

# Aktualne dane na temat diagnostyki zakażeń owiec i kóz pałeczkami *Brucella*

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Bruceloza owiec i kóz wywołana przez *Brucella melitensis*

Głównym czynnikiem wywołującym brucelozę owiec i kóz jest *Br. melitensis* (biotyp 1, 2 lub 3). Notowano także zakażenia tych gatunków zwierząt pałeczkami *Br. abortus* lub *Br. suis*, lecz w tych przypadkach postać kliniczna choroby występuje dosyć rzadko. Choroba stwierdzana jest najczęściej w krajach Basenu Morza Śródziemnego oraz w innych częściach świata, zwłaszcza o klimacie tropikalnym lub subtropikalnym. Uważa się, że Ameryka Północna, podobnie jak Europa Północna, południowo-wschodnia Azja, Australia oraz Nowa Zelandia, są krajami wolnymi od zakażeń *Br. melitensis* (10).

W ostatnich latach w Polsce wraz z rosnącym pogłowiem kóz, można się liczyć ze zwiększoną liczbą seroreagentów, zwłaszcza, że zwierzęta te, a przynajmniej pewien ich odsetek, pochodzą z importu, często z krajów, w których występują zakażenia *Br. melitensis*.

*Br. melitensis* jest wysoce patogenna dla człowieka. Wywołuje jedną z najpoważniejszych chorób odzwierzęcych. Zakażenie następuje głównie drogą pokarmową, lecz drogi oddechowe, spojówki oraz uszkodzona skóra są także bramą wejścia zarazki. Zabiegi związane z udzielaniem pomocy przy porodzie i stryżeniem zwierząt są główną przyczyną infekcji u ludzi. Dosyć duże ryzyko stwarza spożywanie zakażonych produktów mleczarskich. *Br. melitensis* można zakazić się również w laboratoriach diagnostycznych, jeżeli nie jest przestrzegana daleko idąca ostrożność podczas obchodzenia się z materiałem potencjalnie zakażonym. Badanie próbek surowicy stwarza minimalne ryzyko infekcji personelu. Obowiązujące przepisy z zakresu BHP w pracowniach mikrobiologicznych i serologicznych są wystarczające (1, 10).

Patogeneza i epidemiologia zakażenia *Br. melitensis* u owiec i kóz są bardzo podobne do zakażenia wywołanego przez *Br. abortus* u bydła. W większości przypadków źródłem infekcji są: łożysko, wody płodowe, wydzieliny z dróg rodnych maciorek i kóz podczas ronienia lub porodu. Notowano także częstą obecność pałeczek *Brucella* w wydzielinie z wymienia oraz w nasieniu i w zmienionych zapalnie stawach.

Klinicznie choroba charakteryzuje się ronieniem, zatrzymaniem łożyska, zapaleniem jąder, najądrzy oraz rzadziej stawów. Ronienie może występować u 50% owiec w stadzie. W niektórych przypadkach brak jest objawów klinicznych i nie stwierdza się przeciwciał w surowicy, natomiast udaje się wyizolować zarazek. Kozy po pierwszym poronieniu często wydzielają z mlekiem dużo zarazków (2, 10, 11).

Niewątpliwa i pewna diagnoza brucelozy, wywołanej przez *Br. melitensis* i inne pałeczki z rodzaju *Brucella*, może być podjęta na podstawie izolacji i identyfikacji zarazki. W sytuacji kiedy badanie bakteriologiczne nie jest możliwe, rozpoznawanie opiera się na testach serologicznych.

Metodami używanymi w badaniu surowic owiec i kóz są: odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) i odczyn wiązania dopełniacza (OWD). Odczyn aglutynacji próbówkowej (OA) nie jest zbyt wiarygodnym testem w rozpoznawaniu brucelozy małych przeżuwaczy (10). Próba ta zgodnie z obowiązującą w Polsce instrukcją (7) zaliczana jest do testów obowiązkowych w serodiagnostyce brucelozy, jednak jako taka powinna być wycofana. OKAP i OWD są u owiec i kóz testami miarodajnymi i szeroko stosowanymi. OKAP jest dobrym testem przeglądowym do wykrywania stad zakażonych lub do kontroli serologicznej stad uwalnianych i wolnych od brucelozy, a OWD jest próbą podstawową w indywidualnym badaniu zwierząt. Niezgodności między wynikami OKAP i OWD nie są rzadkie u zakażonych owiec i kóz i w związku z tym wyniki tych dwóch testów powinny być rozpatrywane jednocześnie. Antygenem do wykonania OKAP i OWD, zalecanym przez OIE, jest antygen sporządzony z *Brucella abortus* biotyp 1, szczep 99 lub 1119-3. Należy zwrócić uwagę na to, że w rutynowej diagnostyce serologicznej brucelozy owiec i kóz, stosuje się antygen *Br. abortus*. Gatunek ten reaguje krzyżowo z przeciwciałami swoistymi dla dwóch pozostałych gatunków (*Br. melitensis*, *Br. suis*), a natężenie reakcji jest podobne jak ma to miejsce w układzie homologicznym.

Można stosować tzw. ciepłą lub zimną metodę odczynu wiązania dopełniacza. W metodzie ciepłej temperatura inkubacji wynosi 37°C przez 30 minut, natomiast w metodzie zimnej składniki testu inku-

buje się w temperaturze 4°C przez 14-18 godzin. Do badania używa się surowic inaktywowanych w temperaturze 60-63°C przez 30 minut. Zarówno ciepłe i zimne wiązanie dopełniacza ma swoje wady. W zimnym wiązaniu dopełniacza widoczna jest antykomplementarna aktywność surowicy, natomiast inkubacja w temperaturze 37°C powoduje wzrost częstości i intensywności zjawiska prozony. Oprócz techniki makro do wykonania OWD można stosować wersję mikro (10).

Według OIE (10) surowicą standardową w badaniach diagnostycznych w kierunku brucelozy, wykonywanych przy użyciu OWD jest ISABS II (Drugi Międzynarodowy Standard Surowicy Anty-*Brucella*). Zawiera ona w 1 ml 1000 mjpwd (międzynarodowej jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz). Surowica ta pozwala na określenie tzw. współczynnika x dla stosowanego w odczynie antygeny. Służy on do określenia poziomu przeciwciał anty-*Brucella* w badanej surowicy, wyrażonego w mjpwd. Jeśli np. miano ISABS II względem użytego antygeny wynosi 200, wtedy współczynnik x posiada wartość 5 (wynika to z ilorazu  $1000:200=5$ ). W związku z tym, jeśli miano surowicy badanej wynosiło np. 10, to 1 ml tej surowicy zawierał 50 mjpwd (wynika to z iloczynu  $10 \times 5=50$ ). Zastosowanie surowicy standardowej i wyrażanie wyniku w mjpwd zapewnia możliwość porównywania wyników uzyskanych w różnych laboratoriach przy użyciu różnych antygenów. Surowica standardowa Unii Europejskiej (EU) posiada podobnie jak ISABS II 1000 jednostek EU w ml. Ogólnie za dodatnie uważa się surowice zawierające w 1 ml co najmniej 20 mjpwd (10).

Obecnie prowadzone są badania nad wprowadzeniem testu ELISA do diagnostyki serologicznej zakażeń pałeczkami *Brucella* u owiec i kóz (10).

Szeroko, jako badanie skringowe lub dodatkowe, stosowany jest u owiec i kóz test alergiczny. Uważa się, że antygeny używane w testach alergicznych nie powinny zawierać w swoim składzie lipopolisacharydu, by nie indukować powstawania przeciwciał. Mogłoby to wpływać na wyniki badań serologicznych. Próbę alergiczną u owiec i kóz wykonuje się wprowadzając alergen pod spojówkę dolnej powieki lub śródskórną. Wynik testu odczytuje się po 48 godzinach od wykonanej iniekcji. Jakakolwiek widoczna reakcja (zaczerwienienie, obrzęk, zgrubienie powieki > 2 mm) interpretowana jest jako dodatnia. Nie obserwuje się reakcji dodatniej u zwierząt, które nie miały kontaktu z drobnoustrojem. Jednak zdarzają się osobniki zakażone, lecz nie reagujące w wymienionym teście (2, 10, 11). Próby alergicznej nie wykonuje się u zwierząt szczepionych.

### Bruceloza owiec wywołana przez *Brucella ovis*

Brucelozę owiec wywołaną zakażeniem *Brucella ovis* określa się jako zapalenie najądrza (ang. ovine

epididymitis). Drobnoustrój ten nie występuje u innych gatunków zwierząt ani u człowieka (1, 2, 11). Po raz pierwszy została opisana w 1953 r. w Nowej Zelandii i Australii. Drobnoustrój występuje w formie szorstkiej. Powoduje kliniczną lub subkliniczną postać choroby, która charakteryzuje się zaburzeniami ze strony układu rozrodczego u tryków, a u maciorek zapaleniem łożyska i ronieniem. Głównymi następstwami choroby są: zmniejszona płodność lub niepłodność tryków, ronienia u owiec oraz rodzenie słabo żywotnych jagniąt. Jagnięta, które zostały donoszone, rodzą się martwe albo giną w pierwszych dniach po urodzeniu. Podczas kolejnych porodów u większości zakażonych zwierząt nie obserwuje się żadnych odchyłeń od normy.

Pierwszym sygnałem choroby u tryków mogą być zmiany jakościowe nasienia (zmniejszona ruchliwość i wysoki odsetek martwych plemników). Może wystąpić powiększenie jedno lub obustronne jąder oraz zapalenie najądrzy, przy czym dotyczy to częściej ogona najądrza niż głowy lub trzonu. W jądrach może wystąpić zwyrodnienie włókniste. Zmiany te są zazwyczaj trwałe. Tryki z zapaleniem obu najądrzy wykazują obniżoną płodność, a w części przypadków występuje u nich brak plemników w ejakulacie.

Głównym sposobem zakażenia wydaje się być przenoszenie zarazka drogą płciową. Zakażone samice mogą wydalać drobnoustroje wraz z wydzieliną z pochwy oraz z mlekiem. W związku z tym drogą przenoszenia zarazka jest transmisja maciora – ssące jagnię oraz maciora – tryk. Tryczki już w wieku trzech miesięcy mogą ulec zakażeniu po zetknięciu się z zakażonymi owcami dorosłymi (2, 10, 11).

Stwierdzenie objawów klinicznych ze strony układu rozrodczego w postaci jedno lub obustronnego zapalenia jąder bądź najądrzy, może wskazywać na obecność infekcji w stadzie. Jednak rozpoznanie kliniczne nie jest wystarczająco wiarygodne, ponieważ tylko u około 50% tryków zakażonych *Br. ovis* występują wymienione objawy kliniczne. Ponadto rozpoznanie kliniczne nie wyklucza udziału innych bakterii powodujących zapalenie jąder i najądrzy. Drobnoustrojami izolowanymi z przypadków *epididymitis* mogą również być: *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *Brucella melitensis*, *Chlamydia psittaci* (3, 4, 5, 9, 12, 13). Na obszarach, gdzie występują zakażenia owiec na tle *Br. ovis* może współistnieć *Br. melitensis* i w związku z tym należy zachować ostrożność w obchodzeniu się z materiałem do badań, a w diagnostyce uwzględnić oba gatunki *Brucella* (2, 10, 11).

W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej preferowane i zalecane (10) są metody oparte na testach serologicznych.

Wykorzystuje się: odczyn wiązania dopełniacza (OWD), test immunodyszki w żelu agarowym (AGID) oraz test immunoenzymatyczny ELISA.

Czułości AGID i ELISA są podobne, ale wyższe niż OWD. Kombinacja tych dwóch testów wydaje się dawać najlepsze rezultaty jeśli chodzi o miarodajne zwiększenie liczby wykrywanych seroreagentów.

Biorąc pod uwagę koszty i prostotę wykonania, AGID jest testem chętniej stosowanym w krajach rozwijających się. Jedynym i zalecanym przez OIE i EU testem w obrocie międzynarodowym owiec pozostaje nadal OWD.

Antygenem używanym w badaniach serologicznych jest antygen (HS-ekstrakt) otrzymany z *Brucella ovis* metodą ekstrakcji cieplnej z płynem fizjologicznym. Głównym jego składnikiem jest lipopolisacharyd (R-LPS) otrzymany ze szczepu szorstkiego *Brucella ovis*. HS-ekstrakt w związku z dobrą rozpuszczalnością w wodzie uznawany jest za najlepszy z dotąd stosowanych antygenów diagnostycznych. Wykorzystywany on jest zarówno w AGID, OWD i ELISA. Antygen do AGID i ELISA, powinien zostać miareczkowany stosując zestaw surowic dodatnich i ujemnych, natomiast antygen używany do OWD miareczkuje się względem Międzynarodowego Standardu Surowicy anty-*Brucella ovis*.

Odczyn wiązania dopełniacza wykonuje się techniką mikro (na mikropłytkach okrągłodennych) lub makro (w probówkach). Ze względu na dosyć duży koszt komercyjnych antygenów i pozostałych komponentów odczynu, proponuje się wykonywanie go techniką mikro, lecz składniki niezbędne do wykonania testu zaleca się mianować techniką makro.

Surowice badane inaktywuje się w łaźni wodnej o temperaturze 60-63°C przez 30 minut. Następnie na mikropłytkach wykonuje się rozcieńczenia końcowe surowic. Po dodaniu antygeny i dopełniacza w rozcieńczeniach roboczych, mikropłytki pokryte taśmą samoprzylepną inkubuje się w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut lub 14-18 godzin w temperaturze 4°C. Po pierwszej inkubacji należy zdjąć taśmę z mikropłytki, dodać do wszystkich baseników odpowiednią ilość uczulonych erytrocytów i ponownie przykryć mikropłytkę taśmą. Po dokładnym wymieszaniu składników przeprowadza się ponowną inkubację w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut. Wynik odczytuje się po odwirowaniu płytek (1000 g przez 5 minut) lub pozostawia się je w temperaturze 4°C na okres 2-3 godzin celem opadnięcia krwinek. Płytki ogląda się na białym tle stosując pięciopunktową skalę ocen stopnia hamowania hemolizy (0%, 25%, 50%, 75%, 100%). Należy także brać pod uwagę rozmiar guzika osadu krwinek. Mianem surowicy badanej jest najwyższe jej rozcieńczenie, w którym występuje 50% lub mniej hemolizy.

System standaryzacji OWD w EU oparty jest na Międzynarodowym Standardzie Surowicy anty-*Brucella ovis*, która zawiera 1000 mjpwd w 1 ml. Wyniki badania powinny być wyrażone w jednostkach międzynarodowych podobnie jak to ma miejsce w ba-

daniach w kierunku *Br. melitensis*. Bliższe dane na temat sposobu określania poziomu przeciwciał w mjpwd podaje Królak i wsp. (8). Surowice, w których poziom przeciwciał jest równy lub wyższy niż 50 mjpwd wg OIE oceniane są jako dodatnie. W Polsce odpowiada to 50% lub słabszej hemolizie w rozcieńczeniu surowicy 1/5.

W ocenie przydatności OWD w diagnostyce zakażeń *Br. ovis* należy wymienić niektóre jego wady jak: konieczna inaktywacja surowic, antykomplementarna aktywność niektórych surowic, trudności w wykorzystaniu do badania surowicy zhemolizowanej (10). Zimne wiązanie dopełniacza jest bardziej efektywne niż ciepłe, lecz czasem mniej specyficzne, natomiast antykomplementarne reakcje, dosyć powszechne u owiec, występują częściej podczas zimnego wiązania dopełniacza.

AGID z powodu prostoty wykonania oraz łatwej interpretacji wyników jest zalecany do rutynowej diagnostyki serologicznej szczególnie w niewyspecjalizowanych laboratoriach. Odczyn ten należy wykonywać zgodnie z zaleceniami OIE (10). Antygen używany w AGID powinien być miareczkowany względem zestawu 20-30 surowic dodatnich pochodzących od naturalnie zakażonych *Br. ovis* owiec oraz w stosunku do surowic zwierząt wolnych od brucelozy. Optymalne rozcieńczenie antygeny winno dawać wyraźną linię precypitacyjną z surowicami dodatnimi, a nie reagować z surowicami ujemnymi.

Odczyn ELISA należy wykonać i interpretować wg wskazań OIE (10) przy użyciu antygeny HS. Mając na względzie możliwość istnienia surowic ujemnych w teście ELISA, a dodatnich w AGID, zalecana jest kombinacja obu tych metod. W takim przypadku uzyskuje się bardziej miarodajne wyniki w odniesieniu do zwierząt zakażonych *Br. ovis*.

#### Piśmiennictwo

1. Anusz Z.: Zapobieganie i zwalczanie zawodowych chorób odzwierzęcych. Wyd. ART, Olsztyn 1995.
2. Bilecki Ś.: Bruceloza zwierząt. PWRiL, Warszawa 1985.
3. Bulgin M. S., Anderson B. C.: J. Am. vet. med. Ass. 182, 372, 1983.
4. Burgess G. W., McDowell J. W.: Aust. Vet. J. 59, 23, 1981.
5. De Long W. J., Waldhalm D. G., Hall R. F.: Am. J. vet. Res. 40, 101, 1979.
6. Instrukcja nr 52 Min. Roln.-Dep. Wet. z dn. 31.05.1980 r. wykonywania odczynu wiązania dopełniacza w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
7. Instrukcja tymczasowa nr 15 Min. Roln.-Dep. Wet. z dn. 27.10.1964 r. w sprawie wykonywania badań na brucelozę za pomocą aglutynacji probówkowej.
8. Królak M., Arent Z.: Standardowa technika odczynu wiązania dopełniacza (OWD) w rozpoznawaniu zakażeń *Brucella ovis* u owiec. PIWet., Puławy 1996.
9. Livingstone C. W., Hardy W. T.: Am. J. vet. Res. 25, 660, 1964.
10. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Lists A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees, OIE, Paris 1996.
11. The Merck Veterinary Manual. A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and Control for the Veterinarian, Merck & Co., Inc., Rahway, USA 1991.
12. Webb R. F.: Res. vet. Sci. 35, 30, 1983.
13. Williamson P., Nairn M. E.: Aust. Vet. J. 56, 496, 1980.

Adres autora: lek. wet. Wojciech Iwaniak, ul. Czartoryskich 9/5, 24-100 Puławy