

Neospora caninum u żubrów żyjących w Białowieży

Władysław Cabaj, Justyna Bień, Katarzyna Goździk, Bożena Moskwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, Warszawa

Neospora caninum in European bison living in Białowieża, Poland

Abstract: The prevalence of antibodies to *Neospora caninum* was examined in European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Białowieża, Poland. Sera of 67 European bison selected and shot or immobilized in 2009 and up to March 2010, of various ages and sexes, were tested for *N. caninum* antibodies using ELISA test. Positive antibody responses were found in 9 bison (prevalence 13,43%). Additionally, all positive sera were tested by Western blot to verify the ELISA results. The Western blot results confirmed the presence of antibodies to *Neospora* tachyzoites antigens in all tested ELISA positive sera. Our results indicate strongly the presence of *N. caninum* in the European bison in Poland. Farther studies are in progress to evaluate the existence of a sylvatic cycle of *N. caninum*.

Key words: European bison, *Neospora caninum*, ELISA, Western blot

Wstęp

Neospora caninum jest pasożytniczym wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem należącym do typu *Apicomplexa*. Pasożyt ten został znaleziony po raz pierwszy w Norwegii, w postaci cyst w mózgu i rdzeniu kręgowym psów z objawami paraliżu (Bjerkås i in. 1984). Kilka lat później w USA zidentyfikowano pasożyta i wprowadzono do systematyki nowy rodzaj *Neospora* oraz gatunek *N. caninum* (Dubey i in. 1988).

We wcześniejszych pracach (Cabaj i in. 2005; 2008; 2009) opisano szczegółowo wyniki badań ostatnich lat, z których jednoznacznie wynika, że neosporoza występuje u polskich żubrów żyjących w Białowieży. Wykrycie *N. caninum* u wolno żyjących przeżuwaczy oraz zwierząt mięsożernych potwierdza istnienie sylvatycznego cyklu życiowego tego pasożyta. Znaczenie zwierząt wolno żyjących w epidemiologii neosporozy nie zostało jak dotąd w pełni wyjaśnione.

W przypadku bydła objawy kliniczne neosporozy występują jedynie u młodych zwierząt. Skutkiem neosporozy u zwierząt dorosłych (u krów) są trudności w zacieleniu, nawracające poronienia, resorpcja lub mumifikacja płodu lub narodziny martwego potomka. Z danych literaturowych oraz wcześniejszych badań własnych wynika, że ponad 90% potomstwa urodzonego przez krowy zarażone *N. caninum* jest również zarażone, a cielęta padają w młodym wieku. W Polsce w roku 2000 po raz pierwszy wykryto przeciwciała przeciw temu

pasożytowi we krwi krów, u których wcześniej notowano poronienia (Cabaj i in. 2000). Dodatkowo, pierwotniaka *N. caninum* wyizolowano z tkanek naturalnie zarażonego cielęcia, a izolat NC-PolB1 jest utrzymywany w stałej hodowli komórkowej w Instytucie Parazytologii PAN (Goździk i Cabaj 2007). Ośrodkiem mającym największy wpływ na kształtowanie się europejskiej populacji linii nizinnej żubra jest Białowieża i stąd wynika nasze zainteresowanie tym miejscem. Podejrzenie, że pasożyt może osłabiać potencjał rozrodczy, a przez to wywierać negatywny wpływ bezpośrednio na sam proces restytucji podgatunku *Bison bonasus bonasus*, powinna być brana pod uwagę we wszystkich programach dotyczących poprawy stanu zdrowotnego tej populacji.

Materiał i metody

Hodowla pasożyta w komórkach nabłonkowych – Vero cells

W Instytucie Parazytologii PAN prowadzona jest stała hodowla komórek *Vero* (komórki endotelialne pochodzące z nerki małpy *Cercopithecus aethiops*, typu monolayer). W warunkach laboratoryjnych komórki są utrzymywane w medium hodowlanym RPMI z dodatkiem 1% surowicy końskiej oraz antybiotyków; penicyliny i streptomycyny. W tych komórkach prowadzona jest stała hodowla dwóch izolatów *N. caninum* NC-1 oraz NC-PolB1. Hodowle komórkowe są utrzymywane w inkubatorze, w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂ (przy 100% wilgotności). Otrzymane tachyzoity po oczyszczeniu są wykorzystywane do sporządzenia antygenów (Western blot) oraz do badań molekularnych (wzorzec DNA).

Test ELISA

Surowice uzyskane z krwi żubrów poddawanych zabiegom weterynaryjnym bądź selekcyjnie odstrzeliwanych stanowiły podstawowy materiał do badań. Pozyskiwano je w różnym czasie i z różnych miejsc bytowania żubrów, i do czasu użycia były przetrzymywane w temperaturze –20°C.

Żubr jest zwierzęciem blisko spokrewnionym z bydłem, dlatego do diagnostyki można było wykorzystać testy stosowane do oznaczania poziomu przeciwciał u bydła. Badania przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu *Neospora caninum* Antibody Test Kit firmy IDEXX Laboratories, Inc. USA. W zestawach znajdują się płytki opłaszczone antygenem, kontrolne surowice pozytywne i negatywne oraz standaryzowane rozcieńczalniki i bufory. W teście wykrywane są specyficzne przeciwciała klasy IgG. Wynik reakcji odczytywany był w czytniku EL*800, Biotek, Instruments Inc. Wynik uznawano za pozytywny, jeśli wyliczony współczynnik S/P był większy lub równy 0,3 (dla bydła 0,5).

Metoda Western blot (WB)

Metoda WB była stosowana dodatkowo dla potwierdzania wyników dodatnich w teście ELISA oraz w celu identyfikacji i analizy antygenów pasożyta. Tylko

wyniki pozytywne otrzymane w dwóch testach (ELISA i Western blot) były podstawą do uznania badanych prób za dodatnie/pozytywne. Antygen sporządzano z tachyzoitów *N. caninum* izolatu NC-1 bądź NcBPol-1 pochodzących z własnej hodowli komórkowej. Test WB był przeprowadzony zgodnie z procedurami opisanymi przez Björkman i in. (1994) oraz Björkman i in. (1998). Po wywołaniu reakcji paski nitrocelulozy były fotografowane i poddawane analizie w zestawie do dokumentacji firmy KODAK.

Wyniki

Wyniki badań serologicznych w kierunku obecności przeciwciał przeciw *N. caninum* w surowicach analizowanych 29 żubrów przedstawiono w Tabeli 1. W tej grupie zwierząt trzy surowice okazały się pozytywne i pochodziły od 7 letniego byka (nr 866), 23 letniej krowy (nr 867) oraz pięcioletniego byka o imieniu Polipytyk (nr rodowodowy 10362), odstrzelonego w okolicach wsi Teremiski w grudniu 2009 r. Wartość współczynnika SP powyżej 1 świadczy o bardzo wysokim poziomie przeciwciał. Może to wskazywać na wczesną inwazję i dlatego też, krew od tych dwóch osobników wykorzystano do izolacji pierwotniaka *N. caninum* z krwi obwodowej. Wyniki izolacji będą przedmiotem oddzielnej pracy, ale można już powiedzieć, że eksperyment zakończył się sukcesem. Wyizolowano dwa izolaty, oznaczono jako NC-PolBb1 i NC-PolBb-2 (Bień i in. 2010).

Wcześniej prowadzone badanie PCR wykonane na innym materiale biologicznym niż krew (rdzeń kręgowy, wątroba, serce) dały wynik negatywny, stąd zainteresowanie krwią okazało się strategią skuteczną.

Oprócz selekcyjnie odstrzeliwanych żubrów, co roku pewna liczba zwierząt jest immobilizowana przez pracowników BPN i ZBS w Białowieży w celach hodowli lub badań. W roku 2009 udało się pozyskać krew od 38 osobników w różnym wieku i obojga płci. Spośród nich sześć miało poziom przeciwciał anty *N. caninum* wskazujący na możliwość zarażenia tym pasożytem, co potwierdziły wyniki uzyskane Western blot.

Pozytywne żubry to: byk obrożowany w lutym 2009 r. (SP=0,42); krowa kładziona w oddz. 422 w marcu 2009 r. (SP=0,4); byk (SP=0,59); dziesięcioletni byk (SP=1,03) oraz 2 samice przekazane do dalszej hodowli poza Białowieżą (L418, L419, S/P=0,43; 0,45).

Łącznie wśród 67 przebadanych żubrów u 9 osobników stwierdzono wysoki poziom przeciwciał wskazujący na zarażenie tym pierwotniakiem, co stanowi 13,43% zbadanej populacji.

Podsumowanie

Dotychczasowe wyniki badań wskazują jednoznacznie na obecność pierwotniaka *N. caninum* u żubrów żyjących w Białowieży. Odsetek osobników zarażonych był zmienny w kolejnych latach badań. W latach 2004 do końca

Tabela 1. Wyniki testu ELISA u żubrów eliminowanych w wolnej populacji w Puszczy Białowieskiej w roku 2009 do marca 2010.

Lp	Nr żubra	Płeć i wiek	Wynik ELISA	Data eliminacji
1	854	B; 1,5 roku	0,2	20.01.2009
2	855	B; 5 lat	0,1	21.01.2009
3	856	K; 4 mies.	0	3.02.2009
4	857	K; 1,5 roku	0	4.02.2009
5	bez nr	B; 4 mies.	0	26.01.2009
6	bez nr	B; 2 lata	0	4.02.2009
7	bez nr	B; 21 lat	0	5.02.2009
8	858	B; 3,5 roku	0	10.02.2009
9	859	B; 10 mies.	0	10.02.2009
10	bez nr	K; 10 lat	0	23.02.2009
11	860	M; 6 mies.	0	25.02.2009
12	861	K; 6 mies.	0	25.02.2009
13	862	K; 7 mies.	0,1	3.03.2009
14	863	K; 8 mies.	0,1	3.03.2009
15	864	K; 8 mies.	0,1	4.03.2009
16	865	B; 1,8 roku	0,11	4.03.2009
17	bez nr	B; 5 mies.	0	16.03.2009
18	866	B; 7 lat	1,32	1.12.2009
19	867	K; 23 lata	1,87	15.12.2009
20	868	B; 18 lat	0	16.12.2009
21	869	K; 20 lat	0	16.12.2009
22	bez nr	B; 11 lat	0	9.12.2009
23	10362	B; 5 lat	0,5	3.12.2009
24	870	B; 2 lata	0,11	26.01.2010
25	871	B; 6 lat	0,2	26.01.2010
26	872	B; 6 lat	0,2	27.01.2010
27	873	B; 5 mies.	0,15	11.02.2010
28	874	K; 5 mies.	0	11.02.2010
29	875	B; 2,5 roku	0,2	11.02.2010

Objaśnienia: K – krowa, B – byk, bez nr

marca 2008 wynosił 13% (Cabaj i in. 2008). Z kolei w latach 2007 do marca 2009 wynosił 7%, w całym roku 2009 wyniósł 13,43%. Porównując wyniki z lat 1984–2003 (Cabaj i in. 2005) z wynikami uzyskanymi w latach 2004–2010 można dostrzec wzrost udziału zarażonych żubrów. I tak, na 320 przebadanych surowic pochodzących z lat 1984–2003, u 23 osobników stwierdzono pozytywne miana przeciwciał w surowicach (7,1%) podczas gdy w latach 2004–2010 przebadano prawie 460 osobników i spośród nich 50 prób było dodatnich (10,9%). Porównując te dwie wartości uzyskane na dwóch liczebnie dużych próbach, możemy stwierdzić, że procent zarażonych żubrów wzrósł i jeżeli tendencja ta utrzyma się w kolejnych latach, to może stanowić problem dla procesu restytucji tego gatunku.

Nie tylko żubry pochodzące z Białowieży mogą być rezerwuarem dla tej parazytozy. Jak wykazały nasze wcześniejsze badania (Cabaj i in. 2008), wysoki poziom przeciwciał stwierdzano u żubrów żyjących na Słowacji, w Holandii, Włoszech, Hiszpanii, Danii oraz Niemczech. Poza Europą, Dubey i Thulliez (2005) w Ameryce Północnej wykryli przeciwciała *N. caninum* u 5 bizonów na 249 przebadanych osobników.

Badania prowadzone przez nasz zespół są kontynuowane i koncentrują się na izolacji tego pierwotniaka z organizmu żywicielskiego żyjącego w tak unikalnym ekosystemie, jakim jest Puszcza Białowieska.

Podziękowanie

Szczególne podziękowanie składam Dyrekcji Białowieskiego Parku Narodowego, Pani profesor Małgorzacie Krasińskiej i Panu dr Rafałowi Kowalczykowi z Zakładu Badania Ssaków PAN w Białowieży oraz kierownikowi Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie Pani profesor Wandzie Olech za dotychczasową współpracę i pomoc w pozyskiwaniu materiału biologicznego do badań.

Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego MNiSzW nr N303 062 32/2263.

Spis piśmiennictwa

- Bień J., Moskwa B., Cabaj W. 2010. *In vitro* isolation and identification of the first *Neospora caninum* isolate from European bison (*Bison bonasus bonasus* L.). *Vet. Parasitol.*, przyjęto do druku.
- Bjerkäs I., Mohn S.F., Presthus J. 1984. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitkde* 70, 271–274.
- Björkman C., Lunden A., Holmdahl J., Barber J., Trees A.J., Ugglå A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16, 643–648.
- Björkman C., Hemphil, A. 1998. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 20, 73–80.

- Cabaj W., Choromański L., Rodgers S., Moskwa B., Malczewski A. 2000. *Neospora caninum* in aborting dairy cows in Poland. *Acta Parasitol.*, 45, 113–114.
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Gill J. 2005. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. *Vet. Parasitol.*, 128, 163–168.
- Cabaj W., Goździk K., Bień, J., Moskwa, B. 2008. *Neospora caninum* u żubrów – świadomość problemu. *European Bison Conservation Newsletter*, 1, 53–64.
- Cabaj W., Bień, J., Goździk, K., Moskwa, B. 2009. *Neospora caninum* u żubrów w Polsce – aktualny stan badań. *European Bison Conservation Newsletter*, 2, 102–111.
- Dubey J.P., Hattel A.L., Lindsay D.S., Topper M.J. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–1264.
- Dubey J.P., Shares G., Ortega-Mora L. M. 2007. Epidemiology and control neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 323–367.
- Dubey J.P., Thulliez P. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J. Parasitol.*, 91, 1217–1218.
- Goździk K., Cabaj, W. 2007. Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Acta Parasitol.*, 52, 295–297.