

# Występowanie przeciwciał przeciwko wirusowi choroby niebieskiego języka w surowicy zwierząt sprowadzonych do Polski

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Niedbalski W., Kęsy A.

## Prevalence of antibodies specific to bluetongue virus (BTV) in animals imported to Poland

### Summary

The aim of this study was to determine of seroprevalence of bluetongue (BT) virus specific antibodies in susceptible animals imported into Poland after 15 June 2006 from Germany, the Netherlands, France and Belgium. From 1 September to 31 December 2006, 5757 samples of sera supplied from 16 voivodeships were tested by c-ELISA, and positive results were confirmed using agar gel immunodiffusion (AGID). Out of all tested sera, only 3 samples from Zachodniopomorskie Voivodeship were found to be positive for antibodies to BTV (0.05% of the total number of sera samples). The seroreagents were held on a farm in the Swidwin district but their country of origin was the Netherlands. No virus was detected by RT-PCR in EDTA blood samples taken from seroreagents. The results obtained in the National Veterinary Research Institute confirmed by the Community Reference Laboratory for BT in Pirbright (England), where antibodies against BTV-8 were detected in the supplied sera samples.

**Keywords:** bluetongue (BT), imported animals

Pojawienie się nowej choroby zakaźnej zapoczątkowuje zawsze szereg różnych działań o charakterze administracyjno-sanitarnym. Jednym z nich jest prowadzenie przeglądów serologicznych zwierząt podatnych, podstawowego elementu oceny statusu immunologicznego badanej populacji. Odnosi się to również do chorób transmisyjnych, o których rozprzestrzenianiu decydują wektory biologiczne. Obserwuje się, że granice występowania wektorów wielu patogenów ulegają zmianom, z różnych przyczyn, między innymi w wyniku ocieplania się klimatu i wzrostu wilgotności powietrza. Chorobą, która w minionym roku spowodowała ogromne problemy w Europie Zachodniej, była choroba niebieskiego języka (bluetongue – BT), która z powodu stwierdzenia po raz pierwszy w sierpniu 2006 r., znalazła się w centrum zainteresowania epidemiologów weterynaryjnych.

Choroba niebieskiego języka jest zakaźną, lecz nie zaraźliwą chorobą owiec oraz innych przeżuwaczy domowych i dzikich, wywoływaną przez wirus z rodzaju *Orbivirus*, rodzina *Reoviridae*. Dotychczas rozpoznano 24 serotypy wirusa choroby niebieskiego języka (BTV-1 do BTV-24). Wirus ten jest przenoszony przez wektory, owady kłująco-ssące z rodzaju *Culicoides* (rodzina: kuczmany). W warunkach do-

świadczalnych stwierdzono również możliwość jego przenoszenia przez nasienie, komórki jajowe i zarodki (9). Właściwości patogenne wirusa są zmienne i pomimo tego, że wszystkie przeżuwacze są na niego podatne, choroba w postaci klinicznej objawia się tylko u owiec. Przebieg BT u owiec został po raz pierwszy opisany pod koniec dziewiętnastego wieku w południowej Afryce, gdzie prawdopodobnie występowała ona endemicznie u przeżuwaczy dzikich, od których została następnie przeniesiona na owce rasy merynos, które okazały się szczególnie podatne na patogenne działanie wirusa (6). U owiec objawy kliniczne choroby pojawiają się po 5-20 dniach od zakażenia. Typowymi objawami klinicznymi BT są: apatia, wzrost wewnętrznej ciepłoty ciała do 41-42°C, duszności, brak łaknienia i szybka utrata masy ciała oraz przekrwienie i owrzodzenie śluzówki jamy ustnej, owrzodzenia wokół otworów nosowych i śluzowa wydzielina zmieszana z krwią, obrzęk głowy, w szczególności warg i języka, a także niekiedy sinica warg i języka (stąd nazwa choroby). Ponadto występuje kulawizna z powodu zapalenia mięśni kończyn, koronki i tworzywa racic oraz sztywny chód i niejednokrotnie zrzucie puszek racicowej. U ciężarnych samic często dochodzi do poronień. Po 8-10 dniach od zakażenia śmiertelność

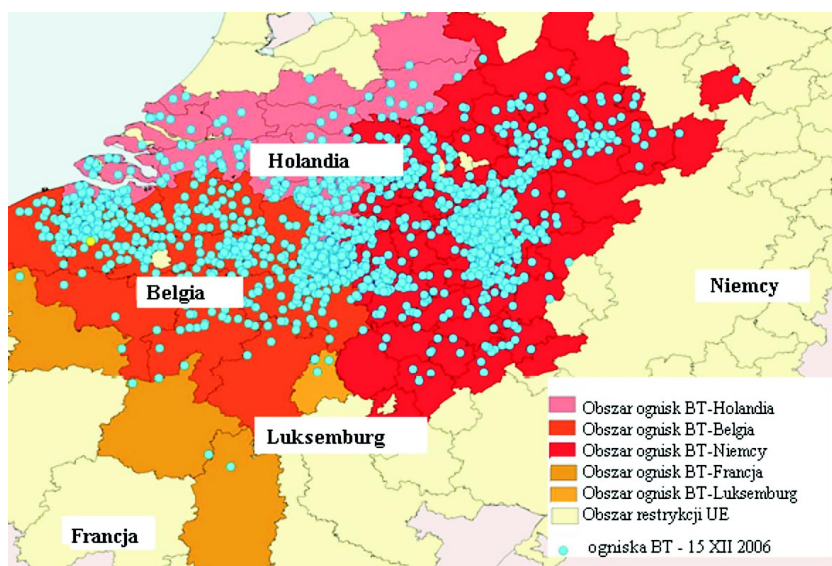
u owiec na kontynencie afrykańskim może osiągać 30%, natomiast w innych regionach świata jest znacznie niższa. Jednakże choroba powoduje duże straty w hodowli, zarówno w wyniku spowolnienia wzrostu masy ciała, jak i utraty wełny oraz niepłodności (4).

Pierwsze informacje o stwierdzeniu choroby niebieskiego języka w południowej części kontynentu afrykańskiego pojawiły się w 1870 r. (6). W 1943 r. ogniska BT wykryto na Cyprze oraz w Izraelu, Stanach Zjednoczonych, Portugalii, Hiszpanii, Pakistanie i Indiach. Pierwsza, duża epizootia BT w Europie miała miejsce w 1956 r. w Portugalii i Hiszpanii. Przez następne 30 lat aktywność wirusa BT oraz występowanie choroby stwierdzano na kontynentach: amerykańskim, afrykańskim, azjatyckim oraz w Australii, w strefie tropikalnej i subtropikalnej, w przybliżeniu między 40° szerokości północnej a 35° szerokości południowej, gdzie warunki klimatyczne i środowiskowe są odpowiednie dla cyklu życiowego wektora (10). W efekcie Międzynarodowy Urząd ds. Epizootii (OIE) w Paryżu umieścił BT na liście chorób, które stanowią główną barierę w handlu międzynarodowym zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia (2). W 1989 r. epizootia choroby niebieskiego języka spowodowana przez 5 różnych serotypów wirusa BT (BTV-1, 2, 4, 9 i 16) rozszerzyła się w kierunku północnym i przekroczyła 40° szerokości północnej, obejmując obszar basenu Morza Śródziemnego i Półwyspu Bałkańskiego. Na rozprzestrzenianie się BT miało wpływ kilka czynników, między innymi zmiany klimatyczne prowadzące do powiększenia terytorium występowania głównego wektora *Culicoides imicola* oraz udział nowych wektorów (*C. obsoletus* i *C. pulicaris*) w szerzeniu się wirusa na tych obszarach (3).

Nieoczekiwanie dla epidemiologów weterynaryjnych, w sierpniu 2006 r., po raz pierwszy w historii, zasięg występowania BT przekroczył 44° szerokości północnej. Pierwsze ognisko choroby stwierdzono 18 sierpnia w południowej części Holandii na fermie bydła w prowincji Limberg, blisko granicy z Belgią i Niemcami. W następnych dniach ogniska BT odnotowano w Belgii, Niemczech i we Francji. W okresie od 18 sierpnia do 15 grudnia 2006 r. ogółem stwierdzono 2036 ognisk choroby, przy czym największe nasilenie epizootii (830 ognisk) miało miejsce między 4 października i 25 listopada ([www.efsa.europa.eu/en/in\\_focus/bluetongue/outbreak\\_overview.htm](http://www.efsa.europa.eu/en/in_focus/bluetongue/outbreak_overview.htm)). Na dzień 15 grudnia liczba ognisk BT wynosiła w: Niemczech – 868, Belgii – 704, Holandii – 456, Francji – 5 i w Luksembur-

gu – 3 (ryc. 1). W Laboratorium Referencyjnym UE w Pirbright (Anglia) wykazano, że chorobę wywołał wirus BT serotyp 8, który wcześniej nie występował nigdzie, poza regionem Afryki subsaharyjskiej ([www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA8.htm](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA8.htm)).

Celem niniejszych badań była ocena występowania przeciwciał przeciwko wirusowi choroby niebieskiego języka w surowicach zwierząt podatnych sprawdzonych do Polski z krajów UE (Niemcy, Holandia, Francja i Belgia) po 15 czerwca 2006 r.



Ryc. 1. Choroba niebieskiego języka – sytuacja epizootyczna w krajach UE w dniu 15.12.2006 r. (zgodnie z Department for Environment Food and Rural Affairs, United Kingdom)

Tab. 1. Wyniki badań serologicznych bydła i owiec w kierunku choroby niebieskiego języka wykonanych w okresie od 1 października do 31 grudnia 2006 r.

Województwo	Kraj pochodzenia zwierząt	Liczba surowic	
		badanych	dotatnich (%)
Dolnośląskie	Niemcy	152	0
Kujawsko-pomorskie	Niemcy, Holandia, Francja	171	0
Lubelskie	Niemcy	518	0
Lubuskie	Niemcy, Francja, Holandia	767	0
Łódzkie	Niemcy, Holandia	58	0
Małopolskie	Niemcy	35	0
Mazowieckie	Niemcy, Francja, Holandia	247	0
Opolskie	Niemcy	10	0
Podkarpackie	Niemcy	61	0
Podlaskie	Niemcy, Holandia, Francja	1419	0
Pomorskie	Niemcy, Holandia, Francja	186	0
Śląskie	Niemcy	95	0
Świętokrzyskie	Niemcy, Francja	58	0
Warmińsko-mazurskie	Holandia, Niemcy, Francja	423	0
Wielkopolskie	Niemcy, Holandia, Francja	469	0
Zachodniopomorskie	Holandia, Francja, Niemcy, Belgia	1088	3 (0,27%)

## Materiał i metody

**Surowice.** W czwartym kwartale 2006 r. przebadano ogółem 5757 próbek surowic od bydła i owiec sprowadzonych do Polski z krajów UE, w których BT stwierdzono po 18 sierpnia 2006 r. Próbki przesłały powiatowe inspektoryaty weterynarii ze wszystkich 16 województw (tab. 1).

**Wykonanie.** Badania serologiczne prowadzono testem c-ELISA, a wyniki dodatkowo potwierdzano metodą immunodiffuzji w żelu agarozowym (AGID). Do odczynu ELISA stosowano Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA, firmy VMRD, Pulman-Albion, USA, nr kat. 287-2. Badanie wykonano zgodnie z zaleceniem producenta zestawu. Czas wykonania badania wynosi około 2 godzin.

**Schemat badania.** Do odpowiednich zagłębień płytki dodawano po 25 µl surowic kontrolnych i badanych, i inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej (21-25°C). Po zakończeniu inkubacji zawartość płytki usuwano. Do wszystkich zagłębień dodawano po 25 µl koniugatu i inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej. Z zagłębień płytki usuwano koniugat. Następnie do wszystkich zagłębień dodawano po około 300 µl buforu do przemywania i po 10-15 sekundach usuwano. Przemycie powtarzano 2-krotnie. Po przemyciu płytki do wszystkich zagłębień dodawano po 50 µl substratu i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej (unikano ekspozycji na promieniowanie słoneczne). W celu zahamowania reakcji barwnej do wszystkich zagłębień dodawano po 50 µl roztworu hamującego i delikatnie wstrząsano płytką. Wynik odczytywano natychmiast przy długości fali 620 nm. Surowicę uznaje się za dodatnią, jeśli jej wartość OD wynosi  $\leq 50\%$  średniej wartości OD surowicy kontrolnej ujemnej.

Do odczynu immunodiffuzji w żelu agarozowym używano Bluetongue Virus Antibody Test Kit, firmy VMRD, Pulman-Albion, USA, nr kat. 288-100. W skład tego zestawu wchodzi antygen wirusa BT oraz surowica referencyjna dodatnia. Reakcja immunodiffuzji przebiegała w 0,9% żelu agarozowym, w czasie 48 godzin. Wystąpienie i kształt linii precypitacyjnych powstałych w wyniku reakcji antygenu z surowicami kontrolnymi i badanymi oceniano po 24 i 48 godzinach inkubacji w temp. 22-25°C, w warunkach podwyższonej wilgotności.

## Wyniki i omówienie

Choroby niebieskiego języka nigdy dotychczas nie odnotowano na terenie Polski. Rozpoczęte w październiku 2006 r. w laboratorium Zakładu Pruszczycy PIWet-PIB serologiczne badania przeglądowe w kierunku przeciwciał swoistych dla wirusa BT mają na celu wykrycie seroreagentów wśród zwierząt importowanych z obszarów zagrożonych chorobą. Badania te wydają się szczególnie ważne w aspekcie rozwoju sytuacji epizootycznej w Niemczech, gdzie odnotowuje się największy wzrost zachorowań, także w kierunku landów wschodnich (ryc. 1). Do chwili obecnej przeglądem objęto zwierzęta sprowadzone do Polski po 15 czerwca z krajów UE, w których odnotowano chorobę niebieskiego języka (Niemcy, Holandia, Francja i Belgia). Badania prowadzono zalecanym przez OIE (2) testem c-ELISA, charakteryzującym się wysoką czułością i specyficznością (1, 8). W metodzie tej nie

stwierdza się reakcji krzyżowych z wirusem krwotocznej choroby zwierzęcy płowej (EHD), które występują w odczynie immunodiffuzji w żelu agarozowym (7). Z ogólnej liczby przebadanych 5757 surowic zdecydowana większość (ok. 99%) pochodziła od bydła, przy czym ponad połowa próbek z tej puli surowic została pobrana od bydła sprowadzonego do Polski z Niemiec (tab. 1). Najwięcej próbek dostarczono z województw podlaskiego i zachodniopomorskiego (ponad 40% ogólnej liczby surowic). W badaniu metodami c-ELISA i AGID tylko w 3 (0,27%) próbkach z województwa zachodniopomorskiego stwierdzono przeciwciała swoiste dla wirusa BT. Stanowi to ok. 0,05% ogólnej liczby surowic z terenu całego kraju. Zwierzęta serologicznie dodatnie pochodziły z gospodarstwa w powiecie świdwińskim. Bydło to sprowadzono do Polski w dniu 7 sierpnia 2006 r., ze świadectwem zdrowia wystawionym przez belgijskie służby weterynaryjne, a ich miejscem pochodzenia była Holandia. Od seroreagentów ponownie pobrano krew pełną w celu potwierdzenia wyniku serologicznego oraz krew na antykoagulant (EDTA) do badań wirusologicznych metodą RT-PCR.

W surowicy potwierdzono obecność przeciwciał swoistych dla BTV, natomiast w próbkach krwi nie wykryto wirusa pryszczycy. Następnie próbki przesłano do Zakładu Wirusologii PIWet-PIB w Puławach – Krajowego Laboratorium Referencyjnego dla BT, w którym potwierdzono pierwszy wynik. W celu ostatecznego potwierdzenia wyników badań, materiały biologiczne natychmiast przesłano do Laboratorium Referencyjnego UE w Pirbright (Anglia). W dniu 02.11.2006 r. otrzymano wynik, który w pełni potwierdził dotychczasowe rozpoznanie. Jak przypuszczano, w próbkach surowic badanych w odczynie seroneutralizacji stwierdzono przeciwciała swoiste dla BTV serotyp 8. Na podstawie uzyskanych wyników laboratoryjnych nie można jednak stwierdzić występowania choroby niebieskiego języka w Polsce, bowiem wykryto jedynie przeciwciała swoiste dla BTV, a nie wykryto materiału genetycznego wirusa. Ponadto, seroreagenty te zostały sprowadzone do naszego kraju z Holandii i nie stwierdzono reakcji serologicznych u pozostałego bydła w stadzie. Dalsze badania przeglądowe przeprowadzone w gospodarstwie nie wykazały żadnych objawów klinicznych BT w stadzie 225 sztuk przetrzymywanego tam bydła. Jednakże, zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi zwalczania choroby niebieskiego języka (Dyrektywa Rady 2000/75/EWG z dnia 20 listopada 2000 r., Decyzja Komisji 2005/393/WE z dnia 23 maja 2005 r. oraz Decyzja Komisji 2006/577/WE z dnia 22 sierpnia 2006 r. a także ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych – Dz.U. Nr 69, poz. 625, rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 maja 2004 r. w sprawie zwalczania choroby niebieskiego języka – Dz.U. Nr 125, poz. 1315) gospodarstwo objęte zosta-

ło prewencyjnym nadzorem przez Powiatowego Lekarza Weterynarii i zablokowane – wydano zakaz wwozu i wywozu wszelkich zwierząt do i z gospodarstwa. Ponadto Główny Lekarz Weterynarii polecił zbadanie wszystkich sztuk bydła znajdujących się w gospodarstwie, a także zalecił hodowcom przeżuwać wystrzegania się zakupu zwierząt z niewiadomego źródła, bezzwłoczne zgłaszanie wszelkich przypadków podejrzenia choroby oraz zwalczanie owadów w pomieszczeniach, w których przebywają zwierzęta.

Przypuszcza się, że na wystąpienie choroby niebieskiego języka w Holandii, Belgii, Francji, Niemczech i Luksemburgu, zasadniczy wpływ miały zmiany klimatyczne (upalne lato i łagodna jesień oraz zima) w tej części Europy. Przyczyniło się to do zwiększenia zasięgu występowania owadów z rodziny *Culicoides*, które w odpowiedniej temperaturze i wilgotności zachowują aktywność w środowisku. Ponadto, istnieją doniesienia, że niektóre rodzime gatunki kuczmanów nabyły zdolność do przenoszenia wirusa. W Laboratorium Referencyjnym OIE dla choroby niebieskiego języka w Teramo we Włoszech wykazano, że owadami, które przejęły funkcję wektorów w czasie epizootii choroby w Holandii i Belgii są rodzime *Culicoides dewulfi* ([www.oie.int/eng/press/en\\_061023.htm](http://www.oie.int/eng/press/en_061023.htm)). Jest to bardzo istotne odkrycie, ponieważ dowodzi, że ogniska BT nie muszą być związane wyłącznie z wektorami pochodzenia afrykańskiego. Stwarza to niebezpieczeństwo epizootii we wszystkich regionach Europy, które dotychczas uważane były za bezpieczne. Ponieważ wektor przenoszący wirusa BT może występować do 53° szerokości północnej, co odpowiada linii Gorzów–Toruń–Białystok, to oznacza, że choroba może rozprzestrzenić się również na terytorium naszego kraju. Ewentualne wystąpienie choroby może przyczynić się do ogromnych strat ekonomicznych, wynikających nie tylko z bezpośrednich kosztów zwalczania choroby, ale przede wszystkim związanych z utratą rynków zbytu, z powodu embarga nałożonego na zwierzęta i produkty zwierzęcego pochodzenia (5).

Zmiany klimatyczne oraz globalizacja i intensyfikacja międzynarodowego handlu zwierzętami, a także rozwój wymiany towarowej i komunikacji osobowej sprzyjają wzrostowi zagrożenia chorobą niebieskiego języka także w Polsce. Obserwowane w listopadzie 2006 r. szerzenie się epizootii BT na terenie Niemiec obliguje nasze służby weterynaryjne do szczególnej czujności, a laboratoria diagnostyczne do gotowości do szybkiego i precyzyjnego rozpoznawania choroby. Jak wskazują wyniki dotychczasowych badań przeglądowych wykonanych w laboratorium Zakładu Pryszczycy PIWet-PIB, kontynuacja badań zwierząt sprowadzonych z krajów, w których stwierdza się chorobę, jest konieczna dla oceny zagrożenia Polski chorobą niebieskiego języka.

### Piśmiennictwo

1. Afshar A., Thomas F. C., Wright P. F., Shapiro J. L., Shettigara P. T., Anderson J.: Comparison of competitive and indirect enzyme linked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25, 1705-1710.
2. Anon.: O.I.E.: Bluetongue, [w:] Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris 2004, 195-210.
3. Baylis M., Mellor P. S., Wittmann E. J., Rogers D. J.: Prediction of areas around the Mediterranean at risk of bluetongue by modelling the distribution of its vector using satellite imaging. *Vet. Rec.* 2001, 149, 639-643.
4. Frymus T.: Choroba niebieskiego języka – nowe zagrożenie dla Polski. *Mag. Wet.* 2006, 15, 34-35.
5. Hoar B. R., Carpenter T. E., Singer R. S., Gardner I. A.: Regional risk of exporting cattle seropositive for bluetongue virus from the United States. *Am. J. Vet. Res.* 2003, 64, 520-529.
6. Howell P. G., Verwoerd D. W.: Bluetongue virus, [w:] Gard S., Hallaver C., Meyer F. K. (eds.): *Virology Monographs*. Springer Verlag, New York 1971, 9, 35-74.
7. Osburn B. I.: The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1994, 17, 189-196.
8. Paton J. F., Work T. M., Jessup D. A., Hietala S. K., Oliver M. N., MacLellan N. J.: Serologic detection of bluetongue virus infection of black-tailed deer: comparison of serum neutralization, agar gel immunodiffusion, and competitive ELISA assays. *J. Wild Dis.* 1994, 30, 99-102.
9. Tabachnick W. J.: *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* 2003, 40, 145-150.
10. Walton T. E.: The history of bluetongue and a current global overview. *Vet. Ital.* 2003, 40, 31-38.

Adres autora: doc. dr hab. Wiesław Niedbalski, ul. Zielona 48/4, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: [wieslaw@piwzp.invar.net.pl](mailto:wieslaw@piwzp.invar.net.pl)