

Pojedynczy seroreagent w badaniu serologicznym stada w kierunku choroby Aujeszkyego – problem nie tylko naukowy

Zygmunt Pejsak, Andrzej Lipowski, Tadeusz Wijaszka

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Realizacja programu zwalczania choroby Aujeszkyego w naszym kraju w oparciu o obowiązujące, znowelizowane rozporządzenie w sprawie zwalczania choroby Aujeszkyego u świń (1) przebiega nadspodziewanie sprawnie. W wielu województwach dobiega końca III etap pobierania próbek krwi.

Uzyskanie w okresie kolejnych dwóch lat badań wyników ujemnych we wszystkich stadach świń danego regionu, upoważni głównego lekarza weterynarii do

wystąpienia do Komisji Weterynaryjnej Unii Europejskiej o uznanie regionu za wolny od choroby Aujeszkyego. Wejdzimy wówczas w etap badań monitoringowych przewidzianych dla stad urzędowo wolnych od choroby obejmujących wszystkie stada hodowlane.

Nie ma wątpliwości, że, podobnie jak to miało miejsce w wielu krajach, które zwalczyły już tę chorobę, również w Polsce spotkamy się ze znanym od ponad 20 lat, jednak dotychczas nie do końca

wyjaśnionym, zagadnieniem pojedynczego seroreagenta (single reactor – SR), to znaczy pojedynczej, serologicznie dodatniej świni wśród ujemnych w tym zakresie zwierząt (2, 3, 4, 5).

Fenomen świń – pojedynczych seroreagentów związany jest ze stwierdzeniem w stadzie wielokrotnie badanym serologicznie w kierunku choroby Aujeszkyego pojedynczej próbki reagującej dodatnio w teście ELISA zarówno wtedy, gdy surowica badana jest w kierunku obecności przeciwciał przeciwko kompletnemu wirusowi choroby Aujeszkyego (2), obecności przeciwciał przeciwko glikoproteinie B – gB (5), jak i obecności przeciwciał przeciwko glikoproteinie E – gE tego wirusa (3, 4).

Celem tej publikacji jest przedstawienie przyczyn pojawiania się pojedynczych seroreagentów oraz praktycznych aspektów tego zjawiska. Poznanie uwarunkowań, niemożliwego do jednoznacznego wyjaśnienia występowania pojedynczych seroreagentów, może być przydatne w prawidłowej ocenie sytuacji epizootycznej stada świń oraz właściwej realizacji programu

Single reactor in the herd monitored for Aujeszky's disease – not only scientific problem

Pejsak Z., Lipowski A., Wijaszka T., National Veterinary Research Institute in Puławy

Swine herd monitoring for Aujeszky's disease virus (ADV), occasionally reveals a single seropositive pig, referred to as a single reactor (SR). The seropositive status of SR could be explained as follows: (i) the false positive reaction in the serological assay, (ii) the first animal to be infected in the herd, (iii) the last animal to seroconvert, (iv) the only animal infected in the herd, (v) the strain of ADV of very low virulence, and (vi) the occurrence of certain ADV-related genes in apparently uninfected animal. In spite of the background of the SR phenomenon, it is advisable to isolate/remove this animal from the herd. Such management is practiced in several countries. The cases of SRs are observed in Poland as well. In confirmatory tests, done in the first half of 2009, almost 10% of the single positive pigs could be referred to as the single reactors. As the problem increases, it is proposed to amend the Ministry Council Regulation, concerning the national Aujeszky's disease eradication program. The main amendments should focus on immediate elimination of the SRs from the herd and subsequent serological testing of all contact animals to clear the situation. In this paper all interpretations of the above mentioned testing were discussed.

Keywords: Aujeszky's disease, single reactor, pigs, amendment.

zwalczania choroby Aujeszkyego w naszym kraju, szczególnie w jego najtrudniejszej – końcowej fazie.

Do podjęcia tego zagadnienia skłonił fakt, że w okresie od stycznia do końca września bieżącego roku, w trakcie wykonywania przez Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. Choroby Aujeszkyego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach badań potwierdzających wykazano, że znaczny odsetek nadesłanych przez Zakłady Higieny Weterynaryjnej próbek można zakwalifikować jako pochodzące od pojedynczych seroreagentów. Na zbadane w PIWet – PIB od 1 stycznia 2009 do 30 września 2009 r. 2183 próbki dodatnie w teście ELISA gE w 210 przypadkach w teście ELISA gB próbki te okazały się ujemne.

Zazwyczaj wprowadzenie wirusa choroby Aujeszkyego do określonej populacji świń uwidacznia się szybkim rozprzestrzenieniem tego czynnika zakaźnego wśród pogłowa zaatakowanych zwierząt (6), czego wynikiem jest serokonwersja (pojawienie się swoistych przeciwciał w surowicy) u znacznego odsetka świń. W następstwie replikacji wirusa w określonych sytuacjach może dojść do utrwalenia się

zakażenia latentnego (materiał genetyczny wbudowany jest w komórki nerwowe) praktycznie niemożliwego do wykrycia tradycyjnymi metodami wirusologicznymi (6). W określonych sytuacjach (np. stres transportowy, żywieniowy, środowiskowy itp.) u latentnie zakażonego zwierzęcia może dojść do reaktywacji wirusa, jego uwolnienia z zakażonej komórki i w ślad za tym do ponownej serokonwersji, której wynikiem będzie dodatni wynik w testach ELISA. Oznacza to, że osobnik zakażony latentnie może być wykrywalny okresowo, stanowiąc poważny problem w procesie uwalniania regionu od wirusa choroby Aujeszkyego (7).

W kilku krajach (np. USA, Wielka Brytania, Holandia, Norwegia, Niemcy, Szwecja) szczegółowa analiza rezultatów monitoringowych badań serologicznych uzyskiwanych w trakcie zwalczania omawianej choroby uwidoczniała, że w niemałym odsetku gospodarstw stwierdzono obecność tylko jednego seroreagenta. W większości tego typu stad, mimo podjęcia dodatkowych, intensywnych pod względem skali badań serologicznych, nie wykryto innych seroreagentów (2, 3, 4, 5).

Dla przykładu, w Szwecji w trakcie prowadzonych w 8900 stadach świń, przy wykorzystaniu testu gB ELISA, badań serologicznych, które objęły 480 000 zwierząt, wykryto 1300 świń – pojedynczych seroreagentów (5). Większość tych zwierząt (99%) reagowała ujemnie w teście gE ELISA. Godny uwagi jest fakt, że w gospodarstwach, w których stwierdzono obecność pojedynczych seroreagentów nie obserwowano ani klinicznych objawów choroby, ani szerzenia się zakażenia wśród wrażliwych świń (5). Zastosowanie metody immunohistochemicznej nie wykazało też obecności wirusa choroby Aujeszkyego w tkankach tych zwierząt.

Próbując wyjaśnić powyższe obserwacje, cytowani autorzy wybrali do szczegółowych badań świnię – pojedynczy seroreagent, z czego grupę A stanowiło 73 zwierząt, grupę B – 20 świń, które poddano immunosupresji, grupę C – 15 serologicznie ujemnych zwierząt (kontrola ujemna), a grupę D – 105 prosiąt urodzonych przez 10 macior z grupy A. Materiał do badań wirusologicznych i molekularnych stanowiły: zwoje nerwu trójdzielnego (miejsce predylekcyjne do latentnego zakażenia wirusem choroby Aujeszkyego), opuszka węchowa, migdałki, błona śluzowa małżowin nosowych, wątroba, płuca, mózg, mózdzek, pień mózgu, zwoje nerwowe krzyżowego odcinka rdzenia kręgowego i ślinianki. Przy zastosowaniu metod wirusologicznych w żadnym przypadku nie udało się wyizolować wirusa od pojedynczych seroreagentów. Z kolei

zastosowanie hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na wykrycie swoistych ziarnistości w neuronach opuszki węchowej tylko u jednego zwierzęcia. Najczulsza z zastosowanych metod reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) umożliwiła wykrycie w próbkach narządów 15 świń z grupy A i 10 zwierząt z grupy B obecności genów kodujących ekspresję glikoprotein B, E i D wirusa choroby Aujeszkyego. Analiza sekwencji otrzymanych w trakcie tego badania amplikonów (produktów PCR) wykazała ich bardzo wysokie podobieństwo do odpowiednich sekwencji genów wirusa. Jednocześnie w żadnym przypadku w komórkach nerwowych świń pojedynczych seroreagentów nie wykryto transkryptów (elementów genetycznych) charakterystycznych dla zakażenia latentnego. Rezultat ten uznano za brak obecności wspomnianego czynnika zakaźnego u badanych zwierząt. Biorąc pod uwagę, że w Szwecji nie stosowano szczepień, a świnię – pojedynczy seroreagent występują nie tylko w południowej, ale i w północnej Skandynawii oraz to, że ani w warunkach naturalnych, ani po doświadczalnej immunosupresji nie obserwowano reaktywacji wirusa, cytowani autorzy stwierdzili, że obserwowany fenomen występowania pojedynczych seroreagentów nie może być uznany za typowy przejaw zakażenia latentnego wymienionym patogenem. Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki wskazują, że u zdrowych, niezakażonych świń mogą występować pewne sekwencje typowe dla genomu herpeswirusów, do których należy wirus choroby Aujeszkyego (5).

Z odmienną sytuacją w zakresie występowania pojedynczych seroreagentów zetknęli się epizootiologowie amerykańscy (2). W stanie Minnesota, prowadząc monitoring serologiczny w 173 spośród 16 500 ferm świń, wykryto w 30 z nich obecność pojedynczych seroreagentów. Zaskakujące rezultaty wspomnianych badań skłoniły do przeprowadzenia szczegółowej analizy sytuacji w oparciu o badania laboratoryjne ukierunkowane na wykrycie wirusa choroby Aujeszkyego u serologicznie dodatnich świń. Do tego celu wybrano 27 pojedynczych seroreagentów pochodzących z 19 spośród wymienionych 30 ferm. Wspomniane świnię poddano immunosupresji, a następnie, po ich eutanazji, przeprowadzono wiele badań, w tym izolację wirusa, próbę biologiczną oraz odczyn immunofluorescencji w celu wykazania obecności wirusa. Jako materiał badawczy wykorzystano mózg, zwoje nerwu trójdzielnego, migdałki oraz rdzeń kręgowy. Pozytywne wyniki uzyskano u 4 zwierząt. W czterech spośród analizowanych 19 ferm stwierdzono, w okresie około 20–30 miesięcy po

wykryciu pierwszej świnii – pojedynczego seroreagenta, mniej lub bardziej nasilone objawy choroby Aujeszkyego. Jak podają autorzy cytowanej pracy, w żadnym z tych przypadków źródło zakażenia nie zostało wykryte.

Biorąc pod uwagę wyniki cytowanych autorów szwedzkich oraz amerykańskich, a także dane z wielu innych prac (2, 3, 4, 5, 8, 9, 10), należy uznać, że analizując przyczyny pojawienia się świń pojedynczych seroreagentów w określonym stadzie pod uwagę powinno się wziąć sytuację epizootyczną kraju (regionu), w którym prowadzone są monitoringowe badania serologiczne. Porównanie rezultatów uzyskanych w krajach o wysokiej prevalencji występowania choroby Aujeszkyego wskazuje, że znaczny odsetek pojedynczych seroreagentów może być faktycznie związany z zakażeniem świń wymienionym wirusem, natomiast tam, gdzie częstotliwość występowania tej choroby była niska lub w ogóle jej nie stwierdzano, odsetek seroreagentów będących konsekwencją zakażenia wirusem choroby Aujeszkyego jest bardzo niski. Powyższe stwierdzenie jest trudne do zaakceptowania w krajach (regionach), gdzie nigdy nie stwierdzano tego wirusa (np. w Norwegii), a obecność świń – pojedynczych seroreagentów z pewnością nie jest konsekwencją zakażenia tym zarazkiem.

Jest wielce prawdopodobne, że w Polsce, podobnie jak w innych krajach, nie wszystkie pojedyncze dodatnie wyniki badań serologicznych są rezultatem zakażenia wirusem choroby Aujeszkyego. Skrajnym przykładem potwierdzającym wysuniętą hipotezę jest przypadek dotyczący wyników trzeciego pobrania próbek krwi uzyskanych w jednej z ferm wielkotowarowych w październiku 2009 r. W gospodarstwie tym poddano badaniom serologicznym 358 próbek. W 9 przypadkach, w prowadzącym badania laboratorium Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w teście ELISA gE otrzymano wyniki dodatnie. W tym samym laboratorium surowice te przebadano powtórnie, wykorzystując test ELISA gB. W tym przypadku wszystkie wyniki były ujemne.

Biorąc pod uwagę zaskakujące wyniki badań, próbki przesłano do Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. Choroby Aujeszkyego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, gdzie ponownie przebadano je testami ELISA gE i gB. Potwierdzono, że wszystkie próbki są dodatnie w kierunku obecności przeciwciał przeciwko gE i ujemne w teście w kierunku obecności przeciwciał przeciwko gB wirusa choroby Aujeszkyego. Na podstawie analizy wszystkich wyników uznano, że zwierzęta reagujące dodatnio w pierwszym wymienionym teście

i ujemnie w drugim, nie miały kontaktu z wymienionym czynnikiem zakaźnym, uznano je zatem za pojedynczych seroreagentów. Przedstawiony przypadek wskazuje na bezwzględną konieczność epizootologicznej analizy uzyskanych wyników badań laboratoryjnych.

Analizując przyczyny pojawienia się pojedynczych seroreagentów, należy brać pod uwagę wiele różnych, udowodnionych naukowo możliwości. Posługiwano się różnego rodzaju metodami izolacji wirusa od świń poddanych immunosupresji, w wyniku której spodziewano się reaktywacji zakażenia latentnego, co umożliwiłoby wykrycie zakaźnej formy omawianego czynnika patogennego (2, 5, 8). Prowadzono również próby wykrycia wirusa choroby Aujeszkyego poprzez zastosowanie odczynu immunofluorescencji (2), hybrydyzacji *in situ* (5, 8) lub PCR (3, 4, 5, 8, 9).

Na podstawie uzyskanych w różnych badaniach wyników ustalono, że wśród przyczyn omawianego zjawiska pod uwagę należy wziąć następujące uwarunkowania:

- 1) pojedyncza świnia reagująca dodatnio w teście ELISA jest ostatnim seroreagentem w stadzie, kiedyś zakażonym wirusem choroby Aujeszkyego,
- 2) wirus choroby Aujeszkyego niedawno został wprowadzony do stada, w związku z czym pojedynczy seroreagent jest pierwszym wykrytym seroreagentem,
- 3) pojedynczy seroreagent może być jedyną zakażoną świnia w stadzie,
- 4) wynik dodatni jest rezultatem fałszywym (błąd popełniony przy oznaczeniu pobranych próbek, niedokładność wykorzystywanego testu, błąd wykonującego itp.), a zwierzę – pojedynczy seroreagent nigdy nie miało kontaktu z wirusem choroby Aujeszkyego,
- 5) zwierzę zakażone jest mało zjadliwym szczepem wirusa choroby Aujeszkyego, który nie szerzy się w stadzie,
- 6) dodatni wynik serologiczny jest konsekwencją obecności w organizmie niezakażonego zwierzęcia genów o sekwencji zbliżonej do sekwencji genów wirusa choroby Aujeszkyego.

Zdając sobie sprawę ze złożoności problemu oraz jednocześnie braku laboratoryjnych możliwości prostego, jednoznacznego wyjaśnienia opisanego fenomenu epizootycznego, konieczne jest rozważenie wprowadzenia do obowiązującego aktualnie rozporządzenia (1) kolejnej nowelizacji związanej z występowaniem świń – pojedynczych seroreagentów.

Korekta obowiązujących przepisów, w omawianym zakresie, ułatwi prawidłową realizację programu, w tym ograniczy liczbę stad świń, które w obecnym stanie prawnym, w przypadku wykazania obecności

pojedynczych seroreagentów, mogą zostać uznane za zakażone, podczas gdy *de facto* nigdy nie miały kontaktu z wirusem choroby Aujeszkyego.

W tym aspekcie, biorąc pod uwagę cytowane powyżej wyniki badań, za słuszną należałoby uznać stosowaną w większości krajów, które zwalczały chorobę Aujeszkyego, zasadę eliminacji ze stada wyłącznie świń – pojedynczych seroreagentów (4, 5). Aktualnie w Polsce stwierdzenie pojedynczego seroreagenta determinuje konieczność wprowadzenia szczepień lub w skrajnym przypadku likwidację stada, co w świetle obecnego stanu wiedzy wydaje się częstokroć nieuzasadnione.

Rozważając propozycję nowelizacji rozporządzenia (1), z merytorycznego punktu widzenia słuszne wydaje się przyjęcie poglądu stwierdzającego, że wykazanie w serologicznych badaniach w III pobieraniu próbek krwi, jak też w badaniach monitoringowych pojedynczych seroreagentów, niezależnie od użytego testu (ELISA gE lub gB), decyduje o uznaniu stada za potencjalnie zakażone. Wynikiem tego powinno być zawieszenie nadanego statusu stada do czasu wyjaśnienia sytuacji. Wykrytego pojedynczego seroreagenta należy natychmiast po uzyskaniu wyników usunąć ze stada. Najwcześniej po 3, a najpóźniej po 5 tygodniach zwierzęta przebywające w bezpośrednim kontakcie z tym osobnikiem należy przebadać ponownie testami gE i gB ELISA. Badanie to powinno obejmować wszystkie świnię z tego samego kójca oraz kójców sąsiadujących z tym, w którym stwierdzono pojedynczego seroreagenta lub, w odniesieniu do stad liczących nie więcej niż 10 zwierząt, wszystkie osobniki powyżej 12 tygodnia życia przebywające w chlewni lub w innych okolicznościach, co najmniej 10 zwierząt najbardziej narażonych na zakażenie.

W przypadku uzyskania wyłącznie wyników ujemnych należy uznać stado za urzędowo wolne od wirusa choroby Aujeszkyego, a więc przywrócić nadany uprzednio status.

Piśmiennictwo

1. Rozporządzenie Rady Ministrów z 27 kwietnia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wprowadzenia programu zwalczania choroby Aujeszkyego u świń. Dz.U. z 19 maja 2009 r. nr 74, poz. 631.
2. Anelli J.F., Morrison R.B., Goyal S.M., Bergeland M.E., Mackey W.J., Thawley D.G.: Pig herds having a single reactor to serum antibody tests to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 1991, **128**, 49-53.
3. Jacobs L., Kimman T.G., Bianchi A.: Lack of serum antibodies against glycoprotein E in pseudorabies virus-immune pigs infected with wild-type virus. *Am. J. Vet. Res.* 1996, **57**, 1525-1528.
4. Jacobs L., Voets R., Bianchi A.T.J.: Detection of pseudorabies virus DNA in individual single-reactor pigs found in certified pseudorabies-free herds. *Res. Vet. Sci.* 1999, **67**, 305-307.

Prace poglądowe

5. Ros Bascuñana C., Björnerot L., Ballagi-Pordány A., Robertsson J-Å., Belák S.: Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected 'single reactor' pigs. *Vet. Microbiol.* 1997, **55**, 37-47.
6. Pejsak Z., Truszczyński M.: Aujeszky's disease (pseudorabies). W: *Disease of Swine* (9th ed.), Straw B.E., Zimmerman J.I., D'Allaire S., Taylor D.J. (edit.), Blackwell Publishing 2006, s. 419-433.
7. Loula T.J.: Experiences in eliminating PRV from herds. *Proc. First International Symposium on the Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus* 1991, May 19-22, s. 143-151.
8. Brown T.M., Osorio F.A., Rock D.L.: Detection of latent pseudorabies virus in swine using in situ hybridization. *Vet. Microbiol.* 1990, **24**, 273-280.
9. Hasebe H., Wheeler G.J., Osorio F.A.: Gene specific assay to differentiate strains of pseudorabies virus. *Vet. Microbiol.* 1993, **34**, 221-231.
10. Van Oirschot J.T.: Induction of antibodies to glycoprotein I in pigs exposed to different doses of a mildly virulent strain of Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 1988, **122**, 599-603.

Prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: zpejsak@piwet.pulawy.pl