

Marcin Weiner, Krzysztof Niemczuk, Monika Szymańska-Czerwińska

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

ZAGROŻENIE GORĄCZKĄ Q ORAZ BRUCELOZĄ U ZWIERZĄT I LUDZI JAKO SKUTEK WZROSTU MIĘDZYNARODOWEGO OBROTU HANDLOWEGO

Streszczenie

Gorączka Q i brucelozą stanowią istotny problem zdrowotny ludzi i zwierząt. Badania w kierunku gorączki Q wykonywano odczynem wiązania dopełniacza (OWD). W celu potwierdzenia obecności DNA *C. burnetii* w badanej próbce stosowano metodę PCR w odmianie klasycznej i w czasie rzeczywistym (real-time PCR). W diagnostyce brucelozy bydła stosowano odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP), OWD, i-ELISA oraz odczyn fluorescencji w świetle spolaryzowanym – (FPA). W odniesieniu do badań wykonanych w kierunku gorączki Q u bydła, stwierdzono od roku 2009 n=27 wyników dodatnich testem OWD, w roku 2010 liczba wyników dodatnich podwoiła się i stwierdzono n=54 wyniki dodatnie. W kolejnych latach uzyskano odpowiednio n=177 (2011), n=51 (2012) oraz n=12 (2013) wyników dodatnich. Analiza materiału genetycznego testem PCR w kierunku *C. burnetii* w badanych próbkach wykazała obecność specyficznego DNA odpowiednio w n=3 (2011) i jednej próbce (2012). Na podstawie badań serologicznych wykonanych w kierunku brucelozy bydła stwierdzono w latach 2009 i 2011 po 13 wyników dodatnich, w 2010 za serologicznie dodatnie uznano n=34 sztuki bydła. W roku 2012 liczba zwierząt serologicznie dodatnich wyniosła n=17, w roku 2013 zanotowano jedynie n=5 wyników dodatnich w odczynach serologicznych. Badania bakteriologiczne jak i badania molekularne wykonywane techniką PCR, nie wykazały obecności pałeczek *Brucella*.

Słowa kluczowe: brucelozą, gorączka Q, diagnostyka, obrót międzynarodowy

Wstęp

Gorączka Q stanowi wciąż istotny problem zdrowotny ludzi i zwierząt. Jest ona zakaźną i zaraźliwą chorobą zwierząt domowych i dzikich, stwierdzaną na wszystkich kontynentach, która przenosi się często na człowieka powodując masowe zachorowania [Gilsdorf i in. 2005]. U ludzi jest ona chorobą epidemiczną, o mało charakterystycznych objawach, często grypopodobnych, dotyczących płuc, wątroby, serca i nerek. Najczęstszymi objawami gorączki Q są: dreszcze, podwyższenie ciepłoty wewnętrznej ciała, bóle głowy i mięśni [Arricau-Bouvery i in. 2005].

Brucelozą jest chorobą zakaźną o dużym znaczeniu ekonomicznym, epizootycznym i epidemiologicznym występującą zarówno u zwierząt jak i u ludzi. Czynnikiem etiologicznym tej jednostki chorobowej są pałeczki z rodzaju *Brucella*, wśród których najistotniejsze znaczenie u zwierząt gospodarskich mają: *B. abortus* będące przyczyną brucelozy bydła, *B. suis* odpowiedzialne za brucelozę świń oraz *B. melitensis*, będące przyczyną brucelozy owiec i kóz [Corbel 1997].

W Polsce pierwsze ognisko gorączki Q zostało rozpoznane w 1956 r. w miejscowości Owczary w woj. nowosądeckim. Od tej pory notowano w kraju jeszcze kilka ognisk tej choroby, zarówno u ludzi jak i zwierząt. Większość zarejestrowanych przypadków dotyczy zwierząt (owce, bydło, kozy) lub surowców od nich pochodzących (skóry i wełna) importowanych do Polski [Niemczuk i in. 2011]. Wraz ze wzrostem międzynarodowego obrotu handlowego zwierzętami i produktami pochodzenia zwierzęcego istnieje w Polsce stałe zagrożenie wystąpienia gorączki Q. Tym bardziej, że jej endemiczne ogniska stwierdzone są u naszych sąsiadów [Dorko i in. 2010]. Warty uwagi jest fakt, że Polska, jako jeden z nielicznych krajów wprowadziła od czerwca 2010 r. program monitorowania występowania gorączki Q u przeżuwaczy, zgodnie z zasadami określonymi w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, z dnia 17 grudnia 2004 r., w sprawie określenia jednostek chorobowych, sposobu prowadzenia kontroli oraz zakresu badań kontrolnych zakażeń zwierząt (Dz. U. Nr 282 poz. 2813 z późn. zm.).

W Polsce, w latach powojennych problem brucelozy był w przeważającym stopniu ograniczony do brucelozy bydła. Odnotowano też kilka przypadków wystąpienia zakażeń wywoływanych przez *B. ovis* oraz *B. suis*. W latach 1948-1956 badano rocznie od 41 do 350 tysięcy sztuk bydła hodowanego w gospodarstwach państwowych. Odsetek reakcji serologicznych u bydła wahał się w poszczególnych latach od 7,2 do 22,8%, a liczba zakażonych zwierząt wynosiła od 1,1 do 2,1%. Z dniem 1 grudnia 1980 r. terytorium Polski zostało uznane za urzędowo wolne od brucelozy bydła. Odsetek zakażonych zwierząt wynosił wtedy mniej niż 0,5%, a zakażonych gospodarstw mniej niż 0,2%. W 2006 r. Decyzją Komisji 2006/169/WE z dnia 21 lutego 2006 r. urzędowo uznano Polskę za wolną od brucelozy (*B. melitensis*), a w 2009 r., Decyzją Komisji 2009/600/WE z dnia 5 sierpnia 2009 r. oficjalnie wolną od brucelozy bydła. W Polsce (stan na 24 czerwca 2014 r.) brucelozę znajduje się na liście chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi zwalczania, podlega zakazowi szczepień a pałeczki *Brucella* stanowią odzwierzęcy czynnik chorobotwórczy podlegający monitorowaniu, zgodnie z załącznikami Ustawy z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. 2004 nr 69 poz. 625 z późn. zm.).

Gorączkę Q wywołuje *C. burnetii*, drobnoustrój pleomorficzny, pozbawiony możliwości ruchu. Jest Gram-ujemny, ale niekiedy barwi się Gram-dodatnio. Opisano trzy formy morfologiczne *C. burnetii*: pierwszą, określaną jako większy wariant komórkowy (large cell variants – LCV) (0,4 – 1,0 μm); drugą, określaną jako mniejszy wariant komórkowy (small cell variants SCV) (0,2 – 0,4 μm) oraz mały wariant komórkowy tzw. small dense cells (SDC). Ta ostatnia forma nigdy nie występuje w postaci odrębnych komórek lecz towarzyszy wariantowi SCV, stanowiąc najprawdopodobniej jego etap pośredni (Arricau-Bouvery i in. 2005). Głównym rezerwuarem i źródłem zakażenia, zwłaszcza w ognisku przyrodniczym, jest ok. 40 gatunków kleszczy przekazujących transowarialnie zarazki z pokolenia na pokolenie. Kleszcze odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu *C. burnetii* w środowisku. Do ich zakażenia dochodzi po spożyciu krwi zakażonego ssaka, znajdującego się w okresie bakteriemii. Drobnoustroje namnażają się głównie w komórkach nabłonkowych jelita środkowego kleszcza, następnie penetrują ścianę jelita, hemocyty i tkankę łączną narządów wewnętrznych. Atakowane są komórki

hypodermalne i jajnikowe oraz pęcherzyki gruczołów ślinowych. Zakażenie u kleszczy ma zazwyczaj charakter uogólniony, a rozprzestrzenianie się zarazków odbywa się poprzez hemocyty. Raz zakażony kleszcz staje się nosicielem *C. burnetii* przez całe życie. Bakterie z rodzaju *Coxiella* po wnikięciu do organizmu fagocytowane są przez komórki żerne gospodarza, głównie makrofagi. W fagolizosomach dochodzi do ich namnażania, po czym przepełnione nimi komórki pękają, rozsiewając patogeny po całym organizmie. Najczęściej u zwierząt *Coxiella burnetii* usadawiają się w płucach, gruczole mlekowym, jądrach, węzłach chłonnych, zwłaszcza w węzłach nadwymieniowych oraz macicy i łożysku. Proces chorobowy może przenosić się również na wątrobę i układ krążenia [Bildfell i in. 2000]. Początkowo występuje, zwykle niezauważalne, nieznaczne podwyższenie ciepłoty wewnętrznej ciała, utrzymujące się przez kilka dni. Ponadto stwierdza się stan zapalny gałek ocznych, objawiający się większą ilością płynu surowiczego-śluzowego wypływającego z worka spojówkowego i nosa. Wymienione objawy ogólne nie dają jednak podstawy do podejrzenia gorączki Q. Na istnienie choroby u zwierząt wskazywać może dopiero fakt licznych zachorowań w tym samym siedlisku u ludzi, z objawami przypominającymi ostrą grypę, tak jak miało to miejsce w 2005 r. w Niemczech [Gilsdorf i in. 2008]. Częściej natomiast dochodzi do przedwczesnych porodów i poronień u zwierząt, a wówczas w łożysku, wodach płodowych lub narządach wewnętrznych poronionych płodów stwierdza się obecność *C. burnetii* [Muskens i in. 2012]. W łożysku zakażonych zwierząt można wówczas zaobserwować obrzęki oraz lokalne wylewy krwawe. Dalszy przebieg choroby zależy od stopnia zjadliwości zarazka i stanu odporności zwierząt. W przypadku nasilenia choroby dołączają się objawy w postaci zapalenia płuc, wymienia oraz stawów [Lepe i in. 1999].

Drobnoustroje z rodzaju *Brucella* są Gram-ujemnymi, nieurzęsionymi i nieruchomymi pałeczkami o wymiarach 0,4-0,8 x 0,6-3,0 μm , niewytwarzającymi przetrwalników. W preparatach mikroskopowych układają się przeważnie pojedynczo, mogą również tworzyć pary zwrócone ku sobie jak i układać się w łańcuchy lub małe skupiska. Optymalną temperaturą wzrostu drobnoustroju jest 37°C w atmosferze zawierającej 5-10% CO_2 , z wyłączeniem biotypu 5 i biotypu 6 *B. abortus* oraz *B. ovis*. Do zakażenia u zwierząt dochodzi na skutek spożycia zanieczyszczonej pałeczkami *Brucella* paszy lub wody jak również przeniesienia drobnoustroju drogą płciową podczas naturalnego krycia oraz zabiegów inseminacyjnych i ginekologicznych. Możliwe jest przeniknięcie pałeczek *Brucella* poprzez błony śluzowe, spojówki oraz rany. U bydła do zachorowania dochodzi najczęściej poprzez zjedanie łożyska po porodzie, zawierającego dużą ilość pałeczek *Brucella*. U świń, podobnie jak u bydła, do infekcji dochodzi najczęściej po spożyciu skażonej paszy, poprzez uszkodzoną skórę lub błony śluzowe. Lochy ulegają zakażeniu podczas krycia. Sam drobnoustrój jest przenoszony z gospodarstwa do gospodarstwa lub nawet z kraju do kraju głównie przez zwierzęta wolnożyjące oraz gospodarskie niewykazujące objawów chorobowych (Becker i in. 1978; Garin-Bastuji i in. 1999). U bydła zmiany chorobowe dotyczą przede wszystkim narządów rodnych, a najczęściej występującym objawem jest ronieenie, które może nastąpić w każdym okresie ciąży, przeważnie jednak ma miejsce w 3 tryestrze. W początkowym okresie ciąży, gdy płód zostaje wydalone wraz z błonami płodowymi, choroba pozostaje niezauważona. U sam-

ców pałeczki *Brucella* wywołują zapalenie jąder, najądrzy i nasieniowodów. Zapalenie jądra (najczęściej jednego) ma początkowo charakter ostry, przechodzący później w proces przewlekły. Zmianie tej towarzyszy powiększanie się masy jądra, wynikające ze zmian proliferacyjnych, tworzenie ognisk ropnych, martwicowych oraz obrzęków. Dochodzi także do zgrubienia powrózka nasiennego i obrzęku najądrzy. W tym czasie zwierzę regularnie wydala pałeczki *Brucella* wraz z nasieniem, prowadząc do rozprzestrzeniania choroby. U samic, gdy infekcja dotyczy jedynie węzłów chłonnych zlokalizowanych w obrębie wymienia, następuje wydalanie pałeczek *Brucella* z mlekiem. Charakterystyczne dla brucelozy jest również zapalenie stawów kończyn, przede wszystkim kolanowych i nadgarstkowych a także pochewek ścięgniętych i kaletki maziowych, powodujące kulawizny. Ponadto pałeczki *Brucella* cechują się osteotropizmem, prowadzącym do umiejscowienia się procesu chorobowego w kościach kończyn oraz kręgosłupie, co powoduje, oprócz wspomnianych wyżej kulawizn, także porażenia i obrzęki. Najbardziej narażone na zakażenie pałeczkami *Brucella* są osoby mające bezpośredni kontakt z chorymi zwierzętami (lekarze i technicy weterynarii, obsługa zwierząt). Do zachorowań dochodzi najczęściej po kontakcie z zakażonym łożyskiem, poronionymi płodami, wydzielinami z dróg rodnych, przy wykonywaniu zabiegów ginekologiczno-położniczych. Na zakażenie narażeni są też pracownicy laboratoriów diagnostycznych, zajmujący się izolacją i identyfikacją pałeczek *Brucella*. Do zachorowania dochodzi także po spożyciu mleka i przetworów mlecznych niepoddanych obróbce termicznej, co głównie ma miejsce w krajach basenu Morza Śródziemnego i dotyczy pałeczek *B. melitensis*.

Materiał i metody badań

Badanie mikrometodą OWD w kierunku gorączki Q wykonano zgodnie z Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Manual OIE 2012]. Za miano graniczne przyjęto rozcieńczenie surowicy - 1:10. Przed każdym badaniem przeprowadzono kontrolę wewnątrzlaboratoryjną. Wykonano mianowanie antygeny wobec surowicy kontrolnej pozytywnej oraz sprawdzono aktywność pozostałych reagentów użytych w odczynie, celem stwierdzenia ich zgodności z deklaracją producentów. Próbkami badanych surowic, w których wystąpiła pełna hemoliza interpretowane były jako ujemne, tzn. nie zawierające przeciwciał anti-*C. burnetii*. Próbkami, w przypadku których stwierdzono zahamowanie hemolizy oceniane na co najmniej (++) w rozcieńczeniu surowicy 1/10, interpretowane były jako dodatnie. Badania wykonano z wykorzystaniem dwóch antygenów specyficznych dla fazy I i II antygeny *C. burnetii*. Izolację DNA z badanego materiału biologicznego przeprowadzano przy zastosowaniu komercyjnego zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), zgodnie z rekomendacją producenta. Wyizolowany DNA wykorzystywano do badań porównawczych metodą real-time PCR i PCR. Reakcję real-time PCR przeprowadzono w aparacie 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), z wykorzystaniem pary starterów: CoXbS (5' GTA GCC CGA TAA GCA TCA AC 3') oraz CoxAs (5' GCA TTC GTA TAT CCG GCA TC 3') komplementarnych dla fragmentu DNA specyficznego dla *C. burnetii* (IS1111). Mieszaninę reakcyjną o objętości 20 µl stanowiło: 2,5 µl 10 x stężonego buforu PCR; 2,0 µl 50 mM MgCl₂; 2,0 µl 10 mM dNTPs; 2,0 µl każdego

ze starterów o koncentracji 10 pmoli; 0,75 µl 10 µmoli sondy (CoxP: FAM-TCA TCA AGG CAC CAA TGG TGG CCA-TAMRA); 8,5 µl wody wolnej od DNAzy i RNAzy oraz 0,25 µl Taq polimerazy (5U/µl), do której dodawano 5 µl matrycy DNA. Po procesie wstępnej denaturacji w temp. 94°C przez 2 min. reakcja real-time PCR obejmowała 45 następujących po sobie cykli, z których każdy składał się z następujących etapów: denaturacja nici DNA w temp. 94°C przez 15 sek. oraz przyłączanie starterów i wydłużanie nici DNA w temp. 60°C przez 30 sek. Pomiar fluorescencji mieszaniny reakcyjnej wykonywano w czasie rzeczywistym na etapie wydłużania nici komplementarnych do matrycy DNA. Kontrolę dodatnią DNA zarówno w przypadku PCR jak i real-time PCR stanowił certyfikowany materiał odniesienia (Genekam), natomiast kontrolą ujemną była mieszanina reakcyjna zawierająca wodę wolną od DNAzy i RNAzy w miejsce badanej próbki DNA. Ponadto, dla każdej reakcji real-time PCR i PCR przeprowadzano kontrolę ekstrakcji DNA (w miejsce badanego materiału w procesie ekstrakcji dodawano wodę redestylowaną). Reakcję PCR przeprowadzano z wykorzystaniem starterów CoxP4 (5' TTA AGG TGG GCT GCG TGG TGA TGG 3') oraz CoxM9 (5' GCT TCG TCC CGG TTC AAC AAT TCG 3') specyficznych dla *C. burnetii*, umożliwiających amplifikację fragmentu o długości 448 pz. Mieszaninę reakcyjną o objętości 48µl stanowiło: 5 µl 10 x stężonego buforu PCR; 2,0 µl 50 mM MgCl₂; 1,0 µl 10 mM dNTPs; 1,25 µl każdego ze starterów o koncentracji 20 pmoli; 37,40 µl wody wolnej od DNAzy i RNAzy oraz 0,1 µl Taq polimerazy (5U/µl); do której dodawano 2 µl matrycy DNA. Reakcja PCR obejmowała 40 cykli, na które składały się: denaturacja wstępna (96°C, 60 sek.); denaturacja (96°C, 60 sek.); przyłączanie starterów (65°C, 60 sek.); wydłużanie łańcucha (72°C, 60 sek.); końcowe wydłużanie łańcucha (72°C, 60 sek.). Rozdział produktów amplifikacji przeprowadzono w aparacie do elektroforezy (Bio-Rad), w 1 % żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny, w czasie 35 min., przy stałym napięciu 150 V. Wielkość produktu amplifikacji oceniano porównując go do markera masy molekularnej (Fermentas).

Testy stosowane w laboratoryjnej diagnostyce brucelozy wymienione zostały zarówno w Aneksie C do Dyrektywy 64/432/EWG jak również w wytycznych OIE (Manual OIE, 2012). OIE zaleca w diagnostyce brucelozy bydła użycie zbuforowanych testów z antygenem brucelozowym (ang. Buffered Brucella Antigen Test, BBAT), którego odmianą jest odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) (ang. Rose Bangal Test, RBT). Ponadto zalecane są odczyn wiązania dopełniacza - OWD (ang. Complement Fixation Test, CFT), i-ELISA i odczyn fluorescencji w świetle spolaryzowanym - FPA (ang. Fluorescence Polarisation Assay). Z drugiej strony Unia Europejska w Aneksie C do Dyrektywy 64/432/EWG wymienia BBAT, OWD, i-ELISA, FPA, próbę pierścieniową z mlekiem oraz niewymieniany w Manual OIE (2012) odczyn aglutynacji probówkowej - OA (ang. Serum Agglutination Test, SAT). Wykonanie odczynów serologicznych oraz interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z wytycznymi OIE (Manual OIE, 2012). Odczyn OME wykonywano wg instrukcji opracowanej przez Królaka i Stryzaka (1979), natomiast OAG wg Wiśniowskiego i wsp. (1978).

Próbki materiału biologicznego poddawano badaniu bakteriologicznemu w kierunku izolacji pałeczek *Brucella*. W tym celu materiał pochodzący od bydła inkubowano na podłożu stałym (SDA-SS) oraz płynnym SDB za-

wierającym suplement selektywny (SDB-SS) w temp. 37°C w atmosferze z dodatkiem CO₂. Co najmniej jeden raz w tygodniu przesiewano z SDB-SS na SDA-SS i obserwowano w kierunku wzrostu pałeczek *Brucella*. Przesiewy z pożywki płynnej na stałą wykonywano przez 6 tygodni. Natomiast w przypadku materiału pochodzącego od świń, posiew wykonywano bezpośrednio na pożywkę stałą (SDA-SS) i obserwowano w ciągu około 7-14 dni. W przypadku stwierdzenia obecności typowych kolonii dla rodzaju *Brucella*, wykonywano test aglutynacji szkiełkowej z surowicami anty-*Brucella* oraz test na oksydazę. Następnie wykonywano preparat mikroskopowy, który barwiono metodą Grama, sprawdzano aglutynację z surowicami monowalentnymi anty-A i anty-M, jak również wytwarzanie katalazy, oceniano wzrost w atmosferze zawierającej CO₂, wytwarzanie siarkowodoru i ureazy, wzrost na pożywce zawierającej fuksynę zasadową i tioninę oraz wrażliwość na bakteriofagi. Na tej podstawie dokonywano oceny przynależności gatunkowej oraz przeprowadzano biotypowanie badanego izolatu.

Wyniki badań i omówienie

Rozpoznawanie gorączki Q na podstawie objawów klinicznych lub obrazu sekcyjnego jest bardzo trudne i praktycznie niemożliwe. Zwłaszcza, że objawy kliniczne u zwierząt zakażonych *C. burnetii* nie występują zbyt często. W celu zdiagnozowania choroby niezbędne jest wykonanie właściwych badań laboratoryjnych. Potwierdzenie lub wykluczenie obecności przeciwciał anty-*C. burnetii* w stadzie możliwe jest poprzez przeprowadzenie badań serologicznych. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals wydanym przez OIE, aktualnie obowiązującą i akceptowaną metodą diagnostyki serologicznej gorączki Q, szczególnie obrotu międzynarodowym zwierząt, jest odczyn wiązania dopełniacza (OWD). Do metod alternatywnych, stosowanych w diagnostyce tej choroby, zalicza się metodę ELISA oraz test immunofluorescencji pośredniej (IFA), rzadziej natomiast aglutynację w rurkach kapilarnych, odczyn neutralizacji toksyn czy precypitację w żelu agarozowym [Russet i in. 2007]. Metody ELISA i IFA wykazują większą czułość w porównaniu do OWDw przypadku ostrej fazy choroby, kiedy dominują przeciwciała klasy IgM, ale charakteryzują się znacznie mniejszą czułością w przypadku występowania postaci chronicznej (np. u roniących krów), w czasie której stwierdza się przeciwciała klasy IgG [Sidi-Boumedine i in. 2010]. Dużym problemem w interpretacji wyników badań serologicznych stanowią reakcje krzyżowe, które występują pomiędzy *C. burnetii*, *Bartonella quintana*, *Legionella pneumophila* i *Legionella micdadei* [Dyer i in. 1988]. Niektóre zakażone zwierzęta mogą być seropozytywne, ale nie są siewcami *C. burnetii*. Notowane są także przypadki, gdy zwierzę jest seronegatywne, ale jest siewcą tego drobnoustroju. Szybką i czułą techniką wykrywania siewców *C. burnetii* jest metoda PCR w odmianie klasycznej i w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Techniki te umożliwiają potwierdzenie obecności DNA patogenu w badanej próbce. Materiał do badań hodowlanych oraz molekularnych stanowić mogą: wycinki z narządów wewnętrznych poronionych płodów, fragmenty łożyska, wymazy z dróg rodnych, nasienie, krew pełna lub wycinki z narządów wewnętrznych pobrane w czasie sekcji zwierzęcia. Należy podkreślić, że w przypadku bada-

nia materiału biologicznego metodami molekularnymi, kiedy liczba komórek bakteryjnych w badanej próbce jest niewielka, należy zastosować technikę real-time PCR, która charakteryzuje się wyższą czułością w porównaniu do klasycznej jednostopniowej reakcji PCR [Niemczuk i in. 2011]. Metoda PCR i real-time PCR są w stanie potwierdzić obecność sekwencji DNA specyficznej dla patogenu, ale nie rozróżniają, czy pochodzi z żywych czy martwych komórek bakteryjnych. Możliwe jest to dopiero po zastosowaniu metody hodowlanej z wykorzystaniem linii komórkowych oraz próby biologicznej na zarodkach kurzych. Należy jednak podkreślić, że techniki te są skomplikowane i bardzo czasochłonne, ponadto wymagają specjalistycznych, izolowanych pomieszczeń III klasy bezpieczeństwa mikrobiologicznego oraz personelu o potwierdzonych kompetencjach [Arricau-Bouvery i in. 2005]. Dlatego też wykonywane są najczęściej w krajowych laboratoriach referencyjnych, a w celach diagnostycznych stosuje się je tylko wtedy, gdy metody serologiczne i molekularne dają niezadawalające wyniki.

W odniesieniu do badań wykonanych w kierunku gorączki Q u bydła, stwierdzono od roku 2009 n=27 wyników dodatnich testem OWD, w roku 2010 liczba wyników dodatnich podwoiła się i stwierdzono n=54 wyniki dodatnie. W kolejnych latach uzyskano odpowiednio n=177 (2011), n=51 (2012) oraz n=12 (2013) wyników dodatnich. Analiza materiału genetycznego testem PCR w kierunku *C. burnetii* w badanych próbkach wykazała obecność specyficznego DNA odpowiednio w n=3 (2011) i jednej próbce (2012).

Podstawowa diagnostyka brucelozy opiera się na badaniach serologicznych, jednak ze względu na ich pośredni charakter, istnieje ryzyko wystąpienia zarówno wyników fałszywie ujemnych jak i fałszywie dodatnich. Polska uznana jest za kraj urzędowo wolny od brucelozy bydła oraz brucelozy owiec i kóz. Ostatni przypadek izolacji *B. abortus* w Polsce miał miejsce przed 1980 r., *B. melitensis* nie izolowano nigdy, a przypadki brucelozy u świń w Polsce miały miejsce w 1994 r. (woj. opolskie) i w 1999 r. (woj. kujawsko-pomorskie). Nasz kraj wciąż zobligowany jest do prowadzenia badań monitorujących zakażenia pałeczkami *Brucella* u bydła oraz, w mniejszym zakresie, owiec i kóz. W pewnych sytuacjach (obróć zwierzętami, pozyskiwanie nasienia) badania są prowadzone także w odniesieniu do świń oraz innych gatunków zwierząt. Z tego tytułu wciąż zdarzają się dodatnie wyniki badań serologicznych. W przypadku bydła KLRB dokonuje kilkuset potwierdzających badań rocznie w celu wykrycia swoistych przeciwciał anty-*Brucella*, a w przypadku dodatnich wyników serologicznych, prowadzone są badania w kierunku obecności pałeczek *Brucella* w badanym materiale. Najpoważniejszym ograniczeniem stosowania metod serologicznych oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników są reakcje krzyżowe na tle zakażeń *Y. enterocolitica* O:9 oraz *E. coli* O157:H7 [Hilbink i in. 1995; Jungensen i in. 2006]. Mając na względzie niedoskonałość metod serologicznych, już wiele lat wcześniej Szulowski i wsp. (2001) zaproponowali przyjęcie kryteriów pozwalających, w pewnym zakresie, na odróżnienie rzeczywistych zakażeń od reakcji krzyżowych w serologicznej diagnostyce brucelozy u świń. Do tych kryteriów należy zaliczyć konieczność badania surowic zwierząt po upływie 30 dni, ocenę odpowiedzi immunologicznej innych zwierząt w stadzie, wartości mian przeciwciał w OA i OWD, obecność przeciwciał niepodających się inaktywacji 2-merkaptoetanolem oraz charakter utrzymywania

się przeciwiał anty-*Brucella*. Same wyniki badań serologicznych, pomimo świadomości istnienia powyższych kryteriów, mogą być trudne do zinterpretowania. Pełne potwierdzenie zakażenia możliwe jest jedynie w przypadku wyizolowania w badaniu bakteriologicznym pałeczek *Brucella*.

Coraz częstsze zastosowanie w diagnostyce brucelozy znajdują testy PCR, pozwalające na zidentyfikowanie rodzaju *Brucella*, jak również poszczególnych gatunków tych pałeczek oraz umożliwiające ocenę pokrewieństwa izolatów (Fekete i in. 1990). Biorąc pod uwagę zalety techniki PCR, do których należy wysoka specyficzność, często przewyższająca metody hodowlane, należy wspomnieć o ograniczeniach jakie niosą za sobą testy PCR, wynikające z ryzyka uzyskiwania zarówno wyników fałszywie ujemnych jak i fałszywie dodatnich. Te pierwsze wynikają przede wszystkim z obecności inhibitorów polimeraz, które zawarte są w próbkach pochodzenia tkankowego. Wykazano, że zarówno żelazo (hem), sole żółci, albuminy, białka mleka oraz jony magnezu mogą działać hamująco na aktywność łańcuchowej polimerazy. Na poprawność przeprowadzenia PCR wpływa także ilość użytego DNA. Paradoksalnie, zbyt duża ilość może generować wyniki fałszywie ujemne. Z kolei wyniki fałszywie dodatnie, obserwowane co prawda znacznie rzadziej, wynikają z obecności u innych niż poszukiwane drobnoustroje genów, których sekwencje odpowiadają sekwencji przyłączanych starterów. Może to spowodować powstanie niespecyficznego amplikonów o wielkości różnej od spodziewanego produktu reakcji PCR. Z drugiej strony znacznie trudniejszym do wykrycia jest produkt niespecyficzny, odpowiadający wielkością poszukiwanemu amplikonowi [Fredriksson-Ahomaa i in. 2001].

Na podstawie badań serologicznych wykonanych w kierunku brucelozy bydła stwierdzono w latach 2009 i 2011 po 13 wyników dodatnich, w 2010 za serologicznie dodatnie uznano n=34 sztuki bydła. W roku 2012 liczba zwierząt serologicznie dodatnich wyniosła n=17, w roku 2013 zanotowano jedynie n=5 wyników dodatnich w odczynach serologicznych. Badania bakteriologiczne jak i badania molekularne wykonywane techniką PCR, nie wykazały obecności pałeczek *Brucella* w badanych próbkach jak i materiału genetycznego pochodzącego od tych drobnoustrojów. Rozbieżności pomiędzy wynikami dodatnimi w odczynach serologicznych a małą liczbą wyników dodatnich w badaniach PCR (gorączka Q) oraz ich braku (bruceloza) wynikać może przede wszystkim ze zjawiska reakcji krzyżowych w odczynach serologicznych, pomiędzy drobnoustrojami wykazującymi podobną budowę antygenową, np. *C. burnetii* i *Bartonella quintana* lub *Legionella pneumophila* oraz *Brucella* spp. a *Yersinia enterocolitica* O:9 lub *Escherichia coli* O157.

Podsumowanie

Zakażenia wywoływane przez *C. burnetii* oraz pałeczki *Brucella* mają często asymptotyczny charakter a zjawisko reakcji krzyżowych powoduje spore trudności diagnostyczne. Z drugiej strony dane dotyczące stwierdzenia ognisk gorączki Q i brucelozy w Europie i ryzyko ich przeniesienia do Polski w związku ze wzrostem międzynarodowego obrotu handlowego samymi zwierzętami jak i uzyskiwanymi od nich produktami, zwracają uwagę na fakt, iż jest to problem bardzo aktualny.

Piśmiennictwo

1. Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2005: Is Q fever an emerging or reemerging zoonosis? *Vet. Res.* 36: 327-349.
2. Becker H.N., Belden R.C., Breault T., Burr ridge M.J., Frankenberger W., Nicoletti P., 1978: Brucellosis in feral swine in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173: 1181-1182.
3. Bildfell R. J., 2000: *C. burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12: 419-421.
4. Corbel M.J., 1997: Brucellosis: an Overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 213-221.
5. Dorko E., Pilipčinec E., Rimárova K., Kostovčíková J., 2010: Serological study of Q fever in sheep in the territory of Eastern Slovakia. *Ann. Agri. Environ. Med.*, 17: 323-325.
6. Dyer D. E., Gibbson V. L., Brady L. M., Cunningham A. L., 1988: Serological reaction to *Legionella pneumophila* group 4 in a patient with Q fever. *J. Infect. Dis.*, 158: 499-500.
7. Fekete A., Bantle J.A., Halling S.M., Sanborn M.R., 1990: Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 216-227.
8. Fredriksson-Ahomaa M., Bucher M., Hank C., Stolle A., Korkeala H., 2001: High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in Southern Germany: a slaughtering technique problem. *System. Appl. Microbiol.*, 24: 457-463.
9. Garin-Bastuji B., Hummel N., Gerbier G., Cau C., Pouillot R., Da Costa M., Fontaine J.J., 1999: Nonspecific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Microbiol.*, 66: 223-233.
10. Gilsdorf A., Kroh C., Grimm S., Jensen E., Wagner-Wening C., Alpers K., 2005: Large Q fever outbreaks due to sheep farming near residential areas, Germany. *Epidemiol. Infect.*, 136: 1084-1087.
11. Hilbink F., Fenwick S.G., Thompson E.J., Kittelberger R., Penrose M., Ross G.P., 1995: Non-specific seroreactions against *Brucella abortus* in ruminants in New Zealand and the presence of *Yersinia enterocolitica* O:9. *N. Z. Vet. J.*, 43: 175-178.
12. Jungersen G., Sorensen V., Giese B., Stack J.A., Riber U., 2006: Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 after natural or experimental infection in pigs. *Epidemiol. Infect.*, 34: 347-357.
13. Królak M., Stryszak M., 1997: Standardowa technika odczynu z 2-merkaptotanołem (OME) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt. Instytut Weterynaryjny, Puławy.
14. Lepe J.A., Guerra F.J., Del Castillo E., 1999: The epidemiology of Q fever in the northern area of Huelva, Spain. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, 17: 65-68.
15. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE, Paris, 2012.
16. Muskens J., Engelen E., Maanen C., Bartels C., Lam T. J. G. M. 2011: Prevalence of *C. burnetii* infection in Dutch dairy herds on the testing bulk tank

- milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet. Rec.* 168: 79-82.
17. Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M., Zarzecka A., Konarska H. 2011: Q fever in a cattle herd and humans in the south-eastern Poland. Laboratory diagnosis of the disease using serological and molecular methods. *Bull. Vet. Inst. Puławy*, 55: 593-598.
 18. Rousset E., Durand B., Berri M., Dufrou P., Prigent M., Russo P., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A., Aubert M. 2007: Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.*, 124: 286-297.
 19. Sidi-Boumedine K., Rousset E., Henning K., Ziller M, Niemczuk K, Roest H.I.J., Thiéry R. 2010: Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q fever in animals in the European Union, 1-48.
 20. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J. 2001: Porcine brucellosis In Poland: problems accompanying serological surveys conducted in 1995-2000. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 45: 153-161.
 21. Wiśniowski J., Królak M., Drożdżyńska M. 1978: Standardowa technika odczynu antyglobulinowego (OAG) w rozpoznawaniu brucelozy bydła. Instytut Weterynarii, Puławy.