

Przydatność testu gamma-interferonowego do przeżyciowej diagnostyki gruźlicy u żubrów

Monika Krajewska¹, Marek Lipiec¹, Blanka Orłowska², Krzysztof Anusz²,
Krzysztof Szulowski¹

¹ Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

² Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie

The usefulness of the gamma-interferon test for intravital diagnosis of tuberculosis in European bison

Abstract: In Poland, cases of bovine tuberculosis in European bison have been so far reported from Bieszczady in the herd “Górny San”, from a zoological garden, from the enclosure in Borecka Forest and from the Breeding Center in Smardzewice. Presently, the worldwide attempts are focused on implementation into practice tests that in the future could replace the tuberculin test. Based on scientific background, the European Commission has issued the Regulation 1226/2002/WE permitting the use of Interferon Gamma Release Assay in practice as auxiliary test during intravital diagnosis of bovine tuberculosis. The aim of the study was to develop a position of the Tuberculosis Reference Laboratory, Department of Microbiology, PIWet-PIB, Puławy on the practical use of the assay for determining the level of gamma-interferon (IFN- γ) in the blood plasma of certain animal species.

Keywords: gamma interferon, *Mycobacterium bovis*, anthrozoonotic infection

Wstęp

Czynnikiem etiologicznym gruźlicy bydłowej jest prątek bydłowy (*Mycobacterium bovis*), zaliczany do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Gruźlica jest typowym przykładem zooantropozonozy (Miller; Olea-Popelka 2013), gdzie czynnikiem zakaźnym może być zarówno chore zwierzę, jak i prątkujący człowiek. Znane są przypadki z ogrodów zoologicznych i innych ośrodków, gdzie przyczyną choroby u zwierząt była chora na gruźlicę obsługa (Pinto i in. 1973). Być może wśród czynników zwiększających ryzyko zakażenia prątkiem zwierząt wolno żyjących czy bydła jest korzystanie ze wspólnych pastwisk, gdzie prątki mogą przeżywać nawet do kilkunastu miesięcy.

Badania prowadzone w Polsce wykazały, że przypadki gruźlicy bydłowej są notowane u zwierząt dzikich, m.in. u żubrów, a zwierzęta te stanowią rezerwar zarazka

w środowisku (Żórawski, Lipiec 1997; 1998; Welz i in. 2005; Welz 2010). Gruźlicę u żubrów stwierdzono w ostatnich latach w stadzie „Górny San”, zasiedlającym teren wschodnich Bieszczad (Brewczyński, Welz 2011; Salwa i in. 2011, Krajewska i in. 2014), w jednym z ogrodów zoologicznych, w zagrodzie pokazowej w Puszczy Boreckiej oraz w Ośrodku Hodowli Żubrów w Smardzewicach. Nie udało się do chwili obecnej wskazać źródła zakażenia tego gatunku zwierząt.

Gruźlica bydłęca jest zakaźną chorobą bydła o ściśle zdefiniowanych w Polsce przepisach o jej zwalczaniu i eliminacji. Od dziesiątków lat podstawą diagnozowania gruźlicy bydłowej jest śródskórny test tuberkulinowy. Test ten jest międzynarodowym standardem przyżyciowej diagnostyki gruźlicy bydła. Jest wykorzystywany rutynowo w programach zwalczania gruźlicy i polecany przez Światową Organizację Zdrowia (OIE). Tuberkulina (białko stanowiące zagęszczony przesącz, uzyskiwany w trakcie hodowli prątków) jest wykorzystywana do wykonywania tuberkulinizacji pojedynczej – z zastosowaniem tylko tuberkuliny bydłowej oraz do tuberkulinizacji porównawczej, wykonywanej zarówno tuberkuliną bydłą, jak i ptasią. U zwierzęcia zakażonego prątkiem bydłym występuje silniejsza, homologiczna reakcja na tuberkulinę bydłą niż na tuberkulinę ptasią. Odczyt u bydła wykonuje się zgodnie z zasadami tzw. klucza, wg wersji zwykłej lub zaostrej, w zależności od tego, czy w badanym stadzie gruźlica była notowana już wcześniej.

Aktualnie są prowadzone na świecie prace zmierzające do wprowadzenia do praktyki weterynaryjnej testów, które mogłyby zastąpić w przyszłości test tuberkulinowy. Zgodnie z wcześniej przeprowadzonymi badaniami, Rozporządzeniem Komisji nr 1226/2002/WE, dopuszczono stosowanie w praktyce weterynaryjnej testu gamma-interferonowego, jako testu dodatkowego, uzupełniającego w diagnostyce przyżyciowej gruźlicy bydłowej. Test ten jest opisany w rozdziale 2.4.7. Manual OIE. Zgodnie z opisem test ten może być stosowany do diagnostyki gruźlicy bydła, owiec, kóz, bawołów afrykańskich i innych ssaków z rodziny Bovidae (Kita, Anusz 2011).

Cel pracy

Celem pracy jest wypracowanie stanowiska Laboratorium Referencyjnego Gruźlicy Zakładu Mikrobiologii PIWet.-PIB w Puławach w sprawie stosowania w praktyce testu do oznaczania poziomu gamma-interferonu (INF- γ) w plazmie krwi niektórych gatunków zwierząt.

Podstawy stosowania i opis testu

W skład gotowego zestawu wchodzi szereg komponentów służących do wykonania badania zaś test polega na pomiarze poziomu gamma-interferonu uwolnionego pod wpływem swoistych antygenów (tuberkulin PPD) przez uczulone limfocyty

pełnej krwi. Jego poziom jest mierzony w sposób podobny jak w klasycznym teście ELISA. Wzajemny stosunek poziomu gamma-interferonu wydzielonego w próbie kontrolnej, próbie z tuberkuliną PPD ptasią i tuberkuliną PPD bydłęcą decyduje o klasyfikowaniu zwierzęcia jako wolnego od zakażenia lub podejrzanego o gruźlicę bydłęcą.

Test ten jako jedyny może być obecnie stosowany jako test diagnostyczny w przypadku importu lub eksportu dużych przeżuwaczy (żubry, bawoły, bizony). Testy te są dostępne w handlu jako gotowe zestawy diagnostyczne dla przeżuwaczy, w tym żubrów, bizonów i bawołów (Bovigam®). Krew musi być pobrana w objętości co najmniej 5 ml na antykoagulant, którym musi być heparyna litowa. Inne antykoagulanty nie powinny być używane. Istotnym problemem w wykonaniu testu jest przesłanie próbek pełnej krwi w odpowiednich warunkach i dostatecznie szybko do laboratorium diagnostycznego. Inkubacja musi być wykonana w odpowiednim czasie, w przeciwnym wypadku znacząco rośnie liczba wyników fałszywie ujemnych. Idealną temperaturą transportu jest $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Dostarczenie krwi do laboratorium diagnostycznego winno nastąpić nie później niż 30 godzin od pobrania. Ważne jest, aby krew zawierała żywe krwinki białe, zdolne do reagowania na dodane w trakcie badania mitogeny. Pierwszy etap badania przebiega w probówkach typu Eppendorf, po dodaniu do próbek krwi mitogenów w postaci tuberkuliny PPD bydłęcej, tuberkuliny PPD ptasiej oraz PBS (próba zerowa). W badaniach może być wykorzystana tylko tuberkulina specjalnie standaryzowana na potrzeby testu. Nie mogą to być preparaty handlowe, niewchodzące w skład testu. Całość jest inkubowana przez 16–24 godziny w temperaturze 37°C . Z doświadczeń własnych wynika, że lepsze efekty uzyskiwano po maksymalnym czasie inkubacji przez 24 godziny.

Po upływie czasu inkubacji plazma krwi jest pozyskiwana z każdej próbki krwi, odpowiednio rozcieńczana i nanoszona na dołączone do zestawu, opłaszczone odpowiednim antygenem płytki. Kolejnym etapem jest wykonanie badania w sposób zbliżony do klasycznego badania ELISA i określenie gęstości optycznej (OD) każdej z trzech części próbki. Niezmiernie istotne jest na tym etapie dokładne i precyzyjne oznaczenie planu rozmieszczenia próbek plazmy na płytce, gdyż od jednego zwierzęcia otrzymujemy 3 próbki plazmy.

Odczyt jest wykonywany przy długości fali 450 nm. Test jest ważny, jeżeli kontrola ujemna przyjmuje wartości absorbancji niższe niż 0,130, a kontrola dodatnia wyższe niż 0,700. Ocena wyników opiera się na porównaniu wartości absorbancji dla poszczególnych próbek plazmy krwi. Wynik jest określany jako dodatni dla próbek, w których różnica pomiędzy wartościami OD z tuberkuliną PPD bydłęcą a OD z PBS i jednocześnie OD z tuberkuliną ptasią jest wyższa niż 0,100. Dla próbek ujemnych różnice tych wartości są niższe niż 0,100.

Szereg autorów uznaje, że test ten posiada czułość zbliżoną do testu tuberkulinowego. Istnienie zakażenia organizmu zwierzęcia jest wykrywane w podobnym czasie po wnikięciu prątków do organizmu, jak w teście tuberkulinowym. Test

gamma-interferonowy może być wykonywany wielokrotnie na próbce krwi od tego samego zwierzęcia, bez obawy o możliwość odczulenia. Wymaga także mniej czynności niż test tuberkulinowy. U zwierząt zakażonych swoiście prątkiem typu bydlęcego wykonany test tuberkulinowy może stymulować reakcje w teście gamma-interferonowym.

Wpływ na wynik badania może mieć immunosupresja spowodowana jednym z leków o działaniu przeciwzapalnym i przeciwalergicznym, jak również okres okołoporodowy badanego zwierzęcia (14 dni przed i po porodzie). W tych przypadkach badanie należy powtórzyć w celu wyeliminowania możliwości wystąpienia wyniku fałszywie ujemnego. Wynik testu powinien być interpretowany w kontekście całego wywiadu epidemiologicznego i ewentualnego występowania ognisk gruźlicy w sąsiedztwie.

Ocena przydatności testu

Przyżyciowa diagnostyka gruźlicy może być obarczona błędem, dlatego podstawę diagnostyki gruźlicy nadal stanowi izolacja prątka z materiału pobranego *post mortem*. W 2012 r. Komisja Europejska wystosowała do European Food Safety Authority (EFSA) zapytanie, czy test gamma-interferonowy mógłby być wprowadzony zamiast testu tuberkulinowego do powszechnej praktyki weterynaryjnej w Europie w zwalczaniu gruźlicy bydlęcej. Wspólne działania przedstawicieli krajowych laboratoriów referencyjnych gruźlicy bydlęcej UE doprowadziły do wypracowania ogólnego poglądu na opisywany test, zgodnego ze stanowiskiem i doświadczeniami własnymi Laboratorium Referencyjnego Gruźlicy PIWet.-PIB, a mianowicie:

Test gamma-interferonowy może być stosowany w praktyce weterynaryjnej, ale tylko jako test pomocniczy do wyników testu tuberkulinowego, nigdy jako jedyny test diagnostyki przyżyciowej.

Istnieje możliwość uzyskiwania w teście zarówno wyników fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych. Ich odsetek jest zbliżony do tych uzyskiwanych w teście tuberkulinowym.

Czułość i swoistość testu gamma-interferonowego jest zbliżona do testu tuberkulinowego. Oba są testami wykrywającymi nadwrażliwość komórkową typu późnego.

Znaczna liczba manipulacji z próbką stwarza możliwość pomyłki i niedokładności w wykonaniu testu.

Szczególną trudnością (w państwach o dużej powierzchni) jest dostarczenie na czas próbek krwi pobranej na antykoagulant. Badania własne wskazują, że im szybszy transport próbki, tym bardziej wiarygodne wyniki testu.

Szczególną przydatność test ten wykazuje w badaniach zwierząt z rodziny *Bovidae* utrzymywanych w stanie dzikim lub w ogrodach zoologicznych, dla których brak jest standaryzacji testu tuberkulinowego.

Piśmiennictwo

- Brewczyński P., Welz M., 2011. Zagrożenie gruźlicą u żubrów w Bieszczadach. European Bison Conservation Newsletter, 4: 63–70.
- Kita J., Anusz K., 2011. Rozpoznawanie gruźlicy u bydła. *Życie Wet.* 84 (6): 467–473.
- Krajewska M., Lipiec M., Szulowski K., 2011. Bovine tuberculosis in bison (*Bison bonasus caucasicus*) located in Poland. *Post. Nauk Med.*, XXIV(10): 842–845.
- Krajewska M., Welz M., Brewczyński P., Orłowska B., Anusz K., 2014. Gruźlica bydłęca w bieszczadzkiej populacji żubrów. *Życie Wet.*, 89 (2): 148–151.
- Miller M., Olea-Popelka F., 2013. One health in the shrinking world: experiences with tuberculosis at the human-livestock-wildlife interface. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 36 (3): 263–268.
- Pinto M.R.M., Jainudeen M.R., Panabokke R.G., 1973. Tuberculosis in a domestic Asian elephant (*Elephas maximus*). *Vet. Rec.* 93: 662–664.
- Salwa A., Anusz K., Welz M., Wozikowski R., Zaleska M., Kita J., 2011. Analiza sytuacji epizootologicznej u zwierząt gospodarskich i wolno żyjących w Bieszczadach w związku z wystąpieniem gruźlicy bydłęcej u żubrów (*Bison bonasus*), European Bison Conservation Newsletter 4: 71–80.
- Welz M., Anusz K., Salwa A., Zaleska M., Bielecki W., Osińska B., Kaczor S., Kita J., 2005. Gruźlica bydłęca u żubrów w Bieszczadach. *Med Weter.*, 61 (4): 441–444.
- Welz M., 2010. Sytuacja epizootologiczna wśród zwierząt gospodarskich i wolno żyjących na terenie Bieszczad z uwzględnieniem zakażeń *Mycobacterium bovis*. Rozprawa doktorska, SGGW Warszawa.
- Żórawski C., Lipiec M., 1997. Przypadek uogólnionej gruźlicy u żubra. *Med. Weter.*, 53: 90–92.
- Żórawski C., Lipiec M., 1998. Infekcja u żubra. *Med. Weter.*, 54: 178–180.

