

Możliwości rozpoznawania zakażeń *Leptospira* spp. u świń z użyciem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR)*)

BERNARD WASIŃSKI

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 12.05.2014

Zaakceptowano 09.06.2014

Wasiński B.

Usefulness of polymerase chain reaction (PCR) in diagnosis of infections caused by *Leptospira* spp. in swine

Summary

Leptospirosis can be an important problem and a cause of significant economic losses in swine herds. Because of a high susceptibility of leptospire to many factors, laboratory diagnosis of the disease (especially pathogen isolation and identification) is difficult and often based on serological methods. The aim of this study was to show the possible use of PCR for detection and partial identification of *Leptospira* spp. in clinical samples from swine. Four aborted fetuses and 2 serum samples from sows reared on a farm infected by the serovar Pomona and 4 fetuses from a farm infected by leptospire from the serogroup Sejroe were submitted for examination. Additionally, urine and serum samples from 8 aborting sows reared on 2 farms infected by the serogroup Sejroe were investigated. Serum samples were examined by the microagglutination test (MAT). Samples of urine and tissue samples from fetuses were examined by PCR with pairs of primers detecting DNA sequences specific to a) genus *Leptospira*, b) species *L. borgpetersenii*, c) two selected groups of serovars of the species *L. interrogans*, d) serogroup Sejroe. Serological findings showed in all examined sows the presence of titers to the serogroup Pomona or Sejroe, depending on the serogroup causing infection on a given farm. DNA of the genus *Leptospira* was detected in tissues of all fetuses from sows infected by the serovar Pomona, in 3 fetuses from the farm infected by the Sejroe serogroup, and in all urine samples. The presence of the DNA sequence specific for the group of *L. interrogans* serovars including the serovar Pomona was found in tissues of all 4 fetuses from dams presenting titers to the serogroup Pomona. DNA of the serogroup Sejroe was detected in 6 out of 8 urine samples examined, and DNA of the species *L. borgpetersenii* (including the serovar Sejroe) was found in 5 urine samples. No DNA of the species *L. borgpetersenii* or of the serogroup Sejroe was found in tissues of fetuses from the farm infected by the serogroup Sejroe. This study demonstrated the usefulness of PCR in confirming the presence of *Leptospira* spp. in clinical samples from swine. Furthermore, PCR confirmed the presence of the serovar Pomona in tissues of aborted fetuses and the presence of *L. borgpetersenii* and/or the Sejroe serogroup in samples of urine. A conclusive evaluation of the usefulness of PCR in identifying DNA of *L. borgpetersenii* and the serogroup Sejroe in tissue samples requires further investigations.

Keywords: *Leptospira*, leptospirosis, swine, PCR

Leptospiroza uznawana jest za jedną z najbardziej rozprzestrzenionych na świecie chorób odzwierzęcych (zoonoz) (1). W strefach klimatu umiarkowanego, gdzie występuje rzadziej, bywa ona ostatnio niedoceniana, skutkiem czego są między innymi trudności w prawidłowym i szybkim jej rozpoznawaniu. Jedną z przyczyn tych problemów jest też dość trudna diagnostyka laboratoryjna związana ze znaczną wrażliwością krętków z rodzaju *Leptospira* oraz dużym zróżnicowaniem ich struktury antygenowej i genomu.

W oparciu o budowę genomu rozróżnia się obecnie co najmniej dziesięć gatunków patogennych leptospir (1), które obejmują łącznie ponad dwieście serowarów. Dla potrzeb diagnostyki serologicznej serowary o zbliżonej budowie antygenowej łączy się w serogrupy. Znane są 23 serogrupy leptospir patogennych. Znajomość przynależności serowarowej (lub przynajmniej serogrupowej) leptospir wywołujących zakażenia w danej populacji ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego doboru stosowanych tam szczepionek. Jest też istotna przy monitorowaniu sytuacji epizootologicznej.

*) Badania wykonano w ramach finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki projektu N N308 621738.

Izolacja leptospir z materiału klinicznego wymaga stosowania złożonych podłoży, a wzrost omawianych mikroorganizmów trwa niejednokrotnie wiele tygodni. Wrażliwość leptospir na wiele antybiotyków znacznie ogranicza możliwości ochrony stosowanych podłoży przed wzrostem niespecyficznego flory bakteryjnej. Stąd mankamentem izolacji oprócz znacznej czaso- i pracochłonności jest niewielka czułość. Wyizolowane szczepy wymagają pracochłonnej identyfikacji wykonywanej przez nieliczne, wysoko wyspecjalizowane laboratoria referencyjne. Identyfikacja metodą klasyczną polega na serologicznej analizie ich antygenów (10). Ostatnio wykorzystuje się też techniki molekularne, jak analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) specyficznych fragmentów DNA leptospir (19, 25), analizę sekwencji 16S rDNA, analizę sekwencji wielu konserwatywnych genów (MLST – multilocus sequence typing) (2).

Niedoskonałości wielu innych proponowanych bezpośrednich metod diagnostycznych (obserwacja mikroskopowa, metody histochemiczne i immunohistochemiczne) sprawiają, że w rutynowym laboratoryjnym rozpoznaniu leptospirozy jako najszybsze, tanie i dość efektywne pod względem dostarczanych danych stosowane są powszechnie metody pośrednie. Wśród nich najczęściej wymienia się, zalecany przez WHO i OIE, odczyn aglutynacji mikroskopowej (OAM) czy stosowany rzadziej enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny (ELISA) (2).

Ostatnio szersze możliwości bezpośredniego rozpoznawania obecności leptospir w materiale klinicznym wydają się stwarzać techniki molekularne, w tym przede wszystkim łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) (4, 11, 12, 14, 15). W rutynowej diagnostyce leptospirozy technika ta pozostaje wciąż jeszcze mało rozpowszechniona. Osiągana czułość i specyficzność wydają się jednak czynić ją narzędziem diagnostycznym pozwalającym na szybkie potwierdzenie obecności patogenu w materiale klinicznym, co istotnie ułatwia m.in. rozpoznanie zakażeń przetrwałych. Może ona również być szczególnie pomocna w sytuacjach braku wykrywalnych metodami serologicznymi poziomów przeciwciał swoistych dla leptospir (8, 9).

Świnie są jednym z gatunków, u którego zakażenia powodowane przez patogenne krętki z rodzaju *Leptospira* przebiegają ostatnio wśród niespecyficznych, słabo wyrażonych objawów lub bezobjawowo. Nierzadko jedynym dostrzegalnym objawem leptospirozy bywają poronienia. Powodowane przez to straty ekonomiczne oraz zagrożenie przeniesieniem nierozpoznanych zakażeń ze zwierząt na ludzi stwarzają potrzebę stosowania szybkich, czułych metod diagnostycznych, umożliwiających wykrywanie lub potwierdzanie obecności leptospir w materiale klinicznym.

Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania PCR w rozpoznawaniu zakażeń świń patogennymi krętkami z rodzaju *Leptospira*.

Materiał i metody

Próbki do badań. Badany materiał kliniczny pochodził z trzech ferm trzody chlewnej, w których wystąpiły przypadki poronień u loch w okresie między 82. a 114. dniem ciąży. Wszystkie wspomniane fermy zlokalizowane były na terenie południowej Polski.

Ferma P. Poronienia wystąpiły u 2 loch w 93. i 97. dniu ciąży. U loch przed poronieniem nie stwierdzono żadnych objawów zwiastunowych. Nie zauważono też żadnych objawów mogących wskazywać na leptospirozę. Do badań przekazano 4 poronione płody (po dwa od każdej ze wspomnianych loch) i próbki surowic pobrane od każdej z loch 3 dni po poronieniu.

Ferma S 1. Poronienia wystąpiły u 10 loch między 85. a 105. dniem ciąży. Podobnie jak w fermie P, nie zaobserwowano tam objawów zwiastunowych ani innych objawów mogących wskazywać na leptospirozę. Przeprowadzone po wystąpieniu pierwszych poronień badania serologiczne wykazały u dwóch badanych zwierząt obecność przeciwciał reagujących z serowarem Sejroe należącym do gatunku *Leptospira borgpetersenii*. Jednocześnie u zwierząt tych stwierdzono wyniki ujemne w badaniach serologicznych w kierunku zakażeń wirusami PRRS i PCV2 i w kierunku chlamydiozy. Do badań przesłano 4 poronione płody pochodzące od jednej lochy oraz 4 próbki moczu i 4 próbki surowic od loch, które poroniły.

Ferma S 2. Poronienia w fermie wystąpiły u 4 loch w 82., 102., 104. i 107. dniu ciąży. Nie zaobserwowano objawów zwiastunowych ani innych objawów wskazujących na leptospirozę. Do badań dostarczono 4 próbki surowic i 4 próbki moczu od loch, które poroniły.

Badania serologiczne. Przesłane próbki surowic badano odczynem aglutynacji mikroskopowej. W badaniu przeglądowym surowicę rozcieńczoną w stosunku 1 : 50 i łączono taką samą objętością antygeny, tj. hodowli określonego serowaru leptospir (o gęstości 2×10^8 leptospir/ml). W ten sposób uzyskiwano rozcieńczenie surowicy badanej 1 : 100. Każdą surowicę badano z następującymi siedmioma serowarami: z gatunku *Leptospira interrogans* serowary Icterohaemorrhagiae, Pomona, Bratislava, Canicola; z gatunku *L. borgpetersenii* serowary Sejroe, Tarassovi oraz z gatunku *L. kirschneri* serowar Grippotyphosa. Szczepy wymienionych serowarów pochodzą z kolekcji Królewskiego Instytutu tropikalnego w Amsterdamie. Połączone z antygenem próbki surowic inkubowano w warunkach komory wilgotnej w temperaturze 28-30°C przez 2 godz., a następnie dokonywano odczytu wyników z użyciem mikroskopu z kondensorem ciemnego pola. Próbki surowic wykazujące wynik dodatni (tj. aglutynację co najmniej 50% leptospir danego serowaru) poddawano dalszym rozcieńczeniom (1 : 200, 1 : 400 itd.) w celu określenia w kolejnym badaniu miana przeciwciał reagujących z danym serowarem. Stwierdzenie występowania przeciwciał reagujących z danym serowarem w mianie 100 lub wyższym uznawano za wynik dodatni.

Przygotowanie próbek moczu. Z pojemników o pojemności 150 ml, w których przesyłano próbki, pobierano 35 ml moczu i wirowano go przez 10 min. z prędkością 10 000 obr./min. Następnie supernatant odlewano, a osad zawieszano w roztworze fizjologicznym o objętości 1 ml. Z uzyskanej zawiesiny 500 µl przeznaczano do ekstrakcji DNA

do badań metodą PCR, a pozostałą objętość 500 µl zamrażano i przechowywano w temp. -20°C.

Przygotowanie próbek z tkanek płodów. Przekazywane do diagnostyki poronione płody przesyłane były w stanie zamrożonym. Po rozmrożeniu pobierano z każdego płodu wycinki nerek, wątroby i płuc do ekstrakcji DNA.

Ekstrakcja DNA. Zawiesiny osadu moczu pozyskane wg opisanej wyżej metodyki oraz pobrane po rozmrożeniu wycinki nerek, wątroby i płuc każdego z poronionych płodów poddawane były ekstrakcji DNA z użyciem zestawu do ekstrakcji Genomic Mini (prod. A&A Biotechnology, Gdańsk). Ekstrakcję prowadzono zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji producenta.

Amplifikacja DNA. Do amplifikacji wykorzystano zestawy starterów umożliwiające wykrywanie DNA *Leptospira spp.* (startery Lepto F, Lepto R) oraz identyfikację przynależności DNA do gatunków *L. interrogans sensu stricto* (startery par Inter 1 i Inter 2), *L. borgpetersenii* (startery Borgpeter F, Borgpeter R) i do serogrupy Sejroe (startery Sej F i Sej R). Charakterystykę starterów przedstawiono w tab. 1.

Startery umożliwiające detekcję DNA leptospir oznaczone w tabeli jako Inter 1 pozwalały na wykrywanie DNA serowarów: Pomona, Bratislava, Icterohaemorrhagiae i niektórych szczepów serogrupy Grippotyphosa. Z kolei startery Inter 2 umożliwiały wykrywanie DNA serowaru Canicola, a startery Borgpeter – detekcję DNA serowarów Sejroe i Tarassovi.

Mieszanina reakcyjna w objętości 50 µl zawierała 5 µl 10 × stężonego buforu Tris-HCl (o pH 8,8 w temp 25°C) (prod. Fermentas, Litwa), 2 mM MgCl₂ (prod. Fermentas, Litwa), po 0,25 µM każdego ze starterów, po 0,3 mM każdego z dNTP (prod. Fermentas, Litwa) i 2 jednostki polimerazy Taq DNA Polymerase (prod. Fermentas, Litwa) oraz 10 µl zawiesiny matrycowego DNA.

Amplifikację prowadzono w termocyklerze T3 Thermocycler (prod. Biometra). Warunki amplifikacji: denaturacja wstępna 94°C – 5 min., 35 cykli denaturacji (94°C – 1 min.), przyłączanie starterów (temperatura odpowiednia dla danej pary starterów, zgodnie z danymi z tab. 1 – 1 min. 30 s) i wydłużanie starterów (72°C – 1 min.). Końcowe wydłużanie produktów amplifikacji prowadzono przez 7 min. w temperaturze 72°C.

Elektroforeza produktów PCR. Produkty PCR poddawa-

Tab. 1. Charakterystyka starterów stosowanych w badaniach metodą PCR w kierunku zakażeń świń wywoływanych przez *Leptospira spp.*

Nazwa	Sekwencje starterów (5'→3')	Temperatura przyłączania (°C)	Długość amplifikowanego fragmentu DNA (pz)	Piśmiennictwo
Lepto F R	GGCGGGCGGCTTTAAACATG TTCCCCCATTGAGCAAGATT	63	331	(15)
Inter 1 F R	CTACTGGGGCTTGTATCAAC CTGGATCTGTTCCGTCTGCGATC	62	396	(18)
Inter 2 F R	CCTGATAGAACCCTGGTGGTGCC CTGGATCGGTTCCATCGCTCAG	62	406	(18)
Borgpeter F R	CTTGATAGAACAACAGGGGGCATCATC GCTAATAAGTTTGCAATGCTCGTAAC	62	389	(18)
Sej F R	CGACCGAGATTGACTATGTT GAAAGCAGCATAAGTCCC	60	319	(5)

no elektroforezie w 2% żelu agarozowym, wprowadzając do baseników w żelu po 10 µl mieszaniny poreakcyjnej i 2 µl buforu obciążającego. Elektroforezę prowadzono w roztworze 1 × TBE przy stałym natężeniu 350 mA. Barwienie żelu prowadzono w bromku etydyny o stężeniu 1 µl/ml. Wielkość produktów oceniano porównując je z markerem masy Gene-Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (prod. Fermentas, Litwa).

Badania przeprowadzono w laboratoriach Zakładu Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

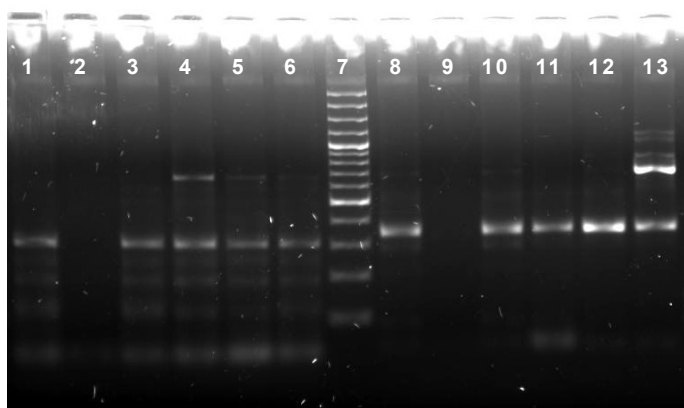
Wyniki i omówienie

Wyniki badań serologicznych loch i badań metodą PCR przedstawiono w tab. 2. U wszystkich badanych loch z ferm S1 i S2 stwierdzono obecność przeciwciał reagujących z serowarem Sejroe w mianach od 100 do 6400. Surowice loch z fermy P wykazywały obecność przeciwciał reagujących z serowarem Pomona w mianach 1600 i 400.

Badanie PCR wykazało obecność DNA *Leptospira spp.* we wszystkich badanych próbkach moczu loch (tab. 2, ryc. 1). W próbkach moczu od loch nr 1, 3, 4 z fermy S1 oraz nr 1 i 4 z fermy S2 stwierdzono również obecność DNA gatunku *L. borgpetersenii*, do którego należą leptospiry serowaru i serogrupy Sejroe. Badanie PCR z wykorzystaniem starterów Sej F i Sej R wykazało występowanie DNA leptospir serogrupy

Tab. 2. Wyniki badań serologicznych (OAM) loch z ferm S1 i S2 wraz z uzyskanymi wynikami badań metodą PCR próbek ich moczu

Ferma	Nr zwierzęcia	Wyniki OAM		Wyniki badania PCR ze starterami par				
		swoistość	miano	Lepto	Inter 1	Inter 2	Borgpeter	Sej
S1	1	Sejroe	1600	+	-	-	+	+
	2	Sejroe	3200	+	-	-	-	-
	3	Sejroe	200	+	-	-	+	-
	4	Sejroe	400	+	-	-	+	+
S2	1	Sejroe	3200	+	-	-	+	+
	2	Sejroe	3200	+	-	-	-	+
	3	Sejroe	100	+	-	-	-	+
	4	Sejroe	6400	+	-	-	+	+



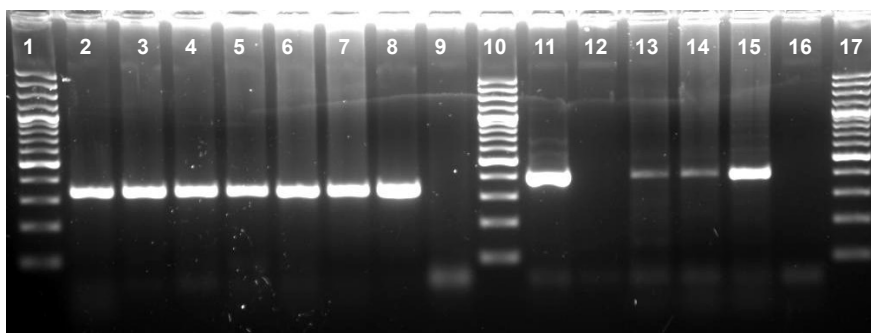
Ryc. 1. Obraz elektroforezy produktów PCR próbek moczu loch z fermi S2 ze starterami Sej F, Sej R (ścieżki 1-6) i Lepto F, Lepto R (ścieżki 8-13)

Objaśnienia: ścieżki 1, 8 – kontrola pozytywna (*L. borgpetersenii* serowar Sejroe szczep M 84 z Kolekcji Królewskiego Instytutu Tropikalnego w Amsterdamie); ścieżki 2, 9 – kontrola negatywna; ścieżki 3, 10 – próbka moczu lochy nr 1; ścieżki 4, 11 – próbka moczu lochy nr 2; ścieżki 5, 12 – próbka moczu lochy nr 3; ścieżki 6, 13 – próbka moczu lochy nr 4; ścieżka 7 – wzorzec masy molekularnej

Sejroe we wszystkich próbkach moczu z fermi S2 (ryc. 1) oraz w dwóch próbkach z fermi S1. Badania nie wykazały obecności DNA gatunku *L. interrogans sensu stricto* w żadnej z badanych próbek moczu.

Badanie metodą PCR materiału z poronionych płodów wykazało obecność DNA *Leptospira spp.* we wszystkich wycinkach nerek, wątroby i płuc pobranych od wszystkich poronionych płodów z fermi P (tab. 3). Badanie ze starterami Inter 1 F i Inter 1 R, umożliwiającymi amplifikację m.in. DNA *L. interrogans* serowaru Pomona wykazało wynik pozytywny w przypadku wszystkich badanych narządów u 3 płodów (tab. 3). U czwartego z nich wynik taki stwierdzono w wątrobie i płucach (ryc. 2).

Obecność DNA *Leptospira spp.* wykazano w próbkach wybranych narządów 3 poronionych płodów



Ryc. 2. Obraz elektroforezy produktów PCR próbek narządów mięsowych poronionych płodów z fermi P ze starterami Lepto F, Lepto R (ścieżki 2-9) i Inter 1 F Inter 1 R (ścieżki 11-16)

Objaśnienia: ścieżki 1, 10, 17 – wzorzec masy molekularnej; ścieżki 8, 11 – kontrola pozytywna (*L. interrogans* serowar Pomona szczep Pomona z kolekcji Królewskiego Instytutu Tropikalnego w Amsterdamie); ścieżki 9, 12 – kontrola negatywna; ścieżka 2 – nerka płodu 1; ścieżka 3 – wątroba płodu 1; ścieżka 4 – płuca płodu 1; ścieżka 5 – nerka płodu 2; ścieżka 6 – wątroba płodu 2; ścieżka 7 – płuca płodu 2; ścieżka 13 – nerka płodu 1; ścieżka 14 – nerka płodu 2; ścieżka 15 – nerka płodu 3; ścieżka 16 – nerka płodu 4

z fermi S1 (tab. 3). Badanie nie wykazało obecności DNA *L. borgpetersenii* w DNA leptospir serogrupy Sejroe ani w żadnym z wycinków płodów z fermi S1.

Przedstawione wyniki potwierdziły przydatność PCR do wykazania obecności materiału genetycznego krętków z rodzaju *Leptospira* w próbkach moczu pochodzącego od seropozytywnych loch. Metoda wydaje się też przydatna do wykrywania DNA rodzaju *Leptospira* w tkankach poronionych płodów z fermi, w których badania serologiczne wskazywały na występowanie zakażeń tymi drobnoustrojami, jakkolwiek konieczne są tu dodatkowe badania na liczniejszym materiale. Serowar Pomona jest jednym z najczęściej wymienianych czynników etiologicznych leptospirozy świń (7, 10). Występuje on na całym świecie. Z kolei leptospiry serogrupy Sejroe stanowią w Polsce, wg wyników wieloletnich monitoringowych badań serologicznych, jedną z najbardziej rozprzestrzenionych w stadach świń grup omawianych drobnoustrojów (22-24). Ich występowanie w ostatnich latach stwierdzano niemal tak często, jak najliczniej spotykane zakażenia serowarem Pomona, a niekiedy nawet częściej (22). Spotykany nierzadko brak dostrzegalnych objawów klinicznych u świń wykazujących wysokie niekiedy miana przeciwciał reagujących z serowarem Sejroe mógł nasuwać wątpliwości, co do rzeczywistego stopnia zagrożenia, jakie stanowią te zakażenia. Wykazanie obecności DNA leptospir w materiale klinicznym roniących loch i poronionych płodów jest nie tylko dodatkowym istotnym dowodem potwierdzającym obecność tych drobnoustrojów, lecz również umożliwia śledzenie potencjalnych dróg przenoszenia omawianych zakażeń.

Użyte w prezentowanych badaniach startery oznaczone nazwą Lepto F, Lepto R umożliwiają amplifikację sekwencji fragmentu genu *rrs* (16S) leptospir (15). Stosowano je do wykrywania DNA leptospir w materiale klinicznym od ludzi (mocz, płyn mózgoworzdzeniowy) (15) oraz zwierząt (mocz) (6). Zastosowanie PCR z ich użyciem w prezentowanych badaniach pozwoliło potwierdzić obecność leptospir w próbkach moczu seropozytywnych świń i, co rzadziej spotykane, w tkankach poronionych płodów.

Zastosowanie pozostałych wymienionych w tab. 1 starterów miało na celu określenie przynależności gatunkowej i (w przypadku użycia starterów Sej) serogrupowej leptospir, których DNA wykryto w badanym materiale klinicznym. Autorzy, którzy jako pierwsi zaproponowali użycie tych starterów (5, 18), wykorzystywali je do identyfikacji DNA oczyszczonych hodowli leptospir. W prezentowanych badaniach własnych wykorzystano je natomiast do identyfikacji DNA z materiału klinicznego.

Tab. 3. Wyniki badań metodą PCR próbek z narządów mięsnych poronionych płodów z ferm P i S1

Ferma	Nr zwierzęcia	Narząd	Wyniki badania PCR ze starterami				
			Lepto	Inter 1	Inter 2	Borgpeter	Sej
P	1	nerka	+	+	-	-	-
		wątroba	+	+	-	-	-
		płuca	+	+	-	-	-
	2	nerka	+	+	-	-	-
		wątroba	+	+	-	-	-
		płuca	+	+	-	-	-
	3	nerka	+	+	-	-	-
		wątroba	+	+	-	-	-
		płuca	+	+	-	-	-
	4	nerka	+	-	-	-	-
		wątroba	+	+	-	-	-
		płuca	+	+	-	-	-
S1	1	nerka	+	-	-	-	-
		wątroba	-	-	-	-	-
		płuca	-	-	-	-	-
	2	nerka	+	-	-	-	-
		wątroba	+	-	-	-	-
		płuca	+	-	-	-	-
	3	nerka	-	-	-	-	-
		wątroba	-	-	-	-	-
		płuca	-	-	-	-	-
	4	nerka	+	-	-	-	-
		wątroba	-	-	-	-	-
		płuca	+	-	-	-	-

Uzyskane wyniki wydają się wskazywać na konieczność poprawy czułości reakcji przy takim zastosowaniu niektórych z omawianych starterów.

Należy zwrócić uwagę, że wyniki badania metodą PCR płodów poronionych przez lochy wykazujące przeciętnie dla serogrupy Pomona stanowią jednoznaczne potwierdzenie i uzupełnienie wyników badań serologicznych loch. W piśmiennictwie nie zaproponowano dotychczas sekwencji starterów specyficznych dla serowaru lub serogrupy Pomona. Uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki pozytywne z parą starterów Inter 1 potwierdzają obecność w badanym materiale DNA leptospir z grupy należących do *L. interrogans sensu stricto* serowarów, obejmujących również serowar Pomona.

Z kolei w przypadku poronionych płodów od lochy reagującej w OAM z serowarem Sejro wyniki PCR mogą wskazywać na obecność DNA leptospir w poszczególnych narządach, lecz nie dają odpowiedzi potwierdzającej ich przynależność gatunkową i serogrupową. Bardziej spójne wyniki PCR uzyskano w odniesieniu do próbek moczu loch, szczególnie z fermy S2. Przyczynami niespójności może być mniejsza czułość metody przy zastosowaniu określonych star-

terów czy też związana z ich użyciem podwyższona podatność na inhibitory PCR występujące w moczu i tkankach.

Wykorzystanie PCR w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej leptospirozy jest wciąż, jak wspomniano, dość ograniczone. Piśmiennictwo z tego zakresu rzadko ma charakter raportów z rutynowych badań diagnostycznych czy monitoringowych i dotyczy zwykle gatunków innych niż świnię (3, 6, 13, 16, 20, 21). Metodę PCR, częściej ze starterami specyficznymi dla rodzaju *Leptospira* (12, 14, 15), stosuje się głównie w laboratoriach referencyjnych. Do identyfikacji leptospir spośród wspomnianych we wstępie metod molekularnych nieco częściej bywa wykorzystywana RFLP. Tym niemniej, proponowane ostatnio w piśmiennictwie (5, 17, 18) i użyte w omawianych badaniach zestawy starterów o specyficzności gatunkowej czy serogrupowej wydają się interesującym i przydatnym narzędziem diagnostycznym, zwłaszcza w nieco lepiej wyposażonych laboratoriach. Przedstawione badania ilustrują dostępne obecnie możliwości wykorzystania prostej reakcji PCR w rutynowej diagnostyce leptospirozy świń. Uzyskane wyniki wskazały też na możliwe ograniczenia metody, szczególnie przy jej stosowaniu do prób szybkiej identyfikacji leptospir

w materiale klinicznym. Do jednoznacznego potwierdzenia lub wykluczenia tych ograniczeń konieczne są jednak badania na liczniejszej grupie zwierząt.

Piśmiennictwo

- Adler B., Lo M., Seemann T., Murray G.: Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet. Microbiol.* 2011, 153, 73-81.
- Bolin C.: Leptospirosis, [w:] *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. OIE World Organisation for Animal Health, Paris, France 2012, 209-221.
- Bofim M., Barbosa-Stancioli E., Koury M.: Detection of pathogenic inn urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet. J.* 2008, 178, 251-256.
- Branger C., Blanchard B., Fillonneau C., Suard I., Aviat F., Chevallier B., Andre-Fontaine G.: Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the haemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 243, 435-437.
- Cai C., Zhu Y., Zhong Y., Xin X., Jiang X., Lou X., He P., Quin J., Zhao G., Wang S., Guo X.: Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China. *BMC Microbiology* 2010, 10, 67.
- Çetinkaya B., Ertaş B., Öngör H., Muz A.: Detection of *Leptospira* species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2000, 24, 123-130.
- Ellis W.: Leptospirosis, [w:] Zimmerman J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G. (wyd.): *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell 2012, 770-778.
- Ellis W., McParland, Bryson D., Cassels J.: Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with abortion problem. *Vet. Rec.* 1986, 118, 563.

9. Ellis W., McParland., Bryson D., Thiermann A., Montgomery J.: Isolation of leptospire from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet. Rec.* 1986, 118, 294-295.
10. Faine S.: *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton 1994.
11. Gerritsen M., Olyhoek T., Smits M., Bokhout B.: Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2805-2808.
12. Gravekamp C., Van de Kemp H., Franzen M., Carrington D., Schoone G., Van Eys G., Everard C., Hartskeerl R., Terpstra W.: Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 1993, 139, 1691-1700.
13. Heinemann M., Garcia J., Nunes C., Gregori F., Higa Z., Vasconcellos S., Richtzenhain L.: Detection and differentiation of *Leptospira* spp. in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.* 2000, 73, 261-267.
14. Hookey J.: Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 90, 267-274.
15. Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I.: Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 2219-2224.
16. Oliveira S., de Bortolanza F., Passos D., Simões Pires Neto J., Fallavena L., Weimer T.: Molecular diagnosis of *Leptospira* spp. in culled sows. *Braz. J. Vet. Res.* 2007, 44, 18-23.
17. Paiva-Cardoso M., Arent Z., Gilmore C., Hartskeerl R., Ellis W.: Altodouro, a new *Leptospira* serovar of Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infect. Genet. Evol.* 2013, 13, 211-217.
18. Reitstetter R.: Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 264, 31-39.
19. Savio M., Rossi C., Fusi P., Tagliabue S., Pacciarini M.: Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 935-941.
20. Tramuta C., Lacerenza D., Zoppi S., Gorla M., Dondo A., Ferroglio E., Nebbia P., Rosati S.: Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011, 23, 657-664.
21. Vitale M., Vitale F., Di Marco V., Curró V., Vesco G., Caracappa S.: Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2005, 57, 25-27.
22. Wasiński B.: Occurrence of *Leptospira* sp. antibodies in swine in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007, 51, 225-228.
23. Wasiński B.: Występowanie zakażeń bakteriami z rodzaju *Leptospira* u świń w latach 2002-2003. *Med. Weter.* 2005, 61, 45-49.
24. Wasiński B., Pejsak Z.: Occurrence of leptospiral infections in swine population in Poland evaluated by ELISA and microscopic agglutination test. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, 13, 695-699.
25. Woodward M., Redstone J.: Differentiation of *Leptospira* serovars by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Rec.* 1993, 132, 325-326.

Adres autora: dr Brenard Wasiński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy;
e-mail: wasinski@piwet.pulawy.pl