

Enzootia listeriozy u bydła na Kaszubach

ANDRZEJ SALWA, ANTONI KOPCZEWSKI, BOGNA BORKOWSKA-OPACKA*,
WŁODZIMIERZ PRZEWOSKI**, LEONARD STRZAŁKOWSKI, AGNIESZKA SROKA,
ZBIGNIEW ARENT, EDWARD MALINOWSKI***, ANDRZEJ LACHOWSKI***

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

*Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

**Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, ul. Na Stoku 50, 80-958 Gdańsk

***Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Bydgoszczy,
ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-176 Bydgoszcz

Salwa A., Kopczewski A., Borkowska-Opacka B., Przewoski W., Strzałkowski L.,
Sroka A., Arent Z., Malinowski E., Lachowski A.

Epizootic of listeriosis in cows in the Kaszuby region

Summary

The aim of the study was to determine the etiological factors of an outbreak of cattle illness with symptoms nervous disorders. The disease appeared simultaneously in adult animals on three dairy farms between August and October. The majority of sick animals was after parturition and had high milk production. The diagnosis gene was found through clinical anatomopathology, histopathology and bacteriological examinations of the animals, as well as molecular, serological, virological and chemical tests. *L. monocytogenes* was isolated from the brain tissue of the dead animals. Restriction analysis (PCR-RFLP) of the DNA fragment of the hly A gene from *L. monocytogenes* facilitated differentiation between the virulent and control strains.

It was found that the copper and selenium levels in the cows' serum were reduced significantly. Additional examinations indicated the low content of these minerals in the forage.

Keywords: cattle, listeriosis, epidemiology

Listerioza ludzi i zwierząt stanowi nadal jedno z aktualnych zagadnień epidemiologicznych i epizootologicznych. Wzrost zainteresowania wynika przede wszystkim z jej znaczenia jako zoonozy, bardzo często śmiertelnej choroby ludzi, której źródłem zakażenia jest żywność pochodzenia zwierzęcego (6, 9, 11, 14, 17). Pod koniec XX wieku w USA zanotowano u ludzi około 1700 przypadków rocznie listeriozy przebiegającej w postaci *meningoencephalitis* i *sepsis*, przy śmiertelności sięgającej 25% (6).

W Polsce listerioza u bydła została opisana po raz pierwszy przez Czarnowskiego i Chylińskiego w 1964 r. (5). Spośród zwierząt gospodarskich choroba ta najczęściej występuje u owiec i bydła. Diagnozuje się ją również u zwierząt dziko żyjących, ptaków, ryb (4, 7, 18, 20, 22). U bydła dorosłego przebiega głównie z objawami ze strony centralnego układu nerwowego. W niektórych przypadkach może powodować ronienia, zatrzymanie łożyska, zapalenie macicy i zapalenie wymienia. U cieląt i młodego bydła ma przebieg posocznicy. Niekiedy choroba może rozwinąć się w warunkach obniżonej odporności organizmu, w następstwie niedoborów białka, witaminy A i E oraz niektórych pierwiastków: żelaza, miedzi, seleniu (1, 17, 22). Czynnikiem etiologicznym jest wa-

runkowo chorobotwórcza Gram-dodatnia, pałeczka *Listeria monocytogenes*, która ma szczególne powinowactwo do komórek tkanki nerwowej. W warunkach naturalnych do zakażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową za pośrednictwem pasz (4, 5, 7, 13). Źródłem zakażenia mogą być inne zwierzęta po przechorowaniu lub bezobjawowej infekcji.

W niniejszym opracowaniu opisano liczne przypadki zachorowań krów wśród objawów biegunki i zaburzeń neurologicznych w miejscowości T. na terenie Kaszub w województwie pomorskim. Zachorowania stwierdzono równocześnie w trzech odległych od siebie gospodarstwach, należących do rolników indywidualnych.

Materiał i metody

Przeprowadzono badania epizootyczno-kliniczne, anatomopatologiczne i laboratoryjne (bakteriologiczne, histopatologiczne, wirusologiczne, molekularne, serologiczne, chemiczne, biochemiczne). Do badań pobrano 30 próbek krwi, 10 próbek mleka od chorych krów oraz pobrano 6 próbek wycinków narządów wewnętrznych: wątroby, śledziony, nerek, płuc oraz mózgu i rdzenia przedłużonego od padłych lub poddanych ubojowi zwierząt. Ponadto zbadano 21 próbek różnych pasz oraz wody z obór, w których przebywały zwierzęta. Badania laboratoryjne wykonano w oparciu o ogólnie przyjęte metody badawcze.

Opis przypadków i wyniki badań

Badania epizootyczne-kliniczne. Zachorowania zwierząt wystąpiły równocześnie w trzech gospodarstwach, w których przebywało łącznie 90 sztuk bydła rasy ncb, w tym 71 krów i 19 jałówek. Z przeprowadzonego wywiadu wynikało, że w ostatnich latach chorób zakaźnych w tej miejscowości i okolicy u bydła i innych zwierząt gospodarskich nie notowano. Nie stosowano również żadnych szczepień ochronnych. Wcześniejsze wizyty lekarzy weterynarii w tych gospodarstwach były sporadyczne, jedynie z powodu wystąpienia u krów komplikacji poporodowych oraz zachorowań cieląt z objawami ze strony układu oddechowego. W czasie wystąpienia choroby w gospodarstwach warunki hodowlano-żywnieniowe uznano za dobre. Kondycja krów była zróżnicowana. Średnia wydajność mleczna od krowy wynosiła około 6-7 tys. litrów rocznie. Zwierzęta były żywione głównie kiszunką z kukurydzy, sianem oraz paszą treściwą, a w okresie wiosenno-letnim dodatkowo podawano zielonki z traw i roślin motylkowych. W czasie trwania enzootii od sierpnia do października padło 17 krów i 12 skierowano do uboju z konieczności. Pierwszymi zaobserwowanymi objawami chorobowymi u krów była biegunka, osowiałość i stopniowa utrata łaknienia. U niektórych zwierząt można było zauważyć osłabiony chód i trudności w koordynacji ruchów oraz zgrzytanie zębami i ślinotok. W dalszym przebiegu choroby krowy leżały na stanowiskach w oborze z obniżoną reaktywnością na bodźce zewnętrzne. Ciepłota wewnętrzna ciała wynosiła od 38,5°C do 38,7°C. Tętno i tony serca były przyspieszone i słabo wyczuwalne. W ciągu 2-3 dni od zauważenia pierwszych objawów chorobowych następowało zejście śmiertelne. W leczeniu chorych krów stosowano antybiotyki, sulfonamidy i preparaty wit. A + D₃. Krowom podawano dożylnie iniekcje roztworów glukozy, płynu fizjologicznego i preparatów wapniowo-magnezowych. Należy zaznaczyć, że większość chorych krów była po porodzie i cechowała się o wysoką wydajnością mleczną.

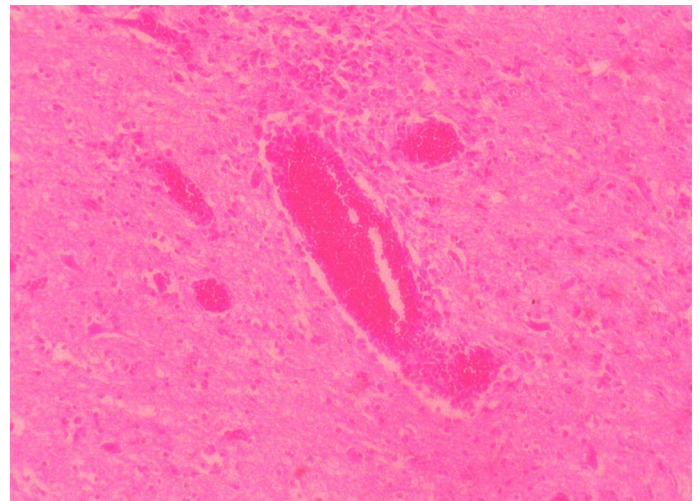
Badania anatomopatologiczne. Przeprowadzona sekcja krów nie wykazała wyraźnie zaznaczonych zmian anatomopatologicznych. W toku sekcji tych stwierdzono zwiększoną ilość płynu wysiękowego w worku osierdziowym, liczne wybroczyny pod nasierdziem i zwyrodnienie mięśnia sercowego. Pod oponą miękką obu półkul mózgowych zaobserwowano obustronne silne wypełnienie naczyń i drobne wybroczyny w korze mózgowej.

Badanie histopatologiczne. W obrazie mikroskopowym wykazano zmiany morfologiczne, obejmujące pień mózgu oraz rdzeń przedłużony w postaci ogniskowych zapaleń ropno-martwicowych, przekrwienia tkanki mózgowej oraz obrzęku komórek nerwowych. Wokół naczyń krwionośnych wystąpiły nacieki granulocytów obojętnochłonnych, limfocytów oraz histiocytów (ryc. 1). Badaniem histopatologicznym pnia mózgu nie stwierdzono zmian patognomicznych dla gąbczastej encefalopatii (BSE). Próby bezpośredniego odczynu immunofluorescencyjnego wykonane na tkance mózgowej od padłych krów w kierunku wykrycia antygeny wirusa wścieklizny oraz wirusa choroby Aujeszky'ego dały wyniki negatywne.

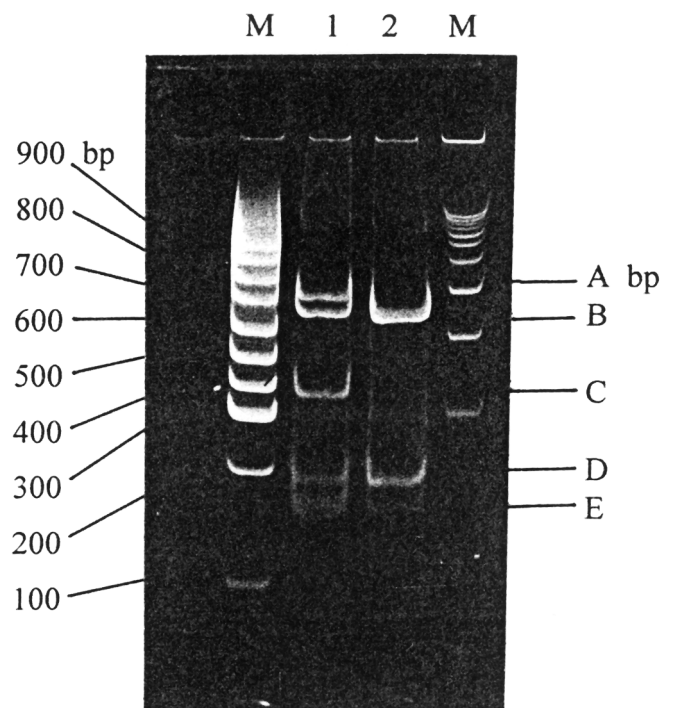
Badania bakteriologiczne. Prowadzone równoległe badania hodowlane na podłożach wybiórczo-różnicujących

i próba biologiczna na białych myszkach wykazały w wycinkach mózgu i rdzenia padłych lub poddanych ubojowi zwierząt obecność bakterii z rodzaju *Listeria monocytogenes*. Ogółem wyizolowano 4 szczepy *L. monocytogenes* od krów pochodzących z 3 gospodarstw.

Badanie molekularne. Zastosowana technika PCR-RFL umożliwia zidentyfikowanie szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych od chorych krów. Stwierdzono, że we wzorze restrykcyjnym badanych szczepów było brak dwóch fragmentów DNA: B i C o wielkości powyżej 100 pz (ryc. 2). Natomiast badania bakteriologiczne wycinków narządów wewnętrznych, mleka od chorych krów oraz pasz



Ryc. 1. Nacieki komórek leukocytarnych wokół naczyń krwionośnych. Barwienie H+E. Pow. 200 ×



Ryc. 2. Analiza restrykcyjna produktów PCR fragmentu genu HlyA *L. monocytogenes* po trawieniu enzymem CviJI. Ścieżki przedstawiają: M – wzorce DNA (bp), 1 – szczep wzorcowy, 2 – szczep izolowany od chorych krów. Z lewej strony zdjęcia oznaczono wielkości DNA markera, z prawej wielkości fragmentów DNA genu

i wody nie wykazały obecności drobnoustrojów chorobotwórczych w tym *L. monocytogenes*.

Badania wirusologiczne. Próby izolacji z wycinków narządów wewnętrznych oraz tkanki mózgowej i rdzenia na hodowlach komórkowych bydła (MDBK) w kierunku obecności wirusów: herpeswirusa bydłowego typu 1 (BHV-1), parainfluenzy typu 3 (PI-3), biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD) oraz choroby Aujeszky'ego dały wynik ujemny.

Badanie serologiczne. Odczyn aglutynacyjny w kierunku listeriozy dał wynik dodatni u wszystkich badanych zwierząt. Miana przeciwciał u seroreagentów wahały się od 1/40 do 1/80. U dwóch krów stwierdzono miana 1/160. Dodatkowe badanie serologiczne krwi nie wykazały przeciwciał swoistych dla BHV-1, BVD-MD, *Leptospira interrogans* ani gorączki Q.

Badanie chemiczne. Badanie treści przewodu pokarmowego, wycinków narządów wewnętrznych, surowicy krwi i pasz na obecność pestycydów chloro- i fosforoorganicznych, azotynów i azotanów, chlorku potasu i mykotoksyn dało wynik ujemny. W próbkach narządów wewnętrznych oraz surowicy krwi stwierdzono, że zawartość rtęci, arsenu, ołowiu, kadmu, cynku i żelaza była w granicach przyjętych wartości referencyjnych (23). Natomiast badanie na zawartość miedzi wykazało wyraźny niedobór tego pierwiastka. Średni poziom miedzi w surowicy krwi u krów był obniżony i wynosił 8,9 $\mu\text{mol/L}$ (dolna granica normy fizjologicznej 12,6 $\mu\text{mol/L}$). Stwierdzono również bardzo niskie wartości Cu w wątrobie i nerce tych zwierząt – 3,0 mg/kg (norma 150-200 mg/kg). Ponadto mniejsze wartości tego pierwiastka wykazano również w paszach. W zależności od rodzaju paszy wartości te wahały się od 0,9 do 4,6 mg/kg. W surowicy krwi poniżej wartości referencyjnych była także zawartość selenu, która u niektórych krów wynosiła od 4 do 26 $\mu\text{g/ml}$ (norma 40 $\mu\text{g/ml}$).

Badania biochemiczne. Aktywność aminotransferaz (AspAT, AlaT) oraz poziom Mg, białka, glukozy i kwasu β -oksymasłowego wahały się w zakresie przyjętych wartości referencyjnych (21). U niektórych krów stwierdzono w surowicy krwi nieznacznie obniżony poziom wapnia i fosforu. Wskaźniki hematologiczne (liczba czerwonych i białych krwinek, hematokryt, stężenie hemoglobuliny) pozostawały w normie.

Omówienie wyników

W świetle wykonanych kompleksowych badań, w szczególności klinicznych, bakteriologicznych i molekularnych stwierdzono, że czynnikiem etiologicznym, który spowodował zachorowania i padnięcia krów w miejscowości T. była *L. monocytogenes*. Z przeprowadzonego wywiadu wynikało, że w jednym z tych gospodarstw już w lutym zachorowała i padła krowa po wycieleniu z podobnymi objawami klinicznymi zaobserwowanymi kilka miesięcy później. Wówczas uznano to za przypadek toksemii poporodowej. Poczynione spostrzeżenia sugerują, że zakażenie zwierząt *L. monocytogenes* nastąpiło już w okresie zimowym i powoli rozwijało się bezobjawowo. Przyjmuje się, że okres inkubacji zarazka w organizmie zwierząt trwa około 3-4 tygodni, a niekiedy może przedłużać

się nawet do 90 dni (11-13). Po wystąpieniu pierwszych zachorowań u krów w miesiącach letnich, we wstępnej fazie diagnostycznej uwzględniano również zakażenie tła bakteryjnego i wirusowego, w tym m.in. listeriozę, enterotoksemię, a nawet chorobę Aujeszky'ego. Ponadto pod uwagę brano zaburzenia przemiany materii i zatrucie związkami chemicznymi. W tym przypadku było to związane z informacjami od właścicieli stad krów o stosowaniu intensywnego nawożenia pastwisk i upraw kukurydzy nawozami mineralnymi i organicznymi. Potwierdzeniem ostatecznego rozpoznania było badanie bakteriologiczne. Powszechnie wiadomo, że izolacja *L. monocytogenes* z materiału biologicznego nie jest łatwa do izolacji drobnoustrojem (6, 22). Stąd też nie zawsze w pierwszych badaniach bakteriologicznych istnieje szansa szybkiego wyosobnienia tej bakterii z materiału biologicznego. W omawianym przypadku drobnoustroje te izolowano z tkanki mózgowej po kilkudniowej preinkubacji w lodówce w temperaturze +4°C. Potwierdzeniem rozpoznania była przeprowadzona próba biologiczna na białych myszach. Ważnym elementem diagnostycznym było badanie histopatologiczne, w którym potwierdzono z różnym nasileniem charakterystyczne zmiany w postaci nacieków monocytów, komórek wielojądrzastych oraz okołonaczyniowych nacieków leukocytarnych. W świetle badań Kopczeńskiego i wsp. nad listeriozą istnieje konieczność prowadzenia równoległych badań bakteriologicznych i histopatologicznych (10). Uzupełniającą metodą mogą być badania molekularne w kierunku wykrycia kwasu nukleinowego tego drobnoustroju. Do identyfikacji wyosobnionych szczepów *L. monocytogenes* zastosowano metodę PCR-RFLP (21). W reakcji tej zastosowano 2 primery komplementarne do DNA fragmentu genu hly A kodującego listeriolizynę O. Badania te wykazały, że izolowane szczepy miały identyczny wzór fragmentów DNA. Sugeruje to możliwość zakażenia krów szczepami bakterii pochodzącymi z tego samego źródła zakażenia. Dotychczasowe doniesienia z zakresu analizy molekularnej *L. monocytogenes* wskazują na występowanie w obrębie tego gatunku bakterii dwóch podtypów: podtyp I i II wraz z licznymi wariantami (15, 21). Podział ten jest powiązany z właściwościami biologicznymi *L. monocytogenes* i rodzajem zakażenia, jakie ten zarazek wywołuje, a więc zakażeniami mózgu, zapaleniami układu rozrodczego i wymion. Przeprowadzone badania serologiczne, z uwzględnieniem brucellozy, otrętu, listeriozy, leptospirozy, gorączki Q i BVD-MD dały wynik negatywny poza listeriozą.

W tym ostatnim przypadku uzyskane niskie miana przeciwciał anty-*L. monocytogenes* zdają się wskazywać na obniżoną odporność humoralną przy zakażeniu listeriami. Potwierdza to dane innych autorów wskazujących na ograniczoną przydatność stosowanych metod serologicznych w rozpoznawaniu listeriozy u ludzi i zwierząt (2, 3, 21). Należy zaznaczyć, że

w reakcjach immunologicznych przy namnażających się wewnątrzkomórkowo listeriach zaangażowana jest przede wszystkim oporność typu komórkowego (19, 22).

Wykonane badania własne nie ustaliły źródła pochodzenia zakażenia listeriami, które wywołały chorobę u krów w tych trzech gospodarstwach. Przeprowadzone próby izolacji *L. monocytogenes* z pasz (w tym wielokrotnie z kiszonek) i wody z obór, w których przebywały zakażone zwierzęta dały wynik ujemny. Można również przyjąć, że do zakażenia dochodziło za pośrednictwem innych zwierząt po przechowaniu, które następnie stawały się siewcami zarazki. Z wielu obserwacji i badań wynika, że potencjalnym źródłem *L. monocytogenes* są niewłaściwie przygotowywane i przechowywane kiszonki i siano (7, 12, 16). Szczególnie dotyczy to kiszonek z kukurydzy, które stanowiły podstawową karmę dla bydła przez około 9 miesięcy w roku. Niezależnie od wystąpienia listeriozy u krów w miejscowości T. dodatkowo stwierdzono w organizmie tych zwierząt niedobór Cu i Se. Wyniki te należy odnieść do wyników badania pasz, w których również wykazano niskie wartości tych pierwiastków. Miedź odgrywa ważną rolę w procesach oksydacyjno-redukcyjnych w organizmie wchodząc w skład wielu układów enzymatycznych (1, 8). Przykładem jest dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) uczestnicząca w procesie unieszkodliwiania bakterii żyjących wewnątrzkomórkowo przez makrofagi (19). Stały niedobór miedzi i selenu w organizmie krów nasuwa przypuszczenie, że był on uzależniony od niskiej zawartości tych pierwiastków w glebie na terenie, gdzie wystąpiły zachorowania. Z kolei niedobór selenu, biorącego udział, podobnie jak miedź, w procesach utleniania i redukcji, usuwaniu z organizmu tzw. wolnych rodników, współdziałaniu z witaminą E w ochronie komórek, może, zdaniem niektórych autorów, ułatwiać rozwój procesu chorobowego w przebiegu zakażenia listeriozą (1, 17).

W podsumowaniu przeprowadzonych obserwacji i badań należy podkreślić, że rozpoznanie listeriozy u bydła może być trudne, zaś w rozpatrywaniu tła etiologicznego listeriozy należy mieć na uwadze nie tylko sam zarazek, ale również stan fizjologiczny zwierząt, wysoką mleczność, okres ciąży oraz szeroko pojęte środowisko.

Piśmiennictwo

1. *Agranoff D. D., Krishna S.*: Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.* 1998, 28, 403-412.
2. *Barbuddhe S. B., Malik S. V., Gupta L. K.*: Kinetics of antibody production and clinical profiles of calves experimentally infected with *Listeria monocytogenes*. *J. Vet. Med. B* 2000, 47, 497-502.
3. *Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Jemmi T.*: Use of listerin O and internalin A in seroepidemiological study of listeriosis in Swiss dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 1055-1061.
4. *Borucki M. K., Reynolds J., Gay C. C., Mc Elwain K. L., Kim S. H., Knowles D. P., Hu J.*: Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *J. Food. Prot.* 2004, 67, 249-269.
5. *Czarnowski A., Chyliński G.*: Przypadki listeriozy bydła stwierdzone na terenie woj. gdańskiego. *Medycyna Wet.* 1964, 20, 172.

6. *Farber J. M., Peterkin P. J.*: *Listeria monocytogenes* a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 1991, 55, 752-811.
7. *Fenlon D. R.*: Wild birds and silage as reservoir of *Listeria monocytogenes* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* 1985, 59, 537-543.
8. *Francis M. S., Thomas C. J.*: Mutants in the CtpA cooper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb. Patog.* 1997, 22, 67-78.
9. *Gliński Z., Luft-Deptula D., Kostro K.*: Biologia i patogenność *Listeria monocytogenes* dla zwierząt i człowieka. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 1059-1063.
10. *Kopczewski A., Strzałkowski L., Twardowski H., Chyliński G.*: Ocena wyników badań bakteriologicznych i histopatologicznych w rozpoznawaniu listeriozy owiec. *Medycyna Wet.* 1989, 45, 39-40.
11. *Kwiatk K.*: *Listeria monocytogenes* – występowanie w żywności zwierzęcego pochodzenia oraz wrażliwość na wybrane czynniki fizyczne i chemiczne. Praca hab. PIW Puławy 1992.
12. *Nightingale K. K., Fortes E. D., Ho A. J., Schukken Y. H., Grohn Y. T., Wiedmann M.*: Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 227, 1808-1814.
13. *Nightingale K. K., Schukken Y. H., Nightingale C. R., Fortes E. D., Ho A. J., Her Z., Grohn Y. T., McDonough P. L., Wiedmann M.*: Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 4458-4467.
14. *Osek J.*: *Listeria monocytogenes* – groźny czynnik zakażeń pokarmowych. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 243-248.
15. *Pohl M. A., Wiedmann M., Nightingale K. K.*: Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 2006, 67, 616-626.
16. *Purwin C., Łaniewska-Trokenheim L., Warmińska-Radyko I., Tywończuk J.*: Jakość kiszonek – aspekty mikrobiologiczne, zdrowotne i produkcyjne. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 865-869.
17. *Roberts A. J., Wiedemann M.*: Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol. Life Sci.* 2003, 60, 904-918.
18. *Schweizer G., Ehrensperger F., Torgerson P. R., Braun U.*: Clinical findings and treatment of 94 cattle presumptively diagnosed with listeriosis. *Vet. Rec.* 2005, 29, 588-592.
19. *Shen H., Tato C. M., Fan X.*: *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998, 10, 450-458.
20. *Strzałkowski L.*: Przyczyny bakteryjnych ronień w hodowli wielkostadnej bydła w świetle badań ZHW w Gdańsku w latach 1976-1981. *Życie Wet.* 1982, 47, 160-161.
21. *Vines A., Reeves M. W., Hunter S., Swaminathan B.*: Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* 1992, 143, 281-294.
22. *Wesley I. V.*: Listeriosis in animals, [w:] Ryser E. T., Marth E. H. (red.): *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Marcel Dekker Inc. New York 1999, 39-73.
23. *Winnicka A.*: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych. Wyd. SGGW, Warszawa 1997.

Adres autora: doc. dr hab. Andrzej Salwa, ul. Chałubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk-Oliwa; e-mail: a.salwa@gdansk.wiw.gov.pl