

Występowanie przeciwciał anti-*Chlamydophila* spp. w wybranej populacji bydła w Polsce

KRZYSZTOF NIEMCZUK

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

Niemczuk K.

Occurrence of anti-*Chlamydophila* sp. antibodies in selected cattle populations in Poland

Summary

Bovine chlamyphilosis monitoring programs have not been run in Poland during the last decade, therefore the epidemiological status of the disease remains unrecognised. Recently observed animal movements, including international trade and import of livestock into Polish territory, support the necessity of serological surveillance of chlamyphilosis in representative subsets of the Polish bovine population. The aim of the study was the evaluation of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* seroprevalence in a subset of the bovine population and the comparative evaluation of serological techniques used in chlamyphilosis diagnostics (CFT, ELISA).

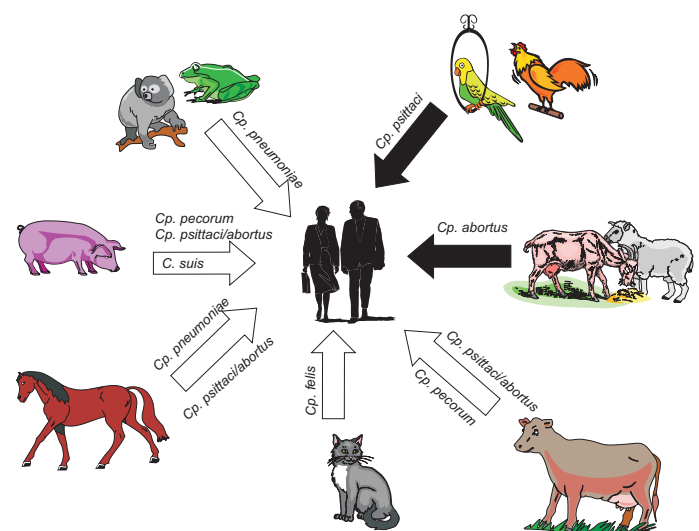
Keywords: cattle, *Chlamydophila* sp.

W Polsce nie podejmowano dotychczas badań monitoringowych nad statusem epidemiologicznym chlamydiofilozji (dotychczas zwanej chlamydiozą) bydła. Dane odnośnie do uaktualnionej taksonomii drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae*, podobnie jak informacje o ich patogenności dla ludzi i zwierząt, były w ostatnim czasie przedmiotem licznych publikacji (7, 9, 15, 19, 21) w tym także w języku polskim (5, 12, 14, 18).

Biorąc pod uwagę fakt dużej migracji zwierząt, szczególnie związanej z ich importem oraz brak opracowań dotyczących bydła rodzimego, przeprowadzenie serologicznych badań monitoringowych, obrazujących obecność przeciwciał anti-*Chlamydophila psittaci* i *Chlamydophila abortus* (*Cp. psittaci*, *Cp. abortus*) w populacji bydła w Polsce wydaje się w pełni zasadne. Warto podkreślić, że zgodnie z danymi piśmiennictwa, stałe ogniska tej zoonozy u bydła oraz u owiec i kóz występują u naszych sąsiadów, np. Niemcy, czeskie Morawy (21). Potwierdzają to również badania, wykonywane w krajowym laboratorium referencyjnym w zakresie chlamydiozy w Puławach, z których wynika, że u tryków i owiec eksportowanych z Polski stwierdzano przeciwciała anti-*Cp. abortus* w wysokim mianie (1/256 czy 1/516), a u bydła przeciwciała anti-*Cp. psittaci* i *Cp. abortus*.

Warto również przypomnieć, że chlamydiofilozja jako zoonoza stwarza duże niebezpieczeństwo dla ludzi. Potencjał zoonotyczny drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae* ilustruje ryc. 1.

Celem podjętych badań była ocena występowania przeciwciał anti-*Cp. psittaci* i *Cp. abortus* w dostępnej populacji bydła w Polsce, a także dokonanie porównawczej analizy serologicznych metod jakościowych (odczyn wiązania dopełniacza – OWD) i ilościowych (test ELISA) stosowanych w diagnostyce chlamydiofilozji przeżuwaczy.



Ryc. 1. Potencjał zoonotyczny drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae*

Objaśnienia: *Cp.* – drobnoustroje z rodzaju *Chlamydophila*, *C.* – drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia*, → – źródła zakażenia człowieka znane dotychczas, ⇒ inne, potwierdzone po reklasyfikacji drobnoustrojów z rodziny *Chlamydiaceae* źródła zakażenia człowieka nowymi gatunkami tych bakterii

Materiał i metody

Badania serologiczne wykonano z wykorzystaniem mikrometody odczynu wiązania dopełniacza, techniki diagnostycznej zalecanej w tego typu badaniach przez Międzynarodowe Biuro ds. Epizootii O.I.E., a ponadto zwalidowanej w warunkach laboratorium oraz akredytowanej przez Polskie Centrum Akredytacji (PCA, nr akredytacji AB 544) zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2001/Api:2003. W odczynie tym użyto reagentów ze szwajcarskiej firmy Virion oraz z Wytwórni Surowic i Szczepionek Biomed – Kraków. Przed każdym badaniem przeprowadzono wewnątrzlaboratoryjną kontrolę, tj. mianowanie antygeny wobec surowicy kontrolnej pozytywnej oraz sprawdzenie aktywności pozostałych reagentów użytych w odczynie, celem stwierdzenia ich faktycznego miana/aktywności w odniesieniu do deklarowanego przez producentów. Odczyn właściwy OWD, jak i poszczególne jego etapy oraz interpretację wyników wykonano zgodnie z zaleceniami zawartymi w Manual of standards for diagnostic tests and vaccines (1) oraz w Instrukcji Głównego Lekarza Weterynarii (13). Dodatkowo każda próbka badana była dwoma testami ELISA, jednym wykrywającym gatunkowo swoiste przeciwciała anti-*Cp. psittaci* (test A, producent Dr Bommeli), drugim przeciwciała wobec immunogenego białka, o masie cząsteczkowej 80-90 kDa, swoistego dla drobnoustroju *Cp. abortus* (test B, producent Instytut Pourquier). Łącznie przebadano 1333 surowice, pochodzące od wysoko cielnych krów zarówno z hodowli rodzimej, jak i importowanych do Polski. Badania wykonano na terenie 57 powiatów.

Do wykonania preparatów odciskowych, barwionych zgodnie z metodą Stampa przy użyciu 10% fuksyny karbolowej, wykorzystano 40 łożysk pochodzących od krów, które w badaniach serologicznych zdiagnozowano jako seropozytywne i które także poroniły.

W analizie statystycznej testem χ^2 (chi-kwadrat) określono zgodność wyników uzyskiwanych dwoma porównywanymi metodami, tj. wyniki uzyskane testami ELISA odnoszono do wyników stwierdzonych w metodzie OWD. Ponadto wyliczono istotną ($p = 0,00$) wartość współczynnika korelacji Pearsona oraz współczynnika Cramera.

Tab. 2. Przykładowy rozkład mian przeciwciał anti-*Chlamydomphila* spp. stwierdzony w metodzie OWD i wartości gęstości optycznej (OD) uzyskane w testach ELISA badanych surowic

Ks	OWD						Wynik	Test ELISA (A)		Test ELISA (B)		Uwagi			
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Wartość OD		Wynik	Wartość OD	Wynik	* _ powtarzalność wyników OWD – test A	** _ powtarzalność wyników OWD – test B	*** _ powtarzalność wyników test A – test B	**** _ wszystkie wyniki jednakowe	
-	-	-	-	-	-	neg	29,8	neg	-15,3	neg				****	
-	+	+	+	+	+	neg	12,2	neg	-14,5	neg				****	
-	-	-	+	+	+	neg	29,1	neg	12	neg				****	
-	3+	3+	2+	2+	+	pos	77,7	pos	13,3	neg	*				
-	2+	2+	2+	2+	+	pos	60,6	pos	24,9	neg	*				
-	-	-	+	+	+	neg	11,0	neg	45	neg				****	
-	-	+	+	+	+	neg	7,98	neg	5,4	neg				****	
-	4+	4+	3+	3+	2+	pos	185	pos	38,9	neg	*				
-	-	-	+	+	+	neg	58,7	pos	304	pos			***		
-	-	-	+	+	+	neg	87,2	pos	83,9	pos			***		
-	3+	+	-	-	-	neg	47,1	pos	1,9	neg		**			
-	3+	2+	-	-	-	neg	86,9	pos	-110	neg		**			
-	4+	3+	2+	2+	-	pos	48,5	pos	99,4	pos				****	

Objaśnienia: neg – negatywny, poz – pozytywny, Ks – kontrola surowicy, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 – kolejne rozcieńczenia badanych surowic

Wyniki i omówienie

Pomimo rosnącego w ostatnich latach zainteresowania infekcjami wywołanymi przez drobnoustroje z rodzaju *Chlamydomphila* u zwierząt i ich potencjałem zoonotycznym, w dostępnym piśmiennictwie generalnie stwierdza się brak danych dotyczących statystycznych ocen porównawczych metod serologicznych, stosowanych w ich diagnostyce – szczególnie odnoszących się do badań urzędowych, tj. do technik laboratoryjnych zalecanych przez Międzynarodowy Urząd ds. Epizootii OIE. W związku z tym należy zwrócić uwagę na fakt, że zaprezentowane badania własne są w znacznym zakresie pionierskie i dlatego też trudno jest znaleźć odniesienie w dostępnym piśmiennictwie fachowym do stwierdzonych w nich zależności. Większość autorów (2, 3, 6, 10, 20), podejmując próby porównywania wyników uzyskiwanych metodami serologicznymi, ogranicza się bowiem jedynie do obliczenia procentowych zależności stwierdzonych pomiędzy nimi.

W badaniach własnych, wykonanych metodą OWD, jak i testami ELISA, 1333 surowic wyniki pozytywne stwierdzono u 257 zwierząt, co stanowiło 19,3%. Do analizy statystycznej wybrano losowo surowice pochodzące od 93 zwierząt, zdiagnozowanych jako pozytywnie oraz negatyw-

Tab. 1. Powtarzalność wyników stwierdzona w zastosowanych testach (n-93)

Porównanie zastosowanych testów		Liczba i procentowy udział zwierząt reagującychtak samo w porównywanych testach	
OWD	ELISA – test A	76	81,72%
OWD	ELISA – test B	60	64,52%
ELISA – test A	ELISA – test B	51	54,84%
OWD, ELISA – test A, ELISA – test B		47	50,54%

nie reagujące. Analizę wyników uzyskanych poszczególnymi testami przedstawiono w tab. 1, a ich przykładowe zestawienie w tab. 2.

Analizując uzyskane wartości należy podkreślić, że największą powtarzalność wyników (81,72%) wykazano w przypadku zastosowania metody OWD i ELISA – test A, wykrywającego przeciwciała specyficzne tylko dla *Cp. psittaci*. W metodzie OWD wykorzystano antygen grupowo swoisty, wykrywający swoiste przeciwciała zarówno wobec *Cp. psittaci*, jak i *Cp. abortus*. Można domniemać, że w takich przypadkach mamy do czynienia z nosicielstwem bądź z infekcją uogólnioną. U krów tych nie odnotowano bowiem roniń, a w badaniu bakterioskopowym pochodzących od nich łożysk nie stwierdzono ciałek elementarnych (EB) chlamydofil. W odniesieniu do testu ELISA z antygenem *Cp. psittaci* podobne zależności wykazane zostały przez Hoelzla i wsp. oraz Stepaneka i wsp. (8, 21). Celem wyeliminowania wyników fałszywie ujemnych, odnoszących się do postaci rozrodzanej chlamydofilozy bydła, w badaniach serologicznych autorzy ci sugerują konieczność zastosowania zestawów zawierających antygen bivalentny, tj. taki, który ma zdolność wykrywania przeciwciał swoistych dla *Cp. psittaci*, jak i *Cp. abortus*.

W przeprowadzonej analizie statystycznej, test χ^2 (na poziomie istotności $p = 0,00$) wykazał dużą zgodność wyników porównywanych testów. Jego wartość wyniosła 37,31 i dała podstawy do wysunięcia twierdzenia, że porównywane metody są zależne i dają istotnie zgodne wyniki. Ponadto określono współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Jego wartość wyniosła 0,6572. Dla tablicy 2×2 , zawiera się ona w przedziale pomiędzy 0 a 0,707 i określa stopień zależności porównywanych metod. Im bliżej zera znajduje się jego wartość, tym zależność jest słabsza, natomiast im bliżej 0,707, tym zależność jest silniejsza. Podobną sytuację stwierdzono w przypadku współczynnika Cramera, którego wartość, w przedziale od 0 do 1, wyniosła również 0,6572.

Następnie zbadano zależność pomiędzy metodą OWD i ELISA – test B, za pomocą którego wykrywa się swoiste przeciwciała dla immunogenego białka, występującego tylko u *Cp. abortus*. Została ona określona powtarzalnością wyników wobec 60 surowic, co stanowiło 64,52%. Zastosowanie testu ELISA, zdolnego wykrywać swoiste przeciwciała wobec *Cp. abortus*, zalecają także inni autorzy (2, 6, 16), sugerując jednocześnie, że może on stanowić cenne uzupełnienie OWD. Zgodnie z danymi piśmiennictwa (9, 16, 20), ta postać chlamydofilozy objawiająca się zapaleniem dróg rodnych, powoduje znaczne straty ekonomiczne i stanowi poważne zagrożenie dla ludzi (ronienia). W wykonanej analizie statystycznej stwierdzono niższą niż poprzednio wartość testu χ^2 . W porównaniu tym wyniosła ona 10,08 przy współczynniku Cramera i Pearsona równym 0,540. Wymienione wartości funkcji statystycznych dają podstawy do stwierdzenia, że porównywane metody są zależne i dają istotnie zgodne wyniki. Porównanie dwóch testów ELISA, tj. testu A i B, wyrażające się powtarzalnością wyników wobec 51 zbadanych surowic, nie znalazło potwierdzenia w analizie statystycznej. Wartość testu χ^2 wynosiła bowiem zaledwie 0,08, przy wartości współczynnika Cramera: 0,0541 i ujemnej wartości współczynnika Pearsona 0,0541. W przypadku tych testów analiza statystyczna wykazała nieistotną zgodność porównywanych wyników.

Spośród poddanych szczegółowej analizie 93 zwierząt, 47 reagowało pozytywnie, we wszystkich zastosowanych

testach, a 40 z nich, tj. 43,01% poroniło. W łożyskach pochodzących od krów, które poroniły, stwierdzono ciałka elementarne chlamydofil.

Ustalenie zależności statystycznej pomiędzy serologicznymi metodami jakościowymi a ilościowymi wymaga niewątpliwie dalszych rozszerzonych badań. Dlatego też stwierdzone w zaprezentowanych badaniach zależności należy traktować jako wstępne. W ramach projektu badawczego „Doskonalenie metod diagnozowania oraz ocena sytuacji epidemiologicznej chlamydofilozy bydła w Polsce” – nr 2 PO6K 040 27 dalsze badania z tego zakresu będą kontynuowane. Ponadto będą one uzupełnione o metody potwierdzające – polimerazową reakcję łańcuchową i metody hodowlane.

Piśmiennictwo

- Aitken J. D., Longbottom D.: Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis), [w:] Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Off. Internat. Epizoot. Paris 2004, 635-641.
- Borel N., Doherr M. G., Vretou E., Psarrou R., Thoma R., Pospischil A.: Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland. Prev. Vet. Med. 2004, 65, 205-216.
- Buendía A. J., Cuello F., Del Rio L., Caro M., Salinas J.: Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing Chlamydia abortus. Vet. Microbiol. 2001, 78, 229-239.
- Daniel R. G., Holliman A., Davig G. P., Kirby F. D., Simpson V. R., Cranwell M. P., Dawson M., Griffiths P. C., Bevan B. J.: Bovine chlamydiosis in the United Kingdom. Vet. Rec. 1993, 133, 351-352.
- Deptula W., Pawlikowska M., Travnicek M.: Chlamydofiloza u zwierząt i ludzi. Medycyna Wet. 2002, 58, 337-340.
- Enrican G., Buxton D., Longbottom D.: Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. J. R. Soc. Med. 2001, 94, 273-277.
- Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A.: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999, 49, 415-440.
- Hoelzle L., Hoelzle K., Wittenbrink M.: Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum, and Chlamydia suis as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. Vet. Microbiol. 2004, 103, 85-90.
- Jee J., Degraeves F., Kim T., Kaltenboeck B.: High prevalence of natural Chlamydia species infection in calves. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 5664-5672.
- Johnson F. W. A., Clarkson M. J., Spencer W. N.: Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (Chlamydia psittaci) in cell cultures. Vet. Rec. 1988, 113, 413-414.
- Jones G. E., Low J. C., Machell J., Armstrong K.: Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes. Vet. Rec. 1997, 141, 164-168.
- Niemczuk K.: Chlamydiozy/chlamydofilozy jako zoonozy – diagnostyka laboratoryjna. Monografia PIWet-PIB, Puławy 2004, 1-82.
- Niemczuk K.: Instrukcja nr 42/2003 Głównego Lekarza Weterynarii, z dnia 25 czerwca 2003 r., dotycząca przeprowadzania serologicznej diagnostyki chlamydiozy bydła z wykorzystaniem mikrometody odczynu wiązania dopełniacza (OWD). Nr GIWzVII.420/lab – 19/2003.
- Niemczuk K., Truszczyński M.: Klasyfikacja bakterii ze szczególnym uwzględnieniem reklasyfikacji rodziny Chlamydiaceae. Medycyna Wet. 2003, 59, 27-30.
- Niemczuk K., Truszczyński M.: Pathogenicity of the microorganisms of the family Chlamydiaceae respecting the changes in their classification. P. J. Vet. Sci. 2002, 5, 99-102.
- Pospischil A., Thoma R., Hilbe M., Grest P.: Abortion in humans by Chlamydia abortus. Schweiz Arch. Tierheilkd. 2002, 144, 463-466.
- Rodolakis A.: Chlamydiosis in ruminants and the possibility of human contamination. Rev. Int. Trach. Pathol. Ocul. Trop. Subtrop. Sante. Publique. 1982, 2, 31-41.
- Rzedzicki J., Tokarzewski S.: Ptaki jako potencjalne źródło zakażenia ludzi chlamydiami. Medycyna Wet. 2001, 57, 459-463.
- Sachse K., Gallien P.: Molekularbiologische Nachweis-Methoden ausgewählter Zoonoseerreger. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – BGVV Hefte, 2000, 2, 29-41.
- Salti-Montesanto V., Tsoli E., Papavassiliou P., Psarrou E., Markey B. K., Jones G. E., Vretou E.: Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of Chlamydia psittaci serotype 1. A. J. Vet. Res. 1997, 58, 228-235.
- Stepanek O., Jindrichova J., Horacek J., Krpata V.: Chlamydiosis in cattle and in man: an epidemiologic and serologic study. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 2003, 27, 445-459.

Adres autora: dr Krzysztof Niemczuk, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kniem@piwet.pulawy.pl