

Diagnostyka chorób zakaźnych u koni metodą PCR

W nowoczesnej diagnostyce wykrywanie patogenów metodą PCR zastąpiło w znacznej części konwencjonalne metody laboratoryjne.

Badania wykonywane techniką PCR polegają na powielaniu znanych sekwencji aminokwasów patogenu do momentu, w którym wyprodukowaną w ten sposób ilość DNA można zmierzyć. Dzięki temu metoda ta odznacza się bardzo wysoką wrażliwością i swoistością. Ponieważ istotą metody PCR jest izolacja DNA bądź RNA patogenu, prawdopodobieństwo wykrycia patogenu w jednym badaniu jest znacznie wyższe niż w przypadku technik polegających na izolowaniu przeciwciał czy metod opartych na hodowli drobnoustrojów. Po zakończeniu leczenia zwierzęcia wynik badania PCR powinien być negatywny.

Wysoka wrażliwość testów PCR wymaga staranności i dokładności podczas pobierania próbek, ponieważ nawet najmniejsze zanieczyszczenie może być przyczyną nieprawidłowego wyniku. Pod względem transportowym testy PCR są stosunkowo mało wymagające, gdyż do ich wykonania nie jest konieczna obecność patogenów zdolnych do namnażania (jak to ma miejsce np. w hodowli drobnoustrojów).

Istotne jest natomiast, aby lekarz weterynarii nadsyłający próbkę do badania dokonał właściwego wyboru pod względem lokalizacji drobnoustroju. Na przykład w przypadku wirusów i bakterii będzie to krew, w przypadku zaatakowanych narządów – wymaz lub próbka moczu itp., a w przypadku latencji – próbki odpowiednich narządów, np. węzłów chłonnych lub granulocytów.

Ponieważ technika PCR umożliwia jakościowe wykrycie danego patogenu nawet przy jego niewielkiej ilości, w przypadku uzyskania pozytywnego wyniku

konieczna jest jego krytyczna interpretacja z uwzględnieniem aspektów klinicznych. Pozytywny wynik badania PCR nie dostarcza informacji o zdolności danego patogenu do namnażania.

Materiał przeznaczony do badania powinien być transportowany w sterylnych i neutralnych pojemnikach. Próbki mogą być schłodzone (2-8°C), ale nie jest to konieczne. Możliwe jest także zamrażanie próbek, ale po rozmrożeniu nie wolno ich ponownie zamrażać.

Jeżeli materiał diagnostyczny stanowi krew, jako koagulantu należy użyć EDTA lub cytrynianu sodu. Krew pobrana na heparynę nie nadaje się do badania. Wymazy powinny być nadsyłane bez podłoża transportowego.

Dalsza część poświęconą jest chorobom zakaźnym koni, w których wskazana jest diagnostyka metodą PCR. Omówimy również materiał diagnostyczny właściwy dla każdej z opisanych chorób.

CHOROBY O PODŁOŻU BAKTERYJNYM

Borelioza

Drobnoustrojem wywołującym w Europie tę przenoszoną przez kleszcze chorobę są przypuszczalnie trzy patogenne gatunki krętka *Borrelia* z grupy *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garinii*.

Diagnostyka jest nadal bardzo trudna, zwłaszcza że na obszarach endemicznych bardzo wysoki poziom seroprewalencji obserwuje się również w populacji zdrowych koni. U koni krętkowi *Borrelia* przypisuje się szereg różnych chorobowych objawów klinicznych. Są to m.in. zaburzenia o charakterze ogólnym, objawy w obrębie stawów i kończyn, choroby skóry, oczu i serca, objawy ze strony układu nerwowego, a także zaburzenia płodności i poronienia. Równie zróżnicowana jest paleta potencjalnych materiałów diagnostycznych. U koni badanie

wykonywane jest najczęściej na podstawie próbek mazi stawowej, płynu móżgowo-rdzeniowego, a także próbek skóry. Badanie krwi jest mało skuteczne, nawet w przypadku gorączki, ponieważ drobnoustroj ten rozprzestrzenia się w tkankach, a nie poprzez krew.

Lawsonia intracellularis

Lawsonia intracellularis jest wewnątrzkomórkową bakterią Gram-ujemną i na przestrzeni ostatnich lat z punktu widzenia diagnostyki różnicowej jest coraz częściej uznawana za czynnik odpowiedzialny za biegunki u źrebiąt. Problem ten dotyczy głównie źrebiąt odstawianych od klaczy, tj. w wieku 6-7 miesięcy, u których bakteria *L. intracellularis* zagnieżdża się w komórkach nabłonka krypt jelita krętego, wywołując w obrębie jelit proliferacyjne stany patologiczne. Mogą one prowadzić do zaburzeń wchłaniania jelitowego, a także do chronicznych (z reguły) biegunk. Choroba występuje najczęściej u pojedynczych zwierząt, jednak opisywano również przypadki zachorowań u kilku zwierząt w obrębie tej samej hodowli. Ponieważ w kale zakażonych zwierząt znajduje się niewielka ilość tego patogenu, badanie PCR z odchodów stanowi jedynie pomocniczą alternatywę, przy czym znikoma liczba drobnoustrojów wydalanych tą drogą może być przyczyną nieprawidłowego wyniku negatywnego.

Leptospiroza

U koni zakażenia krętkiem *Leptospira* rozprzestrzeniającym się poprzez moczu gryzoni przebiegają z reguły bezobjawowo, co jest przyczyną wysokiej seroprewalencji u koni zdrowych (ok. 75%). Drobnoustroj dostaje się do organizmu wraz z paszą lub wodą i może wywoływać raczej niespecyficzne objawy, takie jak gorączka (często z przerwami), żółtaczką, brak łaknienia oraz ►

▷ spadek wydajności. W literaturze opisywano również poronienia. Zakażenia przenoszone z konia na konia praktycznie nie występują. Wyizolowanie DNA patogenu w przypadku stanów chorobowych o charakterze ogólnym możliwe jest na podstawie krwi pobranej na EDTA, a w stanach chorobowych o przebiegu chronicznym – na podstawie moczu.

Nawracające zapalenie błony naczyniowej oka u koni (ERU)

Dowiedziano, iż istnieje związek pomiędzy trwałą wewnątrzgałkową infekcją krętkiem *Leptospira* a nawracającym zapaleniem błony naczyniowej oka u koni, określanym również mianem ślepoty miesięcznej. Wynikające z tego reakcje autoimmunologiczne prowadzą do postępującego uszkodzenia wewnętrznych struktur oka, a nawet do oślepienia. Nawracające zapalenie błony naczyniowej można stwierdzić na podstawie badania w kierunku przeciwciał (jest to najczulsza metoda), ale także poprzez wyizolowanie antygeny metodą PCR z płynu śródgałkowego bądź z próbki ciała szklistego. Należy zaznaczyć, że miano przeciwciał w surowicy nie ma znaczenia w przypadku ERU.

Rhodococcus equi

Rhodococcus equi jest bakterią warunkowo chorobotwórczą występującą w glebie oraz w kale koni. To najczęstsza przyczyna ciężkich zapaleń płuc prowadzących do zgonów u źrebiąt w wieku od 3 tygodni do 6 miesięcy. Wrotami zakażenia i głównym miejscem bytowania drobnoustroju są płuca (w których tworzą się ropnie), skąd może ono rozprzestrzeniać się wraz z krwią do innych narządów. Druga potencjalna droga zakażenia to przewód pokarmowy (biegunki, wrzody), a także pepek. Ponadto *R. equi* wykazuje powinowactwo z kośćmi i stawami. W przypadku objawów płucnych materiałem do badania może być wymaz z nozdrza lub popłuczyny z tchawicy. Ze względu na wysoką wrażliwość metoda PCR umożliwia także identyfikację klinicznie zdrowych nosicieli. Ponieważ *R. equi* jako bakteria glebowa występuje praktycznie wszędzie, w tym również u innych gatunków (także u ludzi), nasze laboratorium wykonuje badanie PCR w dwóch etapach, izolując w drugim etapie białko vap A, czyli tzw. sekwencję plazmidu i zjadliwości, co pozwala na szybkie i prawidłowe wykrycie szczepów *R. equi* specyficznych dla koni. Plazmid ten odpowiedzialny jest za kodowanie białka A związanego ze zjadliwością (*viru-*

lence-associated protein A, vap A), które odgrywa rolę w patogenezie rodokokozy i uznawane jest za czynnik determinujący zjadliwość.

Streptococcus equi (zołzy)

Zoły to szeroko rozpowszechniona, ostra, zakaźna choroba przejawiająca się ropnym zapaleniem węzłów chłonnych i zapaleniem gardła. Jest typowa dla młodych koni i prowadzi do długotrwałego uodpornienia, dlatego rzadko występuje u starszych zwierząt. Do izolacji DNA bądź patogenu służą głównie wymazy z nozdrzy, wydzielina tchawicowo-oskrzelowa lub ropa z ropnia. W tym przypadku przewaga metody PCR nad hodowlą polega na tym, że PCR pozwala na szybsze uzyskanie wyniku przy jednoczesnie wyższej wrażliwości i specyficzności, umożliwia trafniejszą identyfikację zwierząt klinicznie zdrowych, lecz będących nosicielami patogenu, które odgrywają kluczową rolę w epidemiologii tego drobnoustroju.

Ponieważ metoda PCR nie odróżnia martwych i żywych drobnoustrojów, uzyskany wynik pozytywny należy zawsze traktować jako podejrzenie i potwierdzić hodowlą.

CHOROBY WIRUSOWE

Wirusowe zapalenie tętnic u koni (EVA)

Wirusowe zapalenie tętnic (*equine viral arteritis*) jest chorobą zakaźną o globalnym zasięgu, występującą u koniowatych i wywołowaną przez wirus EAV, czyli wirus zapalenia tętnic. Wydaje się, iż liczba potwierdzonych przypadków tej choroby wzrosła w ciągu ostatnich lat. Większość zakażeń nabytych drogą naturalną przebiega subklinicznie, mimo to dochodzi do serokonwersji. Objawy, o ile występują, są różnicowane pod względem rodzaju i natężenia. Do możliwych należą: gorączka, depresja, jadłowstręt, obwodowe obrzęki, zapalenie spojówek, pokrzywka, poronienia, a u zwierząt młodych także nagłe zapalenia płuc oraz jednoczesne zapalenie płuc i jelit. Wirus przenosi się głównie poprzez nasienie, gdyż zagnieżdża się w dodatkowych gruczołach płciowych zakażonych ogierów, skąd jest z przerwami wydalany wraz z wydzielinami narządów płciowych. Wałachy, konie w fazie dojrzewania i kłaczki nie mogą być zdrowymi nosicielami. Chore zwierzęta mogą wydzielać wirusa również z innymi wydzielinami ustrojowymi, m.in. z rozpyloną wydzieliną dróg oddechowych, z moczem lub z materiałem poronnym. Podobnie jak sperma ogierów, również wspomniane wy-

dzieliny chorych zwierząt mogą służyć jako materiał do badania RNA. U zwierząt chorych i gorączkujących RNA patogenu udaje się często wyizolować także z krwi pobranej na EDTA.

Herpeswirus koni typu 1 i typu 4 (EHV1 i EHV4)

Zakażenia herpeswirusem koni typu 1 i 4 są z reguły przyczyną chorób dróg oddechowych, przy czym natężenie objawów klinicznych uzależnione jest zwykle od wieku i statusu immunologicznego zakażonego zwierzęcia. Zakażenia herpeswirusem typu 1 mogą rozprzestrzeniać się również poza obszar błon śluzowych dróg oddechowych i wywoływać cięższe objawy choroby, takie jak poronienia, okołoporodowy zgon źrebięcia czy choroby układu nerwowego. Raz zakażone zwierzę staje się nosicielem wirusa na całe życie, przy czym w wyniku działania czynników wewnątrzpochoźnych i w niekorzystnych warunkach wirus może się ponownie uaktywnić (na przykład w sytuacjach stresowych). Obszarami utajnienia wirusa są głównie narządy limfatyczne oraz frakcje leukocytów. Do badania PCR nadają się najlepiej wymazy z nozdrzy i wydzieliny z dróg oddechowych, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także materiał poronny, w tym również łożysko. Krew może być przedmiotem badania jedynie w drugiej kolejności i tylko w fazie gorączki. Jako że frakcje leukocytów, o czym wspomniano już wcześniej, mogą stanowić obszar latencji herpeswirusa, można pokusić się również o badanie koncentratu bogatopłytkowego. Pozytywny wynik takiego badania pozwala w znacznym stopniu na stwierdzenie, iż badane zwierzę miało kontakt z herpeswirusem. Nie pozwala jednak na określenie, czy mamy do czynienia z ostrym przypadkiem, czy ze starszym zakażeniem. Natomiast w przypadku młodych zwierząt skuteczne może okazać się badanie krwi.

Końska grypa (bold)

Końską grypę wywołują dwa podtypy wirusa końskiej grypy typu A: podtyp 1 (H7N7) i podtyp 2 (H3N8), przy czym podtyp 1 w ciągu ostatnich 30 lat występował bardzo rzadko. U koniowatych podatnych na tego wirusa w następstwie zakażenia pojawia się gorączka i suchy kaszel. W nieszczepionych populacjach wirus rozprzestrzenia się bardzo szybko. Zakażeniu towarzyszą często bakteryjne infekcje wtórne objawiające się śluzoworopną wydzieliną z nozdrzy i maskujące obraz kliniczny, co ma miejsce głównie w populacjach mających częściową odporność. Szybką i prawidłową diagnozę

umożliwia badanie PCR wymazu z nozdrza, popłuczyn z tchawicy lub popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych.

PASOŻYTY KRWI

Theileria equi/*Babesia caballi* – babeszjoza (piroplazmoza)

Babeszjoza (piroplazmoza) koni jest chorobą wywołaną przez pierwotniaka przenoszonego przez kleszcze. Obszarem endemii jest większość regionów tropikalnych i subtropikalnych, choć sięga on także do stref umiarkowanych. W związku z powszechnością transportu koni oraz rozszerzaniem się obszarów występowania wektorów choroby obecnie należy się liczyć z tym, iż przypadki kliniczne, a także zwierzęta seropozytywne będą coraz częstszym zjawiskiem również w naszym kraju. Chorobę wywołuje pierwotniak *Babesia caballi*, względnie *Theileria equi*, którego obecność można stwierdzić w czerwonych krwinkach zakażonych zwierząt. Objawy kliniczne mają często charakter nieswoisty, a choroba może mieć przebieg zarówno bardzo ostry, jak i przewlekły. Do charakterystycznych objawów należą: gorączka (często z przerwami), brak łaknienia, przyspieszony oddech i tętno, stany depresyj-

ne, żółtaczkę i obecność hemoglobiny w moczu, a w postaci przewlekłej – utrata wagi. Zakażone zwierzęta pozostają przez długi czas nosicielami, stanowiąc źródło zakażenia dla wektorów. Materiałem do badania PCR jest krew pobrana na EDTA. W pierwszym etapie badania prowadzone jest pod kątem obecności obu pierwotniaków, tj. *B. caballi* i *T. equi*. Jeżeli wynik jest pozytywny, metodą sekwencjonowania można dokładnie określić, czy mamy do czynienia z *B. caballi*, czy *T. equi*.

Anaplazmoza (erlichioza)

Patogenem odpowiedzialnym za erlichiozę granulocytarną u koni jest *Anaplasma phagocytophilum* (wcześniej *Ehrlichia equi*). Jest to Gram-ujemna bakteria bezwzględnie wewnątrzkomórkowa o ziarenkowatym kształcie, przenoszona przez kleszcze, która stanowi poważny problem w Europie. Drobnoustroj po wnikięciu do organizmu rozprzestrzenia się wraz z limfą i krwią, a następnie zasiedla komórki docelowe, czyli granulocyty obojętnochłonne i eozynofile. Początkowo infekcja objawia się gorączką, apatią, obrzękiem kończyn i awersją do ruchu. Z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej ob-

serwuje się małopłytkowość, lekką niedokrwistość i wysoki poziom bilirubiny. U zwierząt dorosłych w wieku powyżej 4 lat objawy są znacznie bardziej wyraźne niż u młodych koni. Po przebytej chorobie koń nabywa odporność utrzymującą się przez ok. 2 lata, niezależnie od tego, czy zakażenie jest utajone, czy zwierzę jest nosicielem.

Badanie DNA wykonuje się na podstawie krwi chorego zwierzęcia pobranej na EDTA ok. 5 dni po wnikięciu patogenu do organizmu, czyli w momencie wystąpienia gorączki, natomiast wykrycie pasożyta metodą mikroskopową możliwe jest dopiero po upływie ok. 5 dni od wystąpienia gorączki. □

LABOKLIN

dr Elisabeth Mueller
dr Antje Woekener
Laboklin Polska Sp. z o.o.
01-495 Warszawa
ul. Powstańców Śląskich 101
tel. 0 800 100 101
tel. 022 691 93 10-12
e-mail: lab.warszawa@laboklin.pl

reklama ■