

ANDRZEJ STRYSZAK, MARIAN KRÓLAK

Nowe tendencje w diagnostyce brucelozy zwierząt

Z Pracowni Badania Brucelozy Instytutu Weterynarii w Puławach z siedzibą w Gdańsku

Bruceloza stanowi wciąż jeden z ważniejszych problemów w dziedzinie chorób zakaźnych zwierząt na świecie. Nawet w takich krajach jak Szwecja i RFN, które przed wielu już laty uzyskały status wolnych od tej choroby, nie obserwuje się spadku zainteresowania jej problematyką. Wynika to z ciągłego zagrożenia każdego kraju wybuchem nowego ogniska brucelozy, na co wpływa import i eksport, często brak kontroli nad obrotem zwierząt w kraju, możliwość przenoszenia choroby przez mleko, mięso i odpady poubojowe, bruceloza zwierząt wolno żyjących, brak skutecznych metod leczenia oraz niedoskonałość dotychczasowych metod diagnostyki. Z punktu widzenia weterynarii to ostatnie zagadnienie jest najistotniejsze. Liczba odczynów, głównie serologicznych, przystosowanych do wykrywania brucelozy sięga ostatnio trzydziestu. Poszukiwania zmierzają do opracowania prostej i taniej metody, dostosowanej do badań masowych, która mogłaby zastąpić pracochłonną i kosztowną diagnostykę opartą na odczynach klasycznych — odczynie aglutynacji (OA) i odczynie dopełniacza (OWD). Dąży się również do tego, aby w razie podejrzenia brucelozy, dysponować szeroką gamą odczynów umożliwiających wszechstronną analizę sytuacji. Taki model postępowania jest szczególnie odpowiedni dla kraju urzędowo uznanego za wolny od tej choroby.

Spośród wielu nowych metod nie stosowanych w Polsce, omówione zostały jedynie te, które znalazły już szersze zastosowanie za granicą, a mianowicie: odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP), odczyn hemaglutynacji biernej (OHB) oraz testy do badania odporności typu komórkowego (OTK). Wszystkie one znalazły się na liście testów, nad których wartość diagnostyczną prowadzone są intensywne prace, zgodnie z zaleceniami międzynarodowego sympozjum poświęconego brucelozie w Rabacie (12).

1. Odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP)

Odczyn ten w ostatnich latach wzbudził duże zainteresowanie na całym świecie. Początkowo został zastosowany w USA w badaniach terenowych bydła jako tzw. „Card Test” (29, 39). Po przebadaniu jego mechanizmu i wartości rozpoznawczej, odczyn ten pod nazwą Rose Bengal Plate Test (RBPT) został wprowadzony w Anglii i innych krajach do badań rutynowych zwierząt na brucelozę (7, 8, 25, 26). Zamiast drogiego i pracochłonnego badania w OA i OWD, zwierzęta badane są wstępnie w RBPT i w przypadku wyników dodatnich badane powtórnie w odczynach klasycznych.

Wielu autorów podkreśla dużą czułość i swoistość OKAP, co umożliwia użycie tego odczynu do wstępnej selekcji badanych zwierząt (7, 8, 10, 35). Na podkreślenie zasługuje duża swoistość OKAP, przypisywana dominującej roli IgG₁ w tym odczynie. Decyduje o tym niskie pH antygeny (pH 3,65) i jego duża siła buforowa, dzięki której po dodaniu antygeny do badanej surowicy kwasowość środowiska ulega tylko nieznacznemu podwyższeniu. Zdaniem Corbela (8) w środowisku o pH 3,65, aktywne są tylko przeciwciała IgG₁, natomiast przy pH 7 czynne są również inne klasy Ig. Dużą aktywność IgG₁ w kwaśnym środowisku Corbel (8) tłumaczy wzrostem aglutynalności, względnie awidności.

W piśmiennictwie zgodnie podkreślana jest duża aktywność IgG₁ w OKAP, wynikająca z niskiego pH, natomiast aktywność innych klas Ig jest dyskusyjna (1, 4, 7, 9, 21, 32, 33, 34, 48). Rola barwnika stosowanego do barwienia antygeny (róż bengalski, od którego pochodzi angielska nazwa odczynu) ogranicza się tylko do ułatwienia odczytu wyników (8). Badania wstępne wykonane w naszej Pracowni oraz w Zakładach „Biowet” w Puławach (47) wykazały, że z równym skutkiem stosowane mogą być w tym celu sole tetrazolu (TTC), używane do barwienia antygeny do OA (3).

Jedną z pierwszych prac na temat wartości diagnostycznej OKAP, w porównaniu do wyników OA i OWD ocenianych łącznie, opublikował w 1969 r. Morgan (26). Autor przebadał w Anglii 6424 surowice bydłowe i uzyskał 90,4% wyników zgodnych. Rozkład wyników niezgodnych był następujący: 7% ujemnych wyników OA/OWD było dodatnich w OKAP, spośród 2,1% wątpliwych wyników OA/OWD — 0,4% było ujemnych, a 1,7% dodatnich w OKAP, natomiast 0,48% dodatnich wyników OA/OWD, było ujemnych w OKAP. W tej ostatniej kategorii wyników tylko 18 surowic (0,28%) reagowało dodatnio w OWD, zaś pozostałe surowice reagowały dodatnio tylko w OA. Jeśli przyjąć, że dodatnie wyniki OWD świadczą o brucelozie, to wymienione wyżej 0,28% surowic dodatnich w OWD i ujemnych w OKAP należałoby traktować jako sygnał niebezpieczeństwa stosowania OKAP do badań wstępnych („screening”). Odwrotnie, 7% dodatnich wyników w OKAP, przy ujemnych wynikach OA/OWD, nie stanowi niebezpieczeństwa, gdyż powtórne badanie tych surowic w odczynach klasycznych pozwoliłoby wykluczyć brucelozę. Wyniki te świadczą jednocześnie o dużej czułości OKAP i możliwości użycia go do badań wstępnych.

Wyniki uzyskane przez Morgana (26) zostały w latach następnych potwierdzone przez wielu autorów (2, 4, 5, 10, 11, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 32, 35, 42, 44, 46). Niemal wszyscy cytowani wyżej autorzy potwierdzają możliwość prowadzenia badań rozpoznawczych na brucelozę w oparciu o wstępne badania przy użyciu OKAP. Na uwagę zasługują w tych pracach stwierdzenia, że OKAP może być stosowany w miejsce pracochłonnego OWD, gdyż w obu odczynach dominującą rolę odgrywają przeciwciała IgG₁. Notowana jest także wysoka zgodność wyników OKAP i OWD (7, 23, 26, 27, 28, 35, 42). Corbel (7) uważa OKAP za odczyn bardziej swoisty niż OWD. Nicoletti (29) i Alton (2) podkreślają dużą zgodność wyników OKAP z wynikami badań bakteriologicznych.

W obszernym piśmiennictwie na temat wartości OKAP spotkać można także nieliczne głosy krytyczne (4, 32, 44). I tak, Beh (4) kwestionuje użyteczność OKAP jako metody „screeningowej”. Z jego badań wynika, że w OKAP reagują wszystkie klasy Ig, jednak ich aktywność jest obniżona przez kwaśny antygen, co zdaniem autora obniża czułość tego odczynu. O'Reilly i Cunningham (32) stwierdzili większą korelację między wynikami OKAP i OA niż między OKAP i OWD. Autorzy ci stosują w Irlandii OKAP jako odczyn dodatkowy przy weryfikowaniu nieswoistych reakcji w OA, ich zdaniem 50% wątpliwych wyników OA wypada ujemnie w OKAP. Zdaniem Sutherlanda i Crasa (44) OKAP nie wykrywa wszystkich zakażonych zwierząt. Spośród 9 zakażonych doświadczalnie brucelami jałówek, od których izolowano brucele, autorzy stwierdzili u jałówek zmienne, okresowo ujemne wyniki OKAP.

Należy podkreślić, że żaden ze znanych odczynów serologicznych nie gwarantuje 100% pewności rozpoznania zakażonych zwierząt. Badania wstępne, wykonane przy użyciu kilku próbnych serii krajowych antygenów, potwierdziły możliwość użycia OKAP w badaniach rozpoznawczych na brucelozę (47). Badania nad wartością rozpoznawczą tego odczynu są w naszej Pracowni kontynuowane.

2. Odczyn hemaglutynacji biernej (OHB)

Poza pracami autorów radzieckich i francuskich (6, 22, 36, 37, 38, 41, 43, 45) w piśmiennictwie nie notuje się większego zainteresowania tym odczynem w odniesieniu do brucelozy. Jednakże zachęcające wyniki badań cytowanych wyżej autorów sprawiły, że grono ekspertów na sympozjum w Rabacie (12) zaleciło prowadzenie badań nad wartością tego odczynu.

Głównym walorem OHB wydaje się być możliwość bardzo wczesnego wykrycia osobników zakażonych w świeżym ognisku brucelozy. Jest to możliwe dzięki dużej czułości tej metody. Renoux i wsp. (38), badając zakażone doświadczalnie brucelami 64 jałówki, stwierdzili już po dwóch dniach od zakażenia u większości, a po 7 dniach u wszystkich zwierząt, miana

OHB > 100. Miana te utrzymywały się przez dłuższy okres czasu, a szczególnie wysoki ich poziom zbiegł się z okresem wydzielania brucei z dróg rodnych oraz z ostatnim dniem ciąży (miana > 1600). Natomiast w OA i OWD jedynie u 4 z wymienionych zwierząt wystąpiły zmienne miana dopiero po tygodniu od zakażenia. Renoux (36) uzyskuje wyniki, które potwierdzają wysoką czułość i swoistość OHB w badaniach zwierząt i ludzi oraz świadczą o możliwości różnicowania w tym odczynie jersiniozy i brucelozy.

Możliwość wczesnego wykrycia brucelozy przy pomocy OHB jest szczególnie ważna na terenach wolnych od tej zoonozy, gdzie szybkie zlokalizowanie świeżego ogniska i zapobieganie rozprzestrzenianiu się brucelozy jest zadaniem podstawowym, wymagającym radykalnych metod postępowania. Z tego też względu w Pracowni Badania Brucelozy Instytutu Weterynarii podjęto ostatnio próby przystosowania OHB do wykrywania brucelozy w warunkach krajowych.

3. Testy do badania odporności typu komórkowego (OTK)

Nowym kierunkiem w diagnostyce brucelozy są próby zastosowania testów do badania OTK. Należą do nich test transformacji limfoblastycznej (TTL) i test zahamowania migracji leukocytów (TZML).

Jak wiadomo OTK jest ważnym mechanizmem organizmu na zakażenie drobnoustrojami pasożytniczymi wewnątrzkomórkowo, do których należą również brucele. Największe zainteresowanie tym kierunkiem obserwuje się w USA, przy czym badania prowadzone są głównie w oparciu o TTL oceniany metodą izotopową.

TTL charakteryzuje wysoka swoistość i czułość (19). Potwierdza to duża zgodność wyników tego testu z wynikami badań bakteriologicznych (13, 14, 18, 19, 20). Kaneene i wsp. (19) zbadali za pomocą TTL 21 sztuk bydła ujemnych w odczynach serologicznych, lecz pochodzących ze stada podejrzanego o brucelozę, w którym występowała znaczna liczba seroreagentów. U dwóch sztuk otrzymano wyniki TTL wskazujące na zakażenie brucelozą i od obu izolowano *Br. abortus* biotyp 1. Ponadto u osobników naturalnie zakażonych brucelami zawsze obserwuje się wyższy indeks stymulujący limfocytów w porównaniu z osobnikami szczepionymi S₁₉ i zdrowymi (13, 17, 18, 20.).

Wyniki badań Kaneene i wsp. (15, 17, 19, 20), wskazują na możliwość wykrycia za pomocą TTL osobników będących we wczesnej fazie zakażenia, niewykrywalnych tradycyjnymi odczynami serologicznymi. Bydło eksperymentalnie zakażone *Br. abortus*, szczep 2308, reagowało odpowiedzią typu komórkowego wykrywalną w TTL po 1–2 tygodniach od momentu zakażenia, natomiast przeciwciała wykrywalne w OA pojawiły się po upływie 3 tyg. (17).

Dotyczy to również bydła zakażonego szczepami terenowymi (20). Obok ostrej postaci brucelozy, także postać przewlekłą można ujawnić za pomocą TZML i TTL (17, 37, 40).

Stwierdzono wysoką korelację między wynikami odczynów serologicznych a wynikami TTL u osobników zakażonych, przy czym była ona wyższa w badaniach całych grup zwierząt niż u sztuk pojedynczych (13, 14, 18, 19, 29). Nie stwierdzono natomiast takiej korelacji w badaniach zwierząt szczepionych S_{19} i zdrowych (14, 18, 19, 20).

Z powodu dość skąpego jeszcze piśmiennictwa na tematy przydatności testów do badania OTK w diagnostyce brucelozy, trudno ocenić ich przydatność w tym zakresie. Zdaniem Świderskiej (cyt. za 18) i Kaneene (19) zarówno TTL, jak i TZML stosowane mogą być jako testy dodatkowe w rozpoznawaniu brucelozy ludzi i zwierząt. Szersze ich stosowanie jest ograniczone dość skomplikowaną procedurą wykonywania oraz faktem, że używana w nich pełna krew musi być wykorzystana do izolacji żywych limfocytów w ciągu 2 godzin. W USA, gdzie w dalszym ciągu stosuje się szczepionkę S_{19} , TTL używany jest do odróżniania przetrwałych mian poszczepiennych od naturalnego zakażenia (16). Nyeggers i Telegdy (31) proponują wykorzystanie TZML do wykrywania podostrej i chronicznej brucelozy u ludzi jako testu bardziej bezpiecznego, niż skórny test alergiczny.

Na zakończenie należy stwierdzić, że po uznaniu kraju za wolny od brucelozy, spośród omawianych odczynów racjonalne byłoby wprowadzenie OKAP do badań rutynowych. Pozwoliłoby to na znaczne uproszczenie i obniżenie kosztów diagnostyki tego schorzenia. Osobniki reagujące dodatnio w OKAP byłyby następnie badane w OA i OWD oraz w miarę potrzeby także w wystandaryzowanych już w kraju dodatkowych odczynach aglutynacyjnych: antyglobulinowym (OAG) i z 2-merkaptotetanolem (OME). Pozostałe testy mogłyby być wykorzystane w badaniach odwoławczych, wykonywanych w wyspecjalizowanych placówkach, dla wyjaśnienia bardziej złożonych przypadków.

Piśmiennictwo

- Allan G. S., Chappel R. J., Williamson P., McNaught D. J.: J. Hyg., Camb. 76, 287, 1976.
- Alton G. G., Maw J., Rogerson B. A., McPherson G. G.: Aust. vet. J. 51, 57, 1975.
- Anczykowski F.: Bull. Off. int. Epizoot. 53, 315, 1960.
- Beh K. J.: Res. vet. Sci. 14, 381, 1973.
- Browne E. N.: Aust. vet. J. 50, 127, 1974.
- Czernyszewa M. J., Drankowskaja E. A., Aslanjan P. G., Miesznerjakowa P. B., Waszkiewicz P. B., Karpowa G. A.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 11, 117, 1975.
- Corbel M. J.: J. Hyg., Camb. 70, 779, 1972.
- Corbel M. J.: Br. vet. J. 129, 157, 1973.
- Diaz R., Maravi-Poma E., Rivero A.: Bull. Wild Hlth Org. 53, 417, 1976.
- Gower S. G. M., Wright E. C., Davies G., Morgan W. J. B., Hopkinson W. I., Gibbs D. F., Bennet E. J.: Vet. Rec. 95, 544, 1974.
- Hunter D., Allen J.: Vet. Rec. 91, 310, 1972.
- Int. Symposium Brucellosis (II). Develop. Biol. Standard., vol. 31, s. 408, Karger, Basel, 1976.
- Kaneene J. M., Anderson R. K., Johnson D. D., Angus R. D., Muscoplat C. C., Pietz D. E., Vanderwagon L. C., Sloane E. E.: Am. J. vet. Res. 39, 1607, 1978.
- Kaneene J. M., Anderson R. K., Johnson D. W., Muscoplat C. C., Nicoletti P., Angus R. D., Pietz D. E., Klausner D. J.: J. clin. Microbiol. 1, 550, 1978.
- Kaneene J. M., Anderson R. K., Johnson D. W., Muscoplat C. C., Meyer M. E., Gibbons K., Sloane E. D.: Am. J. vet. Res. 40, 40, 1979.
- Kaneene J. M., Anderson R. K., Muscoplat C. C., Johnson D. W.: Am. J. vet. Res. 40, 999, 1979.
- Kaneene J. M., Angus R. D., Johnson D. W., Muscoplat C. C., Anderson R. K., Pietz D. E.: Can. J. comp. Med. 43, 132, 1979.
- Kaneene J. M., Johnson D. W., Anderson R. K., Angus R. D., Pietz D. E., Muscoplat C. C.: Am. J. vet. Res. 39, 585, 1978.
- Kaneene J. M., Johnson D. W., Anderson R. K., Muscoplat C. C.: J. clin. Microbiol. 8, 512, 1978.
- Kaneene J. M., Nicoletti P., Anderson R. K., Muscoplat C. C., Johnson D. W.: Am. J. vet. Res. 40, 1503, 1979.
- Leviat D.: Ann. Rech. vet. 5, 343, 1974.
- Malachowa T. I., Njazow E. D., Orlov E. S., Sadykow S. Z., Knażewa E. N., Iwanow N. P., Chairow S. G.: Trudy WGNKIWP, Moskwa, 23, 109, 1977.
- Miller J. K.: Res. vet. Sci. 12, 199, 1971.
- Miller J. K., Nettleton P. F., Robertson A. M.: Vet. Rec. 92, 492, 1973.
- Morgan W. J. B., Richards R. A.: Vet. Rec. 94, 510, 1974.
- Morgan W. J. B., MacKinnon D. J., Lawson J. R., Cullen G. A.: Vet. Rec. 85, 623, 1969.
- Myrred P. J., Fraser G. C.: Aust. vet. J. 52, 261, 1976.
- Newton F. J., Jones E., Connor R. J., Davidson B. J., McGovern P. T.: Br. vet. J. 130, 249, 1974.
- Nicoletti P.: J. Am. vet. med. Ass. 151, 1770, 1967.
- Nicoletti P.: w Int. Symposium Brucellosis (II). Develop. Biol. Standard., vol. 31, s. 131, Karger, Basel, 1976.
- Nyeggers G., Telegdy L.: Infection, 3, 213, 1975.
- O'Reilly D. J., Cunningham B.: Vet. Rec. 88, 590, 1971.
- Patterson J. M., Deyoe B. L., Stone S. S.: Am. J. vet. Res. 37, 319, 1976.
- Plackett P., Alton G. G.: Aust. vet. J. 51, 374, 1975.
- Prior M. G., Reeker W. H.: Can. J. comp. Med. 39, 107, 1975.
- Renoux M.: J. Immunol. Meth. 33, 349, 1980.
- Renoux M., Patat A., Guillaumin J. M., Renoux G.: w Int. Symposium Brucellosis (II). Develop. Biol. Standard., vol. 31, s. 145, Karger, Basel, 1976.
- Renoux M., Renoux G., Plommet M., Philippon A.: Ann. Rech. veter. 3, 5, 1972.
- Rose J. E., Roepke M. H.: Am. J. vet. Res. 18, 550, 1957.
- Rossi C. R., Kiesel G. K., Kramer T. T., Hundson R. S.: Am. J. vet. Res. 39, 1742, 1978.
- Sadykow S. Z.: Weterinarija, Moskwa, 9, 110, 1975.
- Shaw W. B.: Br. vet. J. 132, 143, 1976.
- Sofronow A. M., Dziubak A. P., Kosariwicz B. E.: Weterinarija, Moskwa, 3, 97, 1977.
- Sutherland S. S., Le Cras D. V.: Aust. vet. J. 54, 329, 1978.
- Taran I. F., Cybin B. P., Jewstajadi K. M.: Weterinarija, Moskwa, 3, 95, 1977.
- Trap D., Gaumont A. J. R.: w Int. Symposium Brucellosis (II). Develop. Biol. Standard., vol. 31, s. 136, Karger, Basel, 1976.
- Wiśniewski Z., Heleski M., Królak M., Stryszak A., Kocik T.: Badania nad przydatnością Rose Bengal Plate Test (RBPT) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. I. Produkcja i standaryzacja antygenu (w przygotowaniu do druku).
- Wood W. A., Corbel M. J.: J. Comp. Path. 83, 143, 1973.

Adres autora: lek. wet. Andrzej Stryszak, ul. Keyńska 16 m 26, 81-005 Gdynia.

AUGUSTINE P. C.: Wpływ polijonów, Ca^{++} i enzymów na przenikanie sporozoitów *Eimeria meleagridis* do komórek hodowli tkankowej. (Effect of polyions, Ca^{++} and some enzymes on penetration of cultured ceels by *Eimeria meleagridis* sporozoites). J. Parasitol. 66, 498—500, 1980 (3).

Hodowle komórek nerki indyków po ekspozycji na poly-l-histydynę, poly-l-lizynę, jony wapnia, trypsynę lub chymotrypsynę zarażono sporozoitami *Eimeria meleagridis*. Po 20 minutach po zarażeniu hodowle poddane działaniu polijonów i jonów wapnia zawierały mniejsze ilości sporozoitów w porównaniu do kontroli. Wraz ze wzrostem stężenia poly-l-histydyny lub chymotrypsyny spadała liczba sporozoitów wewnątrz komórek hodowli tkankowej. Jednakże po 2 godzinnej inkubacji zarówno w hodowlach ekspozowanych jak i w kontrolach występowały identyczne ilości wewnątrzkomórkowych sporozoitów. Poddanie hodowli tkankowej działaniu DEAE dekstranu, heparyny, siarczanu dekstranu lub trypsyny nie wpływało w istotny sposób na przenikanie sporozoitów zarówno po 20 minutowej jak i 2 godzinnej ekspozycji.

G.