

Bakteriologia i epizootiologia brucelozy świń

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Truszczyński M., Pejsak Z.

Bacteriology and epizootiology of porcine brucellosis

Summary

The paper presents the most recent data and opinions concerning *Brucella* (*B.*) *suis* and porcine brucellosis. Included are up-to-date results concerning the classification of the genus *Brucella* into 9 species, among them *B. suis*. Five biovars of this species are mentioned. Biovars 1, 2 and 3 (particularly 1 and 3) are highly pathogenic for swine and for humans. The source of infection for swine are, besides swine, wild boar and hare. The global distribution of swine brucellosis is presented with particular reference to the European Union member countries. Since at present with the closed system swine production in the EU *B. suis* infection is not diagnosed, the main goal of veterinary services is the complex action against the introduction of *B. suis* into the national swine herds. The main risk factors are: importing of infected pigs from abroad and transmission of *B. suis* from the wild boar or the hare to the domestic swine. In order to exclude these possibilities, besides available directives and instructions, diagnostic laboratory investigations are of crucial importance. In the paper direct and indirect tests for the identification of *B. suis* infection are described and assessed with respect to their diagnostic value. Concerning direct diagnostic tests, besides traditional assays based on phenotypic properties of the microorganism, several genotypic methods and among them particularly the polymerase chain reaction (PCR) are characterized. Following this, indirect diagnostic methods, being serological tests used in the diagnosis of porcine brucellosis, are discussed. Their diagnostic value is evaluated, including the possibility of false positive and false negative reactions. The Brucellin allergic skin test, as a confirmatory test of the serological results, is presented. In conclusion it is stated that the present epizootic situation concerning porcine brucellosis in the EU member countries is satisfactory. In connection with this the importance of prophylactic activity of the veterinary services against transmission of *B. suis* infection to domestic pigs of this region is stressed.

Keywords: porcine brucellosis, diagnostic tests

Ostatni opublikowany w piśmiennictwie polskojęzycznym artykuł przeglądowy na temat brucelozy świń pochodzi z 2003 r. (17). Omówiono w nim, zgodnie z ówczesnym stanem wiedzy, właściwości czynnika etiologicznego, epidemiologię, patogenezę, objawy kliniczne, zmiany anatomopatologiczne, diagnostykę, zapobieganie i zwalczanie oraz brucelozę świń jako zoonozę. W ciągu 7 minionych od tego czasu lat dokonano w tej tematyce znaczący postęp, zwłaszcza w dziedzinie laboratoryjnej diagnostyki choroby. Określone zostały również ściślej wytyczne dotyczące profilaktyki brucelozy świń oraz jej zoonotycznego charakteru. Uzasadnia to uzupełnienie danych zawartych w cytowanym wyżej artykule. Przyczyną obecnej publikacji jest też ogłoszone w 2009 r. obszerne monograficzne opracowanie pt.: „Brucelozę świń (*Brucella suis*)”, przygotowane przez specjalistyczny zespół (panel) na prośbę Dyrektoriatu Generalnego (DG) Zdrowie i Ochrona Konsumenta Komisji Europejskiej (2). Zawarte tam informacje stanowią, poza rozdziałem

„Brucelozę świń” w podręczniku Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt OIE z 2008 r. (1), zbiór najnowszych, aktualnych danych, które szczególnie wyczerpująco uwzględniają potrzeby państwowych służb weterynaryjnych i współpracujących laboratoriów diagnostycznych, tak w ramach kraju, jak też w skali międzynarodowej (3).

Klasyfikacja rodzaju *Brucella*

Zgodnie z powyższym, *Brucella* (*B.*) *suis* stanowi 1 z 9 gatunków rodzaju *Brucella* (<http://www.bacterio.cict.fr/b/brucella.html>), ustanowionych na podstawie ich właściwości fenotypowych, a zwłaszcza preferencji do występowania szczególnie często u określonego gospodarza. Są to: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*. Dane dotyczące dwóch ostatnio wymienionych gatunków przedstawia następująca publikacja (8). Zasada podziału w oparciu o różnice fenotypowe, która obowiązywała również poprzednio, została utrzymana

na, mimo coraz częściej obecnie stosowanych w taksonomii bakterii metod genetyki molekularnej. Utrzymanie jej uzasadniały różne właściwości chorobotwórcze tradycyjnie określonych gatunków, w tym fakt, że w badaniu hybrydyzacji DNA-DNA reprezentują one bardzo zbliżone genomy, czyli, w oparciu o tę metodę, jeden gatunek. Dodać jednak należy, że preferencja do określonego gospodarza wymienionych gatunków *Brucella* nie stanowi wyłączości, gdyż np. u świń stwierdzane są niekiedy też infekcje wywołane przez *B. abortus*, to jest gatunek o preferencji do bydła lub *B. melitensis* o głównym powinowactwie do owiec i kóz (2).

W ramach gatunku *B. suis* wyodrębniono 5 biowarów, spośród których zakażenie u świni wywołują 1, 2 i 3. Szczególnie chorobotwórcze są biowary 1 i 3. Biowar 2 różni się od 1 i 3 też w geograficznym rozprzestrzenieniu. Biowary 1 i 3 są wysoce chorobotwórcze również dla człowieka, przeciwnie niż biowar 2, który bardzo rzadko izolowano z tego źródła. Biowar 4 *B. suis* zakaża renifery caribou, łosie, bizona, północne lisy i wilki, a biowar 5 dzikie gryzonie na obszarach Rosji (1, 2).

Źródłem infekcji *B. suis*, oprócz świni, jest dla świń i człowieka najczęściej dzik, a rzadziej zając, od którego często izolowany jest biowar 2 (5, 6, 16). Niektóre publikacje dotyczą sporadycznych izolacji *B. suis* od innych gatunków zwierząt (2). Dane te nie są w piśmiennictwie szerzej udokumentowane. Nie istnieją bowiem, w tym w krajach Unii Europejskiej, obligatoryjne wymagania monitorowania i nadzoru (surveillance) infekcji (18) wywołanych przez *B. suis* u świń domowych, innych gatunków zwierząt domowych i u zwierząt nieudomowionych. Z podsumowującej oceny cytowanego wyżej piśmiennictwa wynika, że brucelozą świń oraz infekcje wywołane przez *B. suis* u innych gatunków zwierząt i u człowieka są stwierdzane rzadko.

Występowanie na świecie

Zgodnie z najnowszymi danymi (<http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>, 2), nigdy nie rozpoznano brucelozy świń w Finlandii, Szwecji, Norwegii i Wielkiej Brytanii. Sporadycznie u świń domowych występowała w Niemczech, Francji, Danii, Austrii, Portugalii i Hiszpanii (12), a ostatnio w Rumunii, Republice Czeskiej, Chorwacji, Serbii i Czarnogórze (2). Najczęściej izolowanym w Europie okazał się biowar 2.

Dane dotyczące występowania bruceli u świń w krajach członkowskich UE kolekcjonuje Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority, EFSA). Są one publikowane w wydawanym przez EFSA Rocznym Sprawozdaniu dotyczącym Zoonoz (Annual Zoonoses Report). Wobec jednak, jak wspomniano, braku ustanowionego prawem obowiązku krajów członkowskich UE do monitorowania ich populacji świń w kierunku *B. suis* i innych gatunków *Brucella*, obecne dane mogą być niekompletne i nie-

wystarczające, zgodnie z wymaganiami obowiązującymi przy międzynarodowym obrocie świniami (2). Skłania to do zawierania dwustronnych umów między eksporterem a importerem świń lub ich nasienia.

Poza Europą *B. suis* izolowano w ciągu ostatniej dekady od świń lub ludzi w krajach Ameryki Środkowej i Ameryki Południowej, w tym wysoce chorobotwórczy biowar 1. Wymieniony gatunek stwierdzano również w szeregu krajów Azji, zwłaszcza w Chinach oraz Japonii, jak też w Australii (Queensland) oraz sporadycznie, bez podania biowaru, w krajach Afryki.

W nawiązaniu do przedstawionej sytuacji epizootologicznej, dotyczącej występowania brucelozy świń na świecie – w Polsce ostatni przypadek choroby stwierdzono w 2000 r., a sporadycznie kilkakrotnie wcześniej (17).

Zatem zadania służby weterynaryjnej krajów członkowskich UE w odniesieniu do brucelozy świń sprowadzają się przede wszystkim do przeciwdziałania transmisji infekcji do rodzimych stad świń w następstwie obrotu międzynarodowego, przy okazji importu świń lub nasienia knurów z innych krajów.

Bezpośrednie metody diagnostyki laboratoryjnej

Badania bakteriologiczne, obejmujące izolację *B. suis* i innych ewentualnie występujących u świń gatunków bruceli oraz ich identyfikację na podstawie właściwości fenotypowych, stanowią najbardziej wiarygodną podstawę bezpośrednią w rozpoznawaniu brucelozy świń (1). Z uwagi na pracochłonność są one jednak stopniowo zastępowane technikami genetyki molekularnej, również stanowiącymi pewne metody bezpośrednio wykazujące lub wykluczające brucele w badanym materiale. Do identyfikacji bruceli, w tym *B. suis*, dostępne są obecnie testy z zastosowaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) i swoiste startery.

Oprócz PCR zastosowanie do identyfikacji bruceli znalazły następujące metody: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), zmienna liczba tandemowych powtórzeń (Variable Number of Tandem Repeats – VNTR) (14), hybrydyzacja northern (Northern Blotting), sekwencjonowanie cDNA (Sequencing of Complementary DNA – cDNA), seryjna analiza ekspresji genów (Serial Analysis of Gene Expression – SA GE), mikromacierze cDNA i oligonukleotydo- we wykorzystywane do diagnostyki drobnoustrojów (Microbial Diagnostic Microarrays – MDM) (7). Aktualnie określony został pełny genom *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, w tym ostatnim przypadku biowaru 1 i 2 (2, 4).

Mimo wysokiego stopnia homologii DNA gatunków rodzaju *Brucella* szereg z wymienionych metod umożliwia do pewnego stopnia różnicowanie między tradycyjnie ustanowionymi gatunkami *Brucella* i niektórymi ich biowarami (3). Szczególną wartość ma w tym względzie nowa metoda multiplex PCR (15). Opisano też możliwości odróżniania gatunków *Bru-*

cella, w których wykorzystuje się pojedynczy polimorfizm nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) lub PCR w czasie rzeczywistym (PT-PCR) (9, 13). Są to szybkie i wiarygodne testy, lecz mogą być wykonywane jedynie przez odpowiednio wykwalifikowany personel, w nowoczesnie wyposażonych laboratoriach.

Pośrednie metody diagnostyki laboratoryjnej

Najszerze zastosowanie praktyczne w wykrywaniu u świń infekcji wywołanej przez *B. suis* mają, zaliczane do metod pośrednich, metody serologiczne, chociaż bardziej wiarygodna jest bezpośrednia identyfikacja *B. suis*, o której była mowa uprzednio. Fałszywie dodatnie wyniki badań serologicznych związane są z możliwością występowania w surowicy pochodnych odporności wrodzonej (innate immunity), tzw. przeciwciał fizjologicznych, nie będących efektem działania antygenów *B. suis*, lecz swoście się z nimi łączących. Dotyczy to przeciwciał izotypu IgM. Oprócz tego przyczyną fałszywie dodatnich odczynów serologicznych jest bardzo podobna swoistość antygenowa lipopolisacharydu (LPS) *B. suis*, głównego czynnika w wyzwalaniu przeciwciał o znaczeniu diagnostycznym, z lipopolisacharydowymi antygenami *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Francisella tularensis*, *Salmonella Urbana* oraz niektórych innych bakterii Gram-ujemnych. Nieswoistością tą charakteryzuje się w szczególności znaczącym stopniu powszechnie do niedawna używany test aglutynacji probówkowej (2, 10, 11).

W diagnostyce serologicznej brucelozy świń odczynem wiązania dopełniacza (OWD) występuje inna niedogodność niż wyżej wymienione odczyny krzyżowe. Polega ona na obniżaniu czułości tej metody i w efekcie na wyniku fałszywie ujemnym w związku z właściwością dopełniacza surowicy świni, zwiększającą aktywność prokomplementarną dopełniacza świnki morskiej. W konsekwencji istnieje niebezpieczeństwo nie wykrycia świń, które faktycznie zakażone są *B. suis* (2).

W wyniku możliwości występowania fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników badań serologicznych zastrzega się (1), że nie mogą one stanowić wystarczającej podstawy ani do potwierdzenia, ani do wykluczenia infekcji *B. suis* u indywidualnego zwierzęcia. Odpowiednie rozpoznanie przy ich użyciu może dopiero być sformułowane po ocenie wysokości mian swoistych przeciwciał wszystkich osobników danego stada, w wyniku co najmniej jego dwóch kolejnych badań w odstępie kilku tygodni. Dodatkowo rekomenduje się użycie dwóch różnych serologicznych testów u tego samego zwierzęcia, które określono jako „dodatnie”, jeżeli co najmniej jedno badanie dało wynik pozytywny, a drugie negatywny. Finalna klasyfikacja zwierzęcia jako pozytywnego wymaga, by co najmniej dwukrotne badanie dało wynik dodatni (1, 2).

Czułość i swoistość pośredniej próby immunoenzymatycznej (indirect ELISA – iELISA) i kompeten-

cyjnej próby immunoenzymatycznej (competitive ELISA – cELISA), jak też próby fluorescencyjnej polaryzacji (Fluorescencje Polarisation Assay – FPA) są zbliżone. Obecnie dwie pierwsze zalecane są (1) do stosowania w stadach podejrzanych o zakażenie lub w celu jego wykluczenia, zwłaszcza w międzynarodowym obrocie świniami lub w związku z importem nasienia. Natomiast FPA i testy ze zbuforowanym antygenem *Brucella* (do których zalicza się odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej – OKAP), jak też odczyn z różem bengalskim („rose bengal test” – RBT) określane są jako testy alternatywne do badań przeglądowych lub przy remoncie stada (1, 2), w grupie świń, które mają być do niego wprowadzone.

RBT i OWD do użytku u świń zostały wystandaryzowane wobec Międzynarodowego Standardu OIE (OIEISS). Dotychczas nie nastąpiło to w odniesieniu do iELISA i cELISA oraz FPA dla surowic świń z powodu nie ukończenia prac zmierzających do uzyskania surowicy standardowej spełniającej kryteria walidacji zalecane przez Manual OIE (1). Krajowe laboratoria referencyjne do spraw brucelozy państw członkowskich OIE standard ten otrzymują w celu międzynarodowej harmonizacji u siebie wykonywanych badań serologicznych. Niektóre kraje postulują, by świnię sprowadzaną z zagranicy miały w odczynach zlepnym miana anty-*B. suis* < 30 jednostek międzynarodowych w 1 ml surowicy, a w OWD < 20 międzynarodowych jednostek (International CF Test Units – ICFTU).

Szczególne znaczenie w profilaktyce brucelozy świń ma wybór knurów do produkcji nasienia wolnych od infekcji wywołanej przez *B. suis* lub inne gatunki *Brucella*, w akredytowanych do tego celu ośrodkach oraz obowiązkowe, rutynowe, kolejne badania w czasie ich pobytu w tych stacjach wykluczające taką infekcję. W tym celu stosowane są testy serologiczne, zwłaszcza pośredni test ELISA. Ze względu na wcześniej omówione reakcje krzyżowe wynik dodatni musi być jednak potwierdzony innymi testami.

Skórna próba alergiczna

Najczęściej stosowaną do potwierdzania wyników badań serologicznych metodą jest skórna próba alergiczna z bruceliną jako alergenem. Jest nim wyciąg z *B. melitensis* szczepu B115, nie zawierający dającego odczyny krzyżowe LPS. Próba ta stosowana jest głównie w diagnostyce brucelozy bydła. Okazała się jednak również przydatna w przypadku brucelozy świń do potwierdzenia wyniku dodatniego badania serologicznego.

Dodać należy, że skórna próba alergiczna wykrywa dodatkowo jedynie infekcję wywołaną przez *Ochrobacterium intermedium*. Jednakże gatunek ten bardzo rzadko występuje w organizmie świni, co nie przeszkadza w uznaniu testu skórniego za wysoce specyficzny wyłącznie dla gatunków *Brucella*. Oprócz tego w przypadku alergicznego testu skórniego chodzi o odporność

komórkową, a nie o krzyżowo reagujące przeciwciała surowicy w testach serologicznych, stanowiące element odporności humoralnej. Cechy te predysponują test skórny jako rozstrzygający, czy wynik dodatni badania serologicznego jest efektem zakażenia przez *B. suis*, czy też został wywołany przez inny gatunek bakterii, o podobnym pod względem swoistości antygenie lipopolisacharydowym.

Korzystna sytuacja epizootologiczna w UE

Z dostępnych danych obejmujących okres do końca 2009 r. wynika, że w żadnym znajdującym się w pomieszczeniach zamkniętych stadzie świń krajów członkowskich UE nie występuje aktualnie infekcja wywołana przez *B. suis*. Świadczy to, że udaje się skutecznie zapobiegać transmisji tej choroby, mimo jej występowania na innych obszarach kuli ziemskiej, jak też zagrożeń ze strony rodzimego rezerwuaru *B. suis* u dzików i zajęcy (5, 6, 16). Dowodzi to, że obowiązujące przepisy weterynaryjne, tak UE, jak też krajowe oraz ich implementacja w praktyce są wystarczające do utrzymania korzystnej w tym zakresie sytuacji epizootologicznej.

Piśmiennictwo

1. Anon.: OIE, World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals. 6th Edition. OIE, Paris, France 2008.
2. Anon.: Porcine brucellosis (*Brucella suis*). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. The EFSA Journal 2009, 1144, 1-112.
3. Bricker B. J.: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 2002, 90, 435-446.
4. Chain P. S. G., Comerci D. J., Tolmasky M. E., Larimer F. W., Malfiti S. A., Vergez L. M., Aguero F., Land M. L., Ugalde R. A., Garcia E.: Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect. Immun.* 2005, 73, 8353-8361.
5. Cvetnic Z., Tonic J., Spicic S., Lojkic M., Terzic S., Jemerski L., Humski A., Curic S., Mitak M., Habrun B., Brstilo M., Ocepek M., Krt B.: Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Veterinarni Medicina* 2004, 49, 115-122.
6. Dedek J.: Untersuchungen zur epizootologischen Bedeutung der Hasenbrucellose. Humboldt-Universität zu Berlin 1997.
7. Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M.: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 1999, 21, 10-14.
8. Foster G., Osterman B. S., Godfroid J., Jacques I., Cloeckaert A.: *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International J. System. Evolution. Microbiol.* 2007, 57, 2688-2693.
9. Fretin D., Whatmore A. M., Al Dahouk S., Neuybauer H., Garin-Bastuji B., Albert D., Van Hessche M., Menart M., Godfroid J., Walravens K., Watteau P.: *Brucella suis* identification and biovar typing by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 2008, 131, 376-385.
10. Garin Bastuji B., Hars J., Thiébaud M., Artois M.: Brucellosis of domestic pigs. Reemergence of *Brucella suis* biovar 2 in France. *Epidémiol. Santé Anim.* 2000, 38, 1-5.
11. Garin-Bastuji B., Zanella G., Cau C., Drapeau A., Antras V., Pozzi N.: Assessment of EIA, RBT and FPA for the diagnosis of *Brucella* infection in domestic pigs. Brucellosis 2008 International Research Conference (including the 61th Brucellosis Research Conference), London 10-13 September 2008.
12. Godfroid J., Käsböhrer A.: Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.* 2002, 90, 135-145.
13. Gopaul K. K., Koylass M. S., Smith C. J., Whatmore A. M.: Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiology* 2008, 8, 86.
14. Kattar M. M., Jaafar R. F., Araj G. F., Le Flèche P., Matar G. M., Abi Rached R., Khalife S., Vergnaud G.: Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 3935-3940.
15. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C. M., de Miguel M. J., Muñoz P. M., Blasco J. M., Jacques I., Grayon M., Cloeckaert A., Ferreira A. C., Cardoso R., Corrêa de Sá M. I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B.: Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species and of the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 3484-3487.
16. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J., Murat J.: Wild boars and hares as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 and in Poland. Brucellosis 2008 International Research Conference (including the 61th Brucellosis Research Conference), London 10-13 September 2008.
17. Szulowski K., Pilaszek J., Iwaniak W.: Brucelozja świń. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 283-286.
18. Truszczyński M., Wijaszka T.: Monitoring i nadzór oraz inne określenia stosowane w epidemiologii weterynaryjnej. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 487-488.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Truszczyński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: mtruszcz@piwet.pulawy.pl