

## Diagnosis and epidemiological situation of swine brucellosis in Poland

Szulowski K., Iwaniak W., Weiner M., Złotnicka J., Szymajda M., Zaręba Z., Czepińska H.,  
Department of Microbiology, National Veterinary  
Research Institute, Pulawy

The aim of this paper was to present current data on diagnosis and epidemiological situation of swine brucellosis in Poland. The diagnosis is primarily based on serological examination using rose Bengal test and ELISA. Also complement fixation test, serum agglutination test and 2-mercaptoethanol test are utilized. The last outbreak of swine brucellosis in native swine population took place in Poland in 1999. However, brucellosis in the imported boars caused by *Brucella suis* biovar 2 was confirmed in 2008. There is also a problem of false positive serological reactions, usually in the imported pigs. Authors present general approaches to the serological monitoring of swine brucellosis in Poland.

**Keywords:** monitoring, serological examinations, cross reactions.

Brucelozą to groźna zoonoza wywołana przez bakterie rodzaju *Brucella* mająca duże znaczenie ekonomiczne i epidemiologiczne. Spośród 6 podstawowych gatunków bruceli: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* i *B. suis*, ten ostatni jest głównym czynnikiem przyczynowym brucelozy świń. Gatunek *B. suis* obejmuje 5 biotypów, z których brucelozę u świń wywołują biotypy 1, 2 i 3. W Europie, od Skandynawii po Bałkany, występuje niemal wyłącznie biotyp 2 *B. suis* (1). Na przestrzeni ostatnich lat stwierdzono, że w Polsce rezerwuarem tego zarazka są zające i dziki (2, 3, 4).

Podobnie jak u innych gatunków zwierząt domowych, najważniejszym objawem brucelozy u świń jest ronienie (1, 5, 6). Występuje ono w dowolnym okresie ciąży i obejmuje duży (nawet do 80%) odsetek macior w stadzie. Niekiedy jedynym objawem choroby jest okresowa lub stała bezpłodność loch i knurów. Pałeczki *B. suis* cechuje też osteotropizm, przez co

## Diagnostyka i sytuacja epidemiologiczna brucelozy świń w Polsce

Krzysztof Szulowski, Wojciech Iwaniak, Marcin Weiner, Jolanta Złotnicka,  
Monika Szymajda, Zofia Zaręba, Hanna Czepińska

z Zakładu Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

często proces chorobowy umiejscawia się w kościach, a następnie stawach kończyn i kręgosłupa, prowadząc do kulawizn, porażen ządu i obrzęków. Rzadziej dochodzi do zapalenia macicy i powstawania ropni w różnych okolicach ciała. U knurów charakterystyczne dla tej choroby jest zapalenie jąder, zwykle jednostronne, prowadzące do obniżenia lub całkowitej utraty zdolności rozplodowych. U świń często zdarza się bezobjawowy przebieg brucelozy.

Zakażenie świń następuje najczęściej drogą pokarmową. Źródłem zakażenia mogą być też chore knury przenoszące zarazki z nasieniem. Prosięta mogą zarażać się od loch.

Biotypy 1 i 3 *B. suis* są bardzo patogenne dla ludzi. Najczęściej narażone na zakażenie są osoby bezpośrednio kontaktujące się z chorymi zwierzętami, zwłaszcza w okresie porodów lub ronień, oraz osoby pracujące w laboratoriach zajmujące się izolacją i hodowlą tych drobnoustrojów. *Brucella suis* biotyp 2 jest uważany za mało chorobotwórczy dla ludzi. Stwierdzono jednak przypadki zakażenia człowieka spowodowane przez ten zarazek (7, 8).

Diagnostyka brucelozy świń, podobnie jak to ma miejsce w przypadku bydła, opiera się przede wszystkim na badaniach serologicznych. Polegają one na stwierdzeniu obecności specyficznych przeciwciał w organizmie zwierzęcia indukowanych przez drobnoustroje *Brucella*. Testy, które powinny być używane w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej poszczególnych krajów określa Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt – OIE (9). Podręcznik OIE, w przypadku świń, jako testy zalecane do stosowania w diagnostyce brucelozy

wymienia zbuforowane testy z antygenem brucelozowym (BBAT), których odmianą jest stosowany w Polsce odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP), odczyn wiązania dopełniacza (OWD), test ELISA i odczyn fluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPA). Brak takich oficjalnych wskazań nakreślonych przez Unię Europejską. Do 1997 r. w dyrektywie Rady 64/432/EEC o problemach zdrowia zwierząt w handlu bydłem i trzodą wewnątrz Wspólnoty, analogicznie jak w stosunku do bydła, istniały zapisy mówiące o tym, jakie warunki powinny spełniać świnię, jeśli chodzi o brucelozę, ale dyrektywa 97/12/EEC zniósła te wymogi.

W Polsce, w przypadku świń, w trudnych do zdiagnozowania przypadkach, w celu wyjaśnienia statusu zwierzęcia Krajowe Laboratorium Referencyjne Brucelozy (KLRB) w Zakładzie Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach może także wykonać badania przy użyciu odczynu aglutynacji próbówkowej (OA) i odczynu z 2-merkaptopetanolom (OME).

Analogicznie jak w przypadku bydła, materiał od zwierząt, których surowice oceniono jako reagujące dodatnio w badaniach serologicznych, poddany zostaje każdorazowo w Krajowym Laboratorium Referencyjnym Brucelozy badaniu bakteriologicznemu w kierunku izolacji i identyfikacji drobnoustrojów *Brucella* (5, 10). Posiewów materiału dokonuje się na podłożu stałym – agarze z glukozą i surowicą oraz dodatkiem selektywnym (SDA+SS). Identyfikacji bruceli dokonuje się poprzez wykonanie szeregu testów: aglutynacji szkiełkowej z surowicą anti-*Brucella*, aglutynacji szkiełkowej z surowicami monowalentnymi anti-A i anti-M, z akryflawiną, na katalazę, na zapotrzebowanie CO<sub>2</sub> do wzrostu, na ureazę, na siarkowodór, na wzrost *Brucella* w obecności barwników – fuksyny zasadowej i tioniny, barwienia metodą Grama, barwienia metodą Ziehl-Neelsena, testu bakteriolizy przez bakteriofagi. Krajowe Laboratorium Referencyjne Brucelozy stosuje również dodatkowo w celu identyfikacji drobnoustrojów *Brucella* metody biologii molekularnej oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

**Tabela 1.** Wyniki badań świń w kierunku brucelozy w Krajowym Laboratorium Referencyjnym Brucelozy w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach

Rok	Liczba badanych próbek surowic	Liczba próbek dodatnich (OKAP)	Procent próbek dodatnich
2006	25 281	30	0,12
2007	37 809	7	0,02
2008	14 452	32	0,22
2009	12 365	137	1,11
2010	5824	59	1,01

Objaśnienie: OKAP – odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej

W Polsce, podobnie jak w innych krajach UE, nie prowadzi się badań monitoringowych świń w kierunku brucelozy. Takie badania były prowadzone przez kilka lat od 1995 r. Obecnie badania obejmują przede wszystkim knury wykorzystywane w centrach pozyskiwania nasienia i punktach kopulacyjnych, a także zwierzęta sprowadzane z zagranicy lub eksportowane. Jeśli chodzi o nasze rodzime pogłowie świń, w ostatnich latach nie stwierdzono przypadków brucelozy, ani nie obserwowano większych problemów diagnostycznych. Ostatnie przypadki brucelozy dotyczące naszego pogłowia miały miejsce w 1994 r. (woj. opolskie) i 1999 r. (woj. kujawsko-pomorskie). Jak wynika z tabeli 1, przedstawiającej wyniki badań świń w kierunku brucelozy, jedyny problem stanowił pojawiający się, zróżnicowany z roku na rok, niewielki odsetek próbek surowic reagujących dodatnio w OKAP. Wszystkie te przypadki były

jednak bez kłopotu wyjaśniane poprzez zastosowanie bardziej specyficznej metody, jakim jest w przypadku świń test ELISA, w którym surowice te dały wyniki ujemne. Problemy, jeśli występowały, dotyczyły natomiast świń importowanych z niektórych krajów UE. W 2008 r. sprowadzono w celach hodowlanych do Polski z Hiszpanii partię 23 knurów, które poddano kwarantannie i w trakcie jej trwania wykonano badania serologiczne w kierunku brucelozy. Wyniki badań wykonanych przy użyciu OKAP, OWD, OA, OME i ELISA wskazały na obecność przeciwciał anti-*Brucella* w surowicach 8 zwierząt, a w badaniu ponownym wykonanym po upływie 3 tygodni dodatkowo jeszcze u jednego zwierzęcia (tab. 2).

Charakterystyka zaobserwowanych reakcji była typowa dla zakażenia świń pałeczkami *Brucella*: u sztuk dodatnich stwierdzono wysokie miana przeciwciał

w OA i OWD, wysokie wartości absorbancji prób dodatnich w ELISA, znacznie przekraczające wartości graniczne (tzw. cut off), stwierdzono obecność przeciwciał niepoddających się inaktywacji 2-merkaptanołem (dodatnie wyniki w OME), a także nieprzemijający charakter przeciwciał anti-*Brucella* (odpowiedź serologiczna stała, utrzymująca się długo na wysokim poziomie). Wszystkie zwierzęta poddano eutanazji, pobrano materiał z narządów (jądra z najądrzami, węzły chłonne, wątroba, śledziona) i wykonano badania bakteriologiczne. W efekcie od 7 zwierząt izolowano pałeczki *Brucella suis* biotyp 2.

W 2009 r. w Krajowym Laboratorium Referencyjnym Brucelozy badano próbki surowicy od 21 knurów importowanych z Niemiec. Obraz badania serologicznego również wskazywał na podejrzenie zakażenia zwierząt pałeczkami *Brucella* (tab. 3). Zaobserwowano dodatnie reakcje

**Tabela 2.** Wyniki badań knurów zakażonych pałeczkami *B. suis* biotyp 2 na obecność przeciwciał anti-*Brucella*

Nr zwierzęcia*	I badanie					II badanie				
	OKAP	OA (jm/ml**)	OWD (mjpwd/ml***)	OME (miano)	ELISA	OKAP	OA (jm/ml**)	OWD (mjpwd/ml***)	OME (miano)	ELISA
1	+	+(574,5)	+(320)	1/320	+	+	+(410,5)	+(640)	1/320	+
2	+	+(164)	+(160)	4/80	+	+	+(256)	+(744)	2/160	+
3	+	+(492,5)	+(848)	2/320	+	+	+(656,5)	+(1696)	4/320	+
4	+	61,5	-(8,4)	2/40	+	+	492,5	+(320)	1/320	+
5	-	-	-	-	-	+	+(287)	+(40)	2/40	+
6	-	+(61,5)	+(106)	-	+	-	-(15,5)	+(93)	-	+
7	+	+(61,5)	+(46,5)	1/10	+	+	+(82)	+(93)	4/20	+
8	+	+(492,5)	+(1696)	2/320	+					
9	+	+(205)	+(186)	1/160	+					Nie badano

\* liczba knurów ogółem wynosiła 23 sztuki, \*\* międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml, \*\*\* międzynarodowe jednostki aglutynacyjne w 1 ml  
Objaśnienia: OKAP – odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej, OA – odczyn aglutynacji, OWD – odczyn wiązania dopełniacza, OME – odczyn z 2-merkaptanołem, ELISA – test immunoenzymatyczny

**Tabela 3.** Wyniki badań knurów podejrzanych o zakażenie na obecność przeciwciał anti-*Brucella*

Nr zwierzęcia*	I badanie					II badanie				
	OKAP	OA (jm/ml**)	OWD (mjpwd/ml***)	OME (miano)	ELISA	OKAP	OA (jm/ml**)	OWD (mjpwd/ml***)	OME (miano)	ELISA
1	+	2/80 (123)	4/10 (53)	1/40	+	+	3/40 (72)	4/5 (26,5)	4/20	+
2	+	2/80 (123)	4/80 (53)	4/80	+	+	4/80 (164)	1/40 (134)	4/40	+
3	+	4/40 (82)	2/5 (20)	2/20	+	+	2/40 (41,5)	-	3/10	+
4	+	2/160 (246)	2/5 (20)	2/10	+	-	1/20 (25,5)	-	-	-
5	+	2/320 (492,5)	4/10 (53)	3/10	+	+	3/40 (72)	4/2,5 (13,3)	2/10	+
6	+	4/40 (82)	4/20 (106)	4/40	+	+	1/80 (102,5)	4/5 (26,5)	2/40	+
7	+	2/160 (246)	4/10 (53)	1/40	+	+	1/40 (51,5)	2/5 (20)	2/10	+
8	+	2/80 (123)	4/5 (26,5)	1/20	+	-	-	-	-	-
9	+	2/80 (123)	4/5 (26,5)	-	+	-	-	-	-	-

\* liczba knurów ogółem wynosiła 21 sztuki, \*\* międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml, \*\*\* międzynarodowe jednostki aglutynacyjne w 1 ml  
Objaśnienia: OKAP – odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej, OA – odczyn aglutynacji, OWD – odczyn wiązania dopełniacza, OME – odczyn z 2-merkaptanołem, ELISA – test immunoenzymatyczny

zarówno w OKAP, jak i OWD, OA, ELISA i, co znacznie wzmocniło podejrzenia zakażenia, w OME. Wcześniejsze doświadczenia wskazywały, że wyniki dodatnie w tym ostatnim teście obserwowano wyłącznie w sytuacji stwierdzenia brucelozu u świń, natomiast w przypadku określenia ostatecznego wyniku jako fałszywie dodatni, a więc przy reakcjach krzyżowych, wyniki OME były z reguły ujemne (11). Ponadto obserwowane miana w OWD, OA i wartości absorbancji w ELISA były stosunkowo wysokie, choć niższe niż w przypadku surowic od knurów z Hiszpanii. Poddane kwarantannie zwierzęta przebadano ponownie po upływie 3 tygodni i, odmiennie niż w przypadku knurów, które były zakażone, zaobserwowano w poszczególnych testach wyraźny spadek poziomu przeciwciał. Niektóre próbki surowic w tym ponownym badaniu okazały się ujemne. Dla odmiany w niektórych próbkach surowic, które w pierwszym badaniu były ujemne zaobserwowano dodatnie wyniki w OKAP, ELISA i niewielkie miana przeciwciał w OWD i OA. Ten obraz reakcji w kierunku brucelozu świń okazał się charakterystyczny dla reakcji krzyżowych, prawdopodobnie na tle *Yersinia enterocolitica*. Zakażenie świń tym drobnoustrojem indukuje odpowiedź serologiczną często trudną do odróżnienia od reakcji specyficznych powodowanych przez pałeczki *Brucella*.

Należy nadmienić, że zarówno w jednym (zwierzęta z Hiszpanii), jak i drugim przypadku (zwierzęta z Niemiec) analizowano również inne zgromadzone informacje dotyczące tych zwierząt. Knury z Hiszpanii przed wysyłką były poddane badaniom metodami OKAP, OA i OWD i nie stwierdzono u nich reakcji dodatnich. Natomiast sama Hiszpania jest krajem, gdzie obserwuje się zakażenia świń pałeczkami

*Brucella*. Z kolei knury z Niemiec nie badano przed wysyłką, ale pochodziły one z fermy o charakterze zamkniętym z części kraju, gdzie nie stwierdzano w ogóle przypadków brucelozu świń, natomiast obserwowano przypadki zakażeń świń powodowanych przez *Yersinia enterocolitica* O:9. W odniesieniu do tego ostatniego kraju przypadki brucelozu u świń obserwuje się wyłącznie w części północno-wschodniej w pojedynczych fermach, gdzie prowadzi się otwarty, wolno pastwiskowy chów świń (1).

Reasumując, należy stwierdzić, że sytuacja epidemiologiczna brucelozu świń w Polsce jest dobra, choroba ta występuje stosunkowo rzadko. Mając jednak na względzie istnienie w naszym kraju potencjalnego rezerwuaru zarazka wśród dzikich zwierząt, choroby tej nie należy lekceważyć. Do zwiększenia częstotliwości jej występowania mogłoby się przyczynić upowszechnienie w Polsce coraz bardziej popularnego w wielu krajach Europy wolno pastwiskowego chowu świń, który ułatwia kontakt tych zwierząt z zakażonymi dzikami, zającami czy też zakażoną wodą i pastwiskiem. W diagnostyce brucelozu świń należy mieć na względzie, że żadna ze stosowanych metod nie jest metodą niezawodną, niekiedy należy zastosować równocześnie kilka z nich, a nawet powtórzyć badanie w odstępie 3–4 tygodni. Tylko analiza wyników badań uzyskanych wszystkimi metodami, ocena dynamiki narastania i opadania poziomu przeciwciał, a także dodatkowe informacje uzyskane z wywiadu, pozwalają na właściwe rozpoznanie brucelozu u świń. Zawsze należy mieć świadomość istnienia problemu reakcji krzyżowych powodowanych przez drobnoustroje o pokrewnej z brucelami budowie, w przypadku świń dotyczy to szczególnie *Yersinia enterocolitica* O:9 (12, 13).

## Piśmiennictwo

1. Porcine brucellosis (*Brucella suis*). Scientific opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2008-665). 2009, **1144**, 1-112.
2. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J., Trusczyński M., Chrobocińska M.: The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, **22**, 33-40.
3. Pilaszek J., Szulowski K., Iwaniak W.: Sytuacja epidemiologiczna brucelozu zwierząt w Polsce. *Medycyna wet.* 2000, **56**, 363–366.
4. Szulowski K., Pilaszek J., Iwaniak W.: Application of meat juice in diagnosis of brucellosis in hares and wild boars by ELISA. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2000, **44**, 45-52.
5. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii Nr GIWz.401/BB-16/2010 z dnia 30 listopada 2010 r. w sprawie postępowania przy podejrzeniu, potwierdzeniu i zwalczaniu oraz przy prowadzeniu badań kontrolnych brucelozu.
6. *The Merck Veterinary Manual. A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and control for the Veterinarian.* Merck & Co., Inc., Rahway, USA, 1991, 670-671.
7. Teyssou R., Morvan J., Leleu J.P., Roumegou P., Goullin B., Carteron B.: About a case of human brucellosis due to *Brucella-Suis* Biovar-2. *Med. Mal. Infect.* 1989, **19**, 160-161.
8. Garin-Bastuji B., Vaillant V., Albert D., Tourrand B., Danjean M.P., Lagier A., Rispal P., Benquet B., Maurin M., De Valk H., Maïlles A.: Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. W: *Proceedings of the International Society of Chemotherapy Disease Management Meeting, 1st International Meeting on Treatment of Human Brucellosis*, 7–10 November 2006, Ioannina, Greece.
9. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE, Paris, France, 2009.
10. Instrukcja nr 46/2003 Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 25 sierpnia 2003 r. Nr GIWzVII.420/lab-23/2003 dotycząca przeprowadzenia badania bakteriologicznego w kierunku brucelozu bydła.
11. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J.: Porcine brucellosis in Poland: problems accompanying serological surveys conducted in 1995-2000. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2001, **45**, 153-161.
12. Jungersen G., Soerensen V., Giese S.B., Stack J.A., Riber U.: Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* O:9 after natural or experimental infection in pigs. *Epidemiol. Infect.* 2006, **134**, 347–357.
13. Wrathall A.E., Broughton E.S., Gill K.P.W., Goldsmith G.P.: Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. *Vet. Rec.* 1993, **132**, 449-451.

Dr hab. Krzysztof Szulowski, prof. nadzw., Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: kszjanow@piwet.pulawy.pl