

HANNA LEWKOWICZ

## Próby zobjektywizowania wyników badań przy serologicznym rozpoznawaniu brucelozы świń

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu

Na podstawie badań serologicznych przeprowadzonych w ZHW w Poznaniu w latach 1976—1978 stwierdzono u świń stały wzrost liczby wyników dodatnich odczynu aglutynacyjnego w kierunku brucelozы z 0,01% do 0,15%. Obiektywną ocenę tego faktu utrudnia równoczesne występowanie w tym odczynie stosunkowo dużej liczby wyników wątpliwych i jeszcze większej liczby (ponad 1%) reakcji o wartościach granicznych.

W szeregu opublikowanych ostatnio prac zwraca się uwagę na trudności w serodiagnostyce brucelozы świń (2, 9, 12, 14, 19), jednak niewielu autorów (2, 11, 17) zajmuje się swoistością wyników uzyskiwanych u trzody chlewnej. Celem pracy była próba wyjaśnienia w jakim stopniu stwierdzane poziomy aglutynin anty-*Brucella* mogą być wynikiem reakcji krzyżowych z wybranymi gatunkami drobnoustrojów. Podjęto próbę zobjektywizowania określonej liczby wyników uzyskanych w odczynie aglutynacyjnym przy pomocy dodatkowych badań uzupełniających.

### Materiał i metody

Materiałem badanym były próbki krwi świń nadsyłane do ZHW w Poznaniu w latach 1978—79. Zastosowane metody badań obejmowały w stosunku do ogólnej liczby prób odczyn aglutynacyjny (OA) i odczyn wiązania dopełniacza (OWD) w kierunku brucelozы (15) oraz odczyn aglutynacji mikroskopowej (AM) w kierunku leptospirozy. Określoną reprezentatywną ilość prób zbadano ponadto odczynem aglutynacyjnym z antygenem *Salmonella* z grupy OC.

Badania uzupełniające obejmowały w stosunku do reprezentatywnej liczby prób porównawcze odczyny aglutynacyjne jak i wiązania dopełniacza przy użyciu antygeny *Brucella abortus* i *Brucella suis* oraz odczyn merkapto-etanolowy (OME). W badaniach posługiwano się krajowymi komponentami diagnostycznymi (antygeny, surowice referentne) oraz komponentami produkcji „Bioveta” z Czechosłowacji (antygeny *Br. suis* do OA i OWD, surowica anty-*Brucella suis*).

### Wyniki i omówienie

Wszystkie wyniki OWD z antygenem *Br. abortus* dla 41 300 badanych prób krwi były ujemne. Wyniki OA z antygenem *Br. abortus* dotyczące tych samych prób zestawione z wynikami odczynu AM w kierunku leptospirozy przedstawia tab. 1. W rozważaniach związanych z ewentualnym współzakażeniem leptospirami na uwagę zasługują wyniki autorów rumuńskich (8), którzy opisali występowanie niskich mian aglutynin anty-*Brucella* z surowicami świń w przebiegu zakażenia terenowego i doświadczalnego leptospirami u trzody chlew-

nej. Towarzyszące zakażeniu leptospirami aglutyniny anty-*Brucella* zostały określone jako termolabilne i nieswoiste. W sytuacji epizootycznej Wielkopolski (13), gdzie wśród świń z objawami klinicznymi leptospirozy stwierdzane było zakażenie *L. tarassovi* oraz u świń bez żadnych objawów chorobowych — *I. icterohaemorrhagiae* i *L. sejiroae* nie stwierdzono różnic w nasileniu występowania dodatnich mian anty-*Brucella* w chlewniach zdrowych czy zakażonych. Nie stwierdzono również współzależności w występowaniu mian anty-*Brucella* i anty-*Leptospira* u poszczególnych zwierząt. Analizowanych więc aglutynin nie można łączyć z zakażeniami leptospirowymi.

Tab. 1. Zestawienie wyników OA w kierunku brucelozы i AM w kierunku leptospirozy

Miana surowic z antygenem <i>Br. abortus</i>	AM *)						OA	
	Liczba prób o mianach:						ilość prób	%
	(—)	100	200	400	800	1600		
(—)	39 037	216	402	399	290	334	40 678	98,50
12,5	405	4	3	12	7	3	434	1,05
25	120	1	0	4	0	1	126	0,30
50	46	0	0	0	1	0	47	0,15
100	11	0	0	0	0	0	11	
200	2	0	0	0	0	0	2	
400	2	0	0	0	0	0	2	
Ogółem	39 623	221	405	415	298	338	41 300	100

Objaśnienie: \*) w zestawieniu uwzględniono surowice reagujące chociaż z jednym z 6-ciu użytych antygenów leptospirowych (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. sejiroae*, *L. tarassovi*, *L. pomona*, *L. canicola*).

W tab. 2 przedstawiono w odniesieniu do wybranych 19 surowic wyniki OA z najczęściej stwierdzanymi u świń (18) antygenami *Salmonella* z grupy OC w porównaniu z wynikami OA w kierunku brucelozы. Należy stwierdzić, że nie udało się ustalić współzależności w występowaniu aglutynin anty-*Brucella* u świń klinicznie zdrowych z określonym poziomem aglutynin anty-*Salmonella* z grupy OC podobnie jak z wcześniej porównywanymi w stosunku do *S. typhimurium* i *S. enteritidis* Jena (12). Wprawdzie Corbel i Wray (3) w przebiegu zakażenia u bydła pałeczką *S. dublin* opisali współaglutynację i w konsekwencji u wielu krów pojawienie się niskich mian anty-*Brucella*, jednak były one znacznie niższe niż miana anty-*Salmonella* i uległy szybko zanikowi nie komplikując specjalnie rozpoznania dotyczącego brucelozы. W stwierdzanych przypadkach dodatnich reakcji u świń równoległe miana anty-*Salmonella* odnosiły się nie tylko do zwierząt reagujących w kierunku brucelozы, lecz do całej populacji, z której pochodziły badane zwierzęta. Obliczony statystycznie współ-

czynnik korelacji (16) omawianych zależności wyników OA z antygenem *Br. abortus* i antygenem *Salmonella* z grupy OC był we wszystkich przypadkach bliski zero, co świadczy o potwierdzeniu braku współzależności pomiędzy porównywanymi wynikami.

W tab. 3 w odniesieniu do 100 zbadanych surowic przedstawiono porównawcze wyniki OA uzyskane z antygenami *Br. abortus* i *Br. suis*. Średnie miano surowic z antygenem *Br. suis* było niższe niż z antygenem *Br. abortus* tak, że w efekcie przy obowiązującej interpretacji (15) liczba świń reagujących dodatnio z *Br. suis* w ostatecznej ocenie wypadła o 50% mniejsza, a liczba świń ocenionych jako wątpliwe reagujące o 71,4% mniejsza w porównaniu do wyników ocenionych na podstawie OA z *Br. abortus*. Równoczesne zastosowanie obu antygenów pozwoliło

Tab. 2. Zestawienie wyników OA w kierunku brucelozy i OA z antygenem *Salmonella* grupy OC

Miana surowic OA z antygenem <i>Br. abortus</i>	Miana surowic z antygenem <i>Sal. OC</i>						Liczba wyników OA z antygenem <i>Br. abortus</i>
	(—)	12,5	25	50	100	200	
(—)	6	6	11	15	3	1	42
12,5	13	14	31	29	10	0	97
25	5	7	13	13	3	0	41
50	4	3	3	6	0	0	16
100	0	1	0	1	0	0	2
400	0	0	1	0	0	0	1
Ogółem	28	31	59	64	16	1	199

Tab. 3. Zestawienie wyników OA z antygenem *Br. abortus* w porównaniu z wynikami OA z antygenem *Br. suis*

Miana surowic z <i>Br. abortus</i>	Wyniki OA z <i>Br. suis</i>					Liczba wyników z <i>Br. abortus</i>
	Liczba prób o mianach:					
	(—)	12,5	25	50	100	
(—)	28	0	0	0	0	28
12,5	11	37	0	0	0	48
25	1	12	1	0	0	14
50	0	1	3	1	0	5
100	0	1	0	3	1	5
Liczba wyników z <i>Br. suis</i>	40	51	4	4	1	100

Tab. 4. Zestawienie wyników dwóch kolejnych badań OA w kierunku brucelozy — prób od tych samych świń pobranych po upływie 2—3 tygodni

Miana surowic	Liczba wyników *)	
	I badanie	II badanie
(—)	0	73
12,5	38	26
25	54	10
50	7	0
100	6	0
200	2	0
400	2	0
Razem	109	109
Średnie miana	36,5	5,3

Objaśnienie: \*) w obu badaniach użyto antygeny *Brucella abortus*.

wykluczyć podejrzenie o zakażenie *Br. suis*. Podczas gdy standardowa surowica anty-*Brucella abortus* z homologicznym antygenem miała miano 1/50<sup>++</sup>, a z *Br. suis* 1/25<sup>+++</sup>, kontrolna surowica anty-*Brucella suis* wykazywała równy wynik z obu antygenami: 1/1280<sup>++</sup>. Wyniki OWD w kierunku brucelozy z obu porównawczo użytymi antygenami były we wszystkich 100 surowicach jednakowo ujemne, a surowice kontrolne z obu antygenami miały jednakowe miano: 1/100<sup>++</sup>.

W tab. 4 przedstawiono wyniki surowic reagujących w OA z antygenem *Br. abortus*, które udało się ponownie skontrolować po upływie 2-3 tygodni od daty pobrania pierwszej próby. Okazało się, że następuje szybki regres określonych mian OA, co dobitnie manifestuje się różnicą w wartości średniego miana obliczonego dla pierwszego i drugiego badania tych samych surowic.

Z 651 surowicami wykonano odczyn z 2-merkaptotanołem (OME). Pomimo dużej rozbieżności mian OA ujemnych do 1/400, wszystkie wyniki OME były ujemne, a za tym indentyczne jak wyniki OWD. Do miareczkowania dopełniacza w układzie bakteriologicznym używano surowice bydlęce (dodatnia i ujemna) oraz równoległe surowice świńską (ujemną). Na wykonanie tym sposobem 42 miareczkowania w 40 przypadkach hemolizę zupełną (zarówno w próbkach z antygenem jak i bez) otrzymano przy dawce niższej o 0,5% dopełniacza w porównaniu z samym układem hemolitycznym jak i bakteriologicznym z surowicami bydlęcymi. Wyniki OME wskazują, że wszystkie stwierdzone aglutyniny należą do klasy IgM immunoglobulin (7). Na mało stabilny charakter analizowanych aglutynin wskazuje również szybki spadek wartości średniego miana. Immunoglobuliny IgM są uważane za główną przyczynę reakcji nieswoistych oraz daleko słabiej wiążą dopełniacz i tylko przy inaktywacji surowic w temp. 56°C (5). W prowadzonych badaniach uzyskano we wszystkich przypadkach ujemne wyniki OWD inaktywując surowice w temp. 59—61°C. Surowice świńskie posiadają, nawet po inaktywacji, właściwości prokomplementarne (1), które ujawniły się przy wykonywaniu porównawczych miareczkowań dopełniacza z surowicami bydlęcymi i świńskimi. Toteż nic dziwnego, że przy próbie włączenia OWD do rozpoznawania leptospirozy świń przez analogię do postępowania z surowicami ludzkimi (20), Górską i wsp. (4) uzyskali w chlewniach zakażonych leptospirozą zaledwie 10,6% wyników dodatnich OWD, podczas gdy OA z tym samym antygenem wykrywano 72,8% reakcji pozytywnych. Karpińskiemu i Skwarek (10) przy zakażeniu doświadczalnym świń pałeczkami *Br. suis* i *Br. abortus* pozytywne wyniki OWD udało się uzyskać jeden raz pomiędzy 6 a 9 tygodniem od dnia zakażenia, podczas gdy dodatnie wyniki OA ujawniły się w 3 tygodnie po zakażeniu. Lipnicki (14) w czasie obserwacji 6 świń chorych na brucelozę z różnym poziomem przeciwciał w OA stwierdził u 4 świń ujemne reakcje OWD. Hajdu (6) podaje, że w stadach świń wolnych od brucelozy stwierdzał pozytywne wyniki OA, lecz nie przekraczające roz-

ciężczenia 1/40 przy ujemnych wynikach OWD i zastosowanego dodatkowo odczynu antyglobulinowego (OAG). Jednak u świń zakażonych brucelozą w poszerzonym badaniu serologicznym o OAG i odczyn immunofluorescencyjny oraz próbę alergiczną, uzyskał w jej efekcie około 50% dodatnich wyników OWD w porównaniu z pozostałymi stosowanymi odczynami. W świetle prac cytowanych autorów (1, 4, 5, 6, 9, 14) i wyników własnych, diagnostyczna wartość OWD z surowicami świńskimi budzi określone wątpliwości. Wobec licznych reakcji pozytywnych OA u świń w kierunku brucelozy i braku współzależności między nimi a analizowanymi wynikami dodatkowych badań, wydaje się konieczne opracowanie doskonalszej techniki OWD oraz poszerzonego badania, na podstawie którego można by uściślić serologiczne rozpoznawanie brucelozy u świń.

### Wnioski

1. Wyniki odczynu aglutynacyjnego z antygenem *Brucella abortus* u tych samych świń nie wykazuje korelacji z wynikami odczynów zleptych w kierunku leptospirozy i salmonelozy.

2. Odczyn aglutynacyjny nastawiany dodatkowo z antygenem *Brucella suis* pozwala zobiektywizować ocenę ostateczną wyników w odniesieniu do zakażeń pałeczką *Brucella suis*.

3. Odczyn wiązania dopełniacza w kierunku brucelozy z surowicami trzody chlewnej, przy obowiązującej technice jego wykonania, cechuje się niską wartością diagnostyczną.

4. Badania serologiczne w odniesieniu do brucelozy u świń winny być poszerzone o dodatkowe odczyny.

### Piśmiennictwo

1. Benítez A., Coto A.: Rev. Cubana Cienc. Vet. 1/2, 83, 1976.
2. Bockemühl J., Roth J.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I 240, 86, 1978.
3. Corbel M. J., Wray C.: Br. vet. J. 131, 324, 1975.
4. Górska I., Kocik T., Porębska B., Królak M.: Medycyna Wet. 35, 469, 1979.
5. Golev J.: Zentbl. Vet. Med. 25, 268, 1978.
6. Hajdu S.: Arch. exp. Vet. Med. 9, 976, 1957.
7. Instytut Weterynarii — Standardowa technika OME, Puławy 1979.

MITTAL K. R., TIZARD I. R.: Badania nad zależnością między aglutyninami dla *Yersinia enterocolitica* IX i *Brucella abortus* i zwierząt zakażonych na drodze naturalnej. (Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals). Res. vet. Sci. 28, 311—314, 1980 (3).

Antygeny O i OH *Yersinia enterocolitica* sporządzono ze szczepu 578 wg metody Mittala i Tizarda. W oparciu o metodę opracowaną przez tych autorów wykonano odczyn aglutynacji z surowicami bydła, kóz i owiec zakażonych brucelozą względnie *Y. enterocolitica*. Surowica zwierząt zarażonych *Yersinia* posiada przeciwciała dla antygenów H i O *Yersinia* oraz aglutyniny dla *Brucella abortus*. Natomiast w surowicy zwierząt zakażonych wyłącznie *Brucellą abortus* występują aglutyniny dla antygenów O Br. abortus i *Yersinia*, brak jest aglutynin dla antygeny H. *Yersinia enterocolitica*.

G.

8. Ionica S., Tudorlu C., Cambir S., Predoiu S., Lelutiu C.: Lucr. Inst. Pat. Ig. Anim. Bukareszt 12, 31, 1963.
9. Iuanow M. M., Malachowa T. I., Baikie B., Grzejzer A. M., Wilezenko W. E., Duranov W. S.: Veterinarlija, Moskwa 9, 87, 1976.
10. Karpínski T., Skwarek P.: Biul VI Zjazdu PTNW, Wrocław 2, 553, 1978.
11. Królak M., Chyliński G., Nowosielski T., Stryczek A.: Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław 2, 213, 1978.
12. Lewkowicz H.: Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław 2, 571, 1978.
13. Lewkowicz H., Nawratil H.: Przegląd prac ZHW Poznań 55, 1979.
14. Lipnicki J.: Życie wet. 46, 36, 1971.
15. Min. Rol. Dep. Wet.: Przepisy o zwalczaniu brucelozy zwierząt. PWRiL, 1968.
16. Oktaba W.: Metody statystyki matematycznej w doświadczeniu, PWN, 1967.
17. Sierra A.: Proc. XXI World Vet. Congres, Moskwa 6, 48, 1979.
18. Stulewska M., Truszczyńska M., Horzowski A.: Medycyna Wet. 32, 655, 1976.
19. Srom J., Pathak P. N.: Indian vet. J. 46, 191, 1969.
20. Strudźka N., Elian M., Tulpan C.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. 19, 572, 1960.

Adres autora: dr Hanna Lewkowicz, ul. Słowackiego 38 m. 7, 60-825 Poznań.

Левкович Г. — Попытки объективирования результатов исследований при серологическом распознавании бруцеллеза свиней.

В контрольных исследованиях 41300 проб свиной крови относительно бруцеллеза агглютинационной реакцией оценивались в 0,15% случаев положительные реакции, а в 0,30 — сомнительные. Для выяснения эпизоотической ситуации стада были предприняты попытки установления взаимозависимости одномоментного появления агглютининов анти-*Brucella* и агглютининов анти-*Leptospira*, а также анти-*Salmonella*. Параллельное применение антигенов *Brucella abortus* и *Brucella suis* позволило исключить инфекции палочками *Brucella suis*. Описанные противотела анти-*Brucella* чувствительны к действию 2-меркаптоэтанола и необнаруживаемые реакцией связывания комплемента, а также в большинстве случаев не диагностируются вторично по истечении 2—3 недель.

Lewkowicz H. — Attempts to obtain objective results in case of serological examinations of pig sera towards brucellosis.

The examinations of 41300 samples of blood towards brucellosis revealed in 0,15 per cent positive serological reactions and in 0,2 per cent doubtful ones. In order to explain the epizootiological situation of the flocks the serological tests were performed simultaneously for antibodies of *Brucella abortus* and *suis*, *Leptospira* and *Salmonella*. The antibodies appeared to be sensitive to 2-mercapto-ethanol, did not fix complement and could not usually be discovered after 2-3 weeks.

FERNIE D. S., BATTY I., WALKER P. D., PLATT H., MacKINTOSH M. E., SIMPSON D. J.: Obserwacje nad szczepionką i odpornością pozakaźną w zakaźnym zapaleniu macicy klaczy. (Observations on vaccine and post-infection immunity in contagious equine metritis). Res. vet. Sci. 28, 362—367, 1980 (3).

Formalizowana szczepionka oparta o *Haemophilus equigenitalis* stymulowała u czterech kucyków wysokie miano swoistych przeciwciał. U trzech z czterech szczepionych kucyków i trzech nie szczepionych po zakażeniu zjadliwym szczepem *H. equigenitalis* wystąpiły typowe kliniczne objawy zakaźnego zapalenia macicy. Objawy kliniczne wystąpiły również u trzech kucyków, które uprzednio przechorowały zakażenie. Natężenie objawów klinicznych było silniej zaznaczone u kucyków z grupy eksperymentalnej i grupy kontrolnej w porównaniu do kucyków, które przechorowały zakaźne zapalenie macicy.

G.