101, 1996.
12. Wrathall A. E., Broughton E. S., Gill K. P. W., Goldsmith G. P.: Vet. Rec. 132, 449, 1993.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Larski, Kortowo, bl. 105, 10-957 Olsztyn

MONGOMERY T. M., NELSON R. W., FELDMAN E. C., ROBERTSON K., POLANSKY K. S.: Normalny i stymulowany glukagonem poziom C-peptydu w plazmie psów zdrowych, psów chorych na cukrzycę oraz psów z nadczynnością kory nadnerczy. (Basal and glucagon-stimulated plasma C-peptide concentrations in healthy dogs, dogs with diabetes mellitus, and dogs with hyperadrenocorticism). J. Vet. Intern. Med. 10, 116–122, 1996 (3)

Określono stężenie glukozy, insuliny i C-peptydu w plazmie krwi psów zdrowych (24 sztuki), psów chorych na cukrzycę i nie otrzymujących insuliny (12 sztuk), psów z cukrzycą leczonych insuliną (30 sztuk) oraz psów z nadczynnością kory nadnerczy (8 sztuk) po dożylniej iniekcji glukagonu w dawce 1 mg/zwierzę. U zdrowych psów poziom C-peptydu i insuliny w plazmie po iniekcji glukagonu kształtował się bardzo podobnie; zaś maksymalne stężenie badane parametry osiągały po 15 minutach po iniekcji glukagonu. Średni poziom C-peptydu i insuliny w plazmie psów chorych na cukrzycę, ale nie poddanych leczeniu insuliną oraz leczonych insuliną nie zwiększał się w sposób znamienny po iniekcji glukagonu. Zarówno stężenie C-peptydu jak i insuliny wzrastało znamiennie u psów z nadczynnością kory nadnerczy, w porównaniu do psów zdrowych i psów z cukrzycą leczonych insuliną przez okres krótszy niż 6 miesięcy, w porównaniu do psów leczonych przez ponad rok.