

## BRUCELIOZĖS Palyginamieji tyrimai Lietuvoje

Vidmantas Paulauskas<sup>1</sup>, Irena Michalskienė<sup>1</sup>, Jūratė Buitkuvienė<sup>1</sup>, Marija Stankevičienė<sup>2</sup><sup>1</sup>Nacionalinė veterinarijos laboratorija, J. Kairiūkščio g. 10, LT-2021 Vilnius; tel.: (8-5) 272 9084; el. paštas: nvl.lt<sup>2</sup>Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; tel.: (8-37) 36 19 02; el. paštas: marija@lva.lt

**Santrauka.** Bruceliozė diagnozuojama pagal epizootinius, klinišnius duomenis, serologinius bei bakteriologinius tyrimų rezultatus. Darbo tikslas – nustatyti gyvulių (galvijų, avių, ožkų) bruceliozės epizootinę situaciją Lietuvoje.

Epizootijai ir palyginamiesiems bruceliozės tyrimams imtas galvijų, avių, ožkų bei laukinės faunos kraujo serumas. Tyrimai atlikti standartiniais serologiniais metodais: lėtinės agliutinacijos (LA), komplemento sujungimo (KS), buferizuoto bruceliozės antigeno (BBA) ir imunofermentinės analizės (IFA). Ištirti 2 330 (galvijų, avių, ožkų ir laukinės faunos) kraujo mėginiai: 1 262 galvijų, 596 avių, 153 avinų, 102 ožkų ir 217 laukinės faunos. Taikant standartinius metodus, skirtingi tyrimų rezultatai nustatyti 12-os galvijų ir vieno kiškio serumo mėginiuose. Tiriant galvijų kraujo serumo mėginius LA metodu nustatyta 11, KS metodu – 5 ir BBA metodu – 6 teigiami mėginiai, o tiriant IFA metodu visi mėginiai buvo neigiami. Vieno kiškio kraujo tyrimo rezultatai, taikant BBA, LA, KS ir IFA metodus, buvo teigiami. Bruceliozė patvirtinančiu testu pripažintas KS metodas. Kiškio bruceliozė patvirtino bakteriologinis tyrimas – išskirta *Brucella abortus*.

**Raktažodžiai:** bruceliozė, gyvūnai, diagnostika, serologinės reakcijos, palyginamieji tyrimai.

## COMPARATIVE DIAGNOSTIC TESTING OF BRUCellosIS IN LITHUANIA

**Summary.** The blood sera from cattle, sheep, goats and hares were taken for the comparative diagnostic studies of brucellosis in Lithuania. The reaction of agglutination (Agg), complement fixation (CFT) and enzyme linked immunoferrment assay (ELISA) were used. The comparative analysis of 2 330 samples was performed, which were 1 262 blood sera samples from cattle, 749 from sheep, 102 from goats and 217 from wildlife. The different diagnostic methods showed that only 12 sera samples from cattle and 1 sample from wildlife were different. Although, by Agg test 11 samples and by CFT 5 samples were positive, however, the ELISA test was negative in all samples. ELISA test, by use International standart serum (BgVV, Germany), showed low OD of 12 cattle sera, however, OD of 1 hare serum sample was high. Further, the hare serum sample was positive to *Brucella abortus*.

**Keywords:** brucellosis, animals, diagnostics, serological reaction, comparable testing.

**Ivadas.** Ligą sukelia *Brucella* genties bakterijos: galvijams – *Brucella abortus*, ožkoms – *Brucella melitensis*, avims – *Brucella ovis*, žiurkėms – *Brucella neotomae*, šunims – *Brucella canis*, kiaulėms – *Brucella suis*. Visos jos labai panašios, tačiau turi tam tikrų ypatumų. Brucelės – labai mažos gramneigiamos (0,3–0,5 x 0,5–1,5 μm) bakterijos, nejudrios, nesudaro sporų, tačiau tam tikromis aplinkybėmis gali suformuoti kapsules. Tai gana atsparūs mikrobai, gyvi išsilaiko mėnesius (ypač šaltu metų laiku). Dirvoje išgyvena 20–100 dienų, vandenyje nuo 6 dienų iki 5 mėnesių, svieste – 25–67, o ir sūryje net 42 dienas. Pakaitintuose iki 70° C skysčiuose jos žūva per 5–10 minučių, verdančiuose – momentaliai. Brucelės neatsparios dezinfekuojamiesiems tirpalams. Šios trys bruceliozės sukėlėjų rūšys yra pačios svarbiausios, nes savo ląstelės sienelėje turi O-polisacharidą (OPS). Tai yra liposacharido molekulės dalis, chemiškai apibūdinama taip: 4,6-didezoksi-4-formamido-alfa-D-manozės homopolimeras, susijungęs 1,2-glikozidinėmis jungtimis. Kitos svarbios rūšys, savo ląstelių paviršiuje turinčios OPS, yra *B. ovis* ir *B. canis*. Trys pagrindinės rūšys, turinčios OPS, diagnozuotos serologiškai naudojant ląstelės antigeną arba išgrynintus lipopolisacharidus (SLPS), kurie išgauti chemiškai.

*B. ovis* ir *B. canis* rūšys daugiausia diagnozuojamos naudojant neapdorotus lipopolisacharidus (RLPS) arba baltymų antigenus (Chukwu, 1987). *B. neotoma*, aptikta žiurkių organizme (retai diagnozuojama), ir kitos *Brucella*

rūšys, aptiktos jūriniuose žinduoliuose, gali būti nustatomos serologiškai naudojant *B. abortus* antigeną (Nielsen et al., 1990; Foster et al., 1996). Kadangi *B. abortus*, *B. melitensis* ir *B. suis* SLPS išgryninti lipopolisacharidai yra panašūs, visi serologiniai testai šių bakterijų antikūnams utilizuoja *B. abortus* antigeną (Corbel et al., 2000), o *Brucella* rūšys diagnozuojamos naudojant bet kokios rūšies antigenus (Morgan, 1982; Gerbier et al., 1998). Dėl to daugumai diagnostinių testų naudojamas *B. abortus* antigenas. Šie testai yra pagrindiniai.

Apie žmonių bruceliozės serologinę diagnostiką nekalbama, nes tie patys testai tinka ir gyvūnų, ir žmonių serologinei diagnostikai. Antikūnas, reaguojantis su *B. abortus*, esančia galvijuose, susideda iš ankstyvojo IgM reaguojančio izotipo, todėl pats tyrimas priklauso nuo gyvulio užsikrėtimo laiko, bakterijų kiekio ir sveikatos būklės (Alton et al., 1988). Dėl gaminamų IgG1 antikūnų reakcija vyksta beveik staiga, o vėliau – dėl mažo IgG2 ir IgA kiekio (Verger et al., 1985; Corbel, 1989; Nielsen et al., 1990). Dauguma kryžmai reaguojančių antikūnų yra iš kitokių mikroorganizmų nei *Brucella* rūšys ar aplinkos antigenai, daugiausia susideda iš IgM (Corbel, 1985). Serologiniai testai, kurie nustato IgM, gali būti traktuojami kaip netinkami, nes jų specifiskumas menkas. Kadangi IgG2 ir IgGA antikūnai pradeda kauptis kiek vėliau, dažnai jų esti mažai, jų kiekis nepastovus, pagrindinis izotipas serologinėms reakcijoms yra IgG1

(Nielssen et al., 1990; Pouillot et al., 1998; Uzal et al., 1996). Taigi tyrimai, kuriuose vyrauja IgG1, yra patys tikslingiausi.

Bruceliozė – tai zoonozė, išplitusi visame pasaulyje. Žmonės užsikrečia kontaktuodami su infekuotais gyvūnais arba maisto produktais (pienu, sūriu, mėsa). *Brucella melitensis* išplitusi Viduržemio jūros šalių regione. Šia rūšimi užsikrečia avys ir ožkos. Žmonėms liga žinoma kaip Maltos karščiavimas. Pagrindiniai infekcijos požymiai yra netolygus karščiavimas, dažnos komplikacijos lėtinės eigos metu. *Brucella abortus* iš abortuotų gyvulių vaisiaus išskyrė B. Bang (1897). *B. suis* pirmą kartą aprašyta 1914 metais. Prie infekcijos, kurios sukėlėjas *B. suis* (biotipas 1 ir 3 kiaulėms), lėtinės agliutinacijos (LA) metodas kraujo serume rodo nežymų arba nerodo jokio antikūnų susidarymo. Komplemento sujungimo (KS) metodas kiaulėms yra kiek specifiškesnis, bet titrai gali būti labai žemi arba neigiami. Tik silpnai patogeninis žmonių *B. suis* (biotipas 2) sukelia kiaulėms aukštus titrus (Wrathall et al., 1993), o galvijams – labai silpnas abejotinas reakcijas (Godfroid, 1995). *B. ovis* nustatyti LA metodas netinka dėl spontaniškos antigeno agliutinacijos, todėl *B. ovis* sukeltos infekcijos tyrimui taikomas tik KS metodas.

Galvijų bruceliozės protrūkis Lietuvoje užregistruotas 1991 metais, o paskutinis židinytis likviduotas 1992-aisiais. Nustatyta, kad tais metais ūkis A buvo pirkęs galvijų iš Kaliningrado srities. Ilgametė gamtinių infekcinių ligos židinių tyrimų analizė rodo, kad situacija šalyje kasmet keičiasi, laukinėje faunoje bruceliozės paplitimas siekia 0,4% (daugiausia serga kiškiai). Bruceliozės sukėlėjo perdavimo keliai labai įvairūs: dažniausiai sukėlėjas, iš organizmo išskiriamas į aplinką, kurį laiką būna aplinkoje, tada vėl patenka pas naują šeimininką.

Liga diagnozuojama iš pataloginės medžiagos išskiriant ir identifikuojant bruceles. Bruceliozė nustatoma pagal epizootinius, klinikinius duomenis, serologinių bei bakteriologinių tyrimų rezultatus. Atliekant serologinius bandų tyrimus dažnai naudojami keli testai – tai dalis nacionalinio bruceliozės likvidavimo projekto schemas. Bruceliozės tyrimų stebėsenos programoje buvo tirti 2 317 gyvūnų kraujo serumo mėginiai. Tyrimai atlikti taikant buferizuoto bruceliozės antigeno (BBA), Raito (Wright ir Smith, 1897) lėtinės agliutinacijos (LA), komplemento sujungimo (KS) ir imunofermentinės analizės IFA (angl. ELISA) metodus.

Bruceliozės testų gamintojai laikosi ES direktyvos (64/432 1964, papildytos 1991 m. birželio 26) reikalavimų. Tuo būdu pakanka patikrinti gamintojo pateiktą medžiagą dėl rinkinių sudėties atitikimo ir jų veiklumo.

**Darbo tikslas** – nustatyti gyvulių (galvijų, avių, ožkų) bruceliozės epizootinę situaciją Lietuvoje.

Uždaviniai:

1. Atlikti galvijų, avių, ožkų, avinų ir laukinės faunos kraujo serumo tyrimus bruceliozės atžvilgiu.

2. Atlikti palyginamuosius tyrimus įvairiais metodais bei diagnostiniais rinkiniais.

**Medžiagos ir metodai.** Darbas atliktas 2002 metais 13-oje Lietuvos Respublikos rajonų. Tirti įvairių gyvūnų

kraujo serumo mėginiai. Serologiškai ištirti 2 330 kraujo mėginiai: 1 262 galvijų, 596 avių, 153 avinų, 102 ožkų ir 217 laukinės faunos.

Tyrimų metodai – buferizuotas bruceliozės antigeno metodas (BBA) arba Roz Bengal (RBR) greitos agliutinacijos metodas.

Naudoti diagnostikumai: antigenas BGAF 146, teigiamas BGAF 004 (500 TV/ml) ir neigiamas BGAF 037, kontroliniai serumai iš BgVV (Vokietija) ir Puorquier instituto (Prancūzija).

A. E. Wright ir F. Smith 1897 metais aprašė pirmąjį bruceliozės serologinį testą. Tai labai panašu į standartinį agliutinacijos testą mėgintuvėlyje, mūsų šalyje tebe naudojamą daugiau kaip 50 metų. Tarptautinis epizootijų biuras rekomenduoja jį nutraukti, nors EB direktyvos jį dar rekomenduoja.

Kai IgM antikūnų izotipas yra aktyviausias agliutininas prieš neutralaus ar šiek tiek žemesnio nei neutralus pH (Garin-Bastuj, 1995; Corbel, 1985; Nielsen et al., 1990), dėl kryžmai reaguojančių antikūnų agliutinacijos testas yra klaidingai jautrus teigiamoms reakcijoms.

Mūsų tyrimuose buvo naudota lėtinės agliutinacijos mikrometodas (LA).

Naudoti diagnostikumai:

– antigenas (*B. abortus*), 10 kartų koncentruotas BGAF–001, teigiamo BGAF–004 (500 TV/ml) ir neigiamo BGAF–037 kontroliniai serumai iš „BgVV“ (Vokietija) ir Puorquier instituto (Prancūzija);

– *B. melitensis* – 10 kartų koncentruotas, avių ir ožkų bruceliozei nustatyti, naudotas BGAF–002 gamintojo „BgVV“ (Vokietija). Jersiniozei nustatyti taip pat naudota lėtinė mikroagliutinacija.

Tyrimo diagnostikumai: antigenas *Y. enterocolitica* O9 BGAF–19 (1:10), teigiamo BGAF–20 ir neigiamo BGAF–046 kontroliniai serumai;

*Y. enterocolitica* O3 antigenas BGAF–027, teigiamo BGAF–026, neigiamo BGAF–046 kontroliniai serumai (gamintojas „BgVV“, Vokietija).

Komplemento sujungimo (KS) reakcija atlikta dviem būdais: vienu, kurį standartizavo W. K. W. Hill 1963 metais, ir kitu, standartizuotu D. J. MacKinnon 1963 metais, bet procedūros iš esmės identiškios, varijuoja tik su pirmine inkubacijos temperatūra ir laiku, t. y. 37° C vienai valandai arba 4° C aštuoniolikai valandų.

Nepaisant metodo trūkumų, KS yra vertingas bruceliozės kontrolinei ir stebėsenos programoms. Kaip patvirtinantį testą tarptautinei prekybai jį rekomenduoja Tarptautinis epizootijų biuras (OIE).

Naudoti diagnostikumai: antigenas *B. ovis* BGAF–030 (skiedžiama 1:25), teigiamo BGAF–040 1000 Sen V./ml ir neigiamo BGAF–036 kontroliniai serumai iš „BgVV“ (Vokietija); komplementas ir hemolizinas (1:15000) pagaminti Kursko biofabriko (Rusija); veronalinis buferis pagamintas Puorquier institute (Prancūzija) ir ką tik paimti avino eritrocitai.

Netiesioginę imunofermeninę analizę 1976 metais sukūrė grupė mokslininkų žmonių bruceliozei diagnozuoti. Nuo tada aprašyta daug įvairių analizės variantų (apžvelgta Nielsen, 1990; Gallien, 1998), tačiau

dažniau taikomas yra toks, kai polistirolu plokštelės matrica pasyviai padengta SLPS antigenu.

Imunofermeninės analizės metodo (IFA) principas: polistirolu mikroplokštelės šulinėlis padengiamas LPS *Brucella abortus*; individualūs serumo arba jungtiniai mėginiai skiedžiami ir inkubuojami šulinėliuose; brucelės specifiniai antikūnai, esantys mėginyje, sudarys LPS – antikūno imunokompleksą ir taip pasiliks surišti šulinėliuose. Išplautas anti-IgG peroksidazės konjugatas pilamas į šulinėlius, susiriša su imunokompleksu. Išplautas baltymo substratas (TMB) sudedamas į konjugatą ir sudaro mėlyną mišinį. Geltonu jis tampa po blokavimo. Spalvos intensyvumas proporcingas antikūno koncentracijos lygiui serumo mėginyje. Teigiamas lygis nustatomas iš teigiamo kontrolinio serumo, kuris pilamas į kiekvieną mikroplokštelę. Kontrolinio serumo reagentas yra standartizuotas, kad duotų rezultatus, atitinkančius Europos Sąjungos direktyvas (ES 64/432 papildytos 1984 m. gruodžio 11 ir 1991 m. birželio 26).

Metodas tinka individualiems ir jungtiniams (iki 10 serumų) mėginiams. Bandinio kokybę lengvai apskaičiuojama. Duomenys dažnai reiškiami reaktyvumo procentais nuo teigiamo serumo kontrolės. Šio testo versija, naudojant išgrynintą SLPS kaip antigeną, aprobuota Tarptautinio epizootijų biuro (OIE Manual, 2000).

Šis imunofermeninės analizės metodas gali būti taikomas ožkų ir avių *B. melitensis* antikūnams aptikti. IFA metodo trūkumas – negali atskirti vakcininių antikūnų, atsirandančių nuo *B. abortus* S19 arba *B. melitensis* vakcinų, nuo patogeninės kilmės antikūnų (Nielsen, 1990; Gallien et al., 1998).

*Brucella ovis* taip pat gali būti diagnozuota IFA metodu. Tai papildomas OIE testas, nors ir nestandartizuotas, bet dažniausiai daug jautresnis ir specifiškesnis nei KS ar IDAG (Uzal et al., 1996; Pouillot et al., 1998).

Galvijų tyrimui naudoti trys dviejų firmų komerciniai rinkiniai:

1. „Pourquier“ individualiems serumams, serija 129 (Prancūzija);
2. „Bommeli bgaf-b-023“, serija BRA1111-7541 (Šveicarija);

3. „Pourquier“ individualiems serumams ir jungtiniams, serija 239 (Prancūzija).

Vertinimo kriterijai:

1. „POURQUIER“ individualiam serumui, serija 129 (Prancūzija), santykis mėginio su teigiama kontrole (% M/T) yra: ≤ 90% neigiama, ≤ 100% abejotina, ≥ 100% teigiama;
2. „BOMMELI BGAF-Ba023“, serija BRA1111-7541 (Šveicarija), santykis mėginio su teigiama kontrole (% M/T) yra: <70% neigiama, 70-100% abejotina, >100% teigiama;
3. „POURQUIER“ serija 239 (Prancūzija), individualiam serumui ir jungtiniams, kurio santykis mėginio su teigiama kontrole (% M/T) yra: ≤ 90% neigiama, ≤ 100% abejotina, ≥ 100% teigiama.

Duomenys grafiškai pateikti „Microsoft Excel 7,0“ programa.

**Tyrimų rezultatai.** Serologiškai ištirta 2 330 kraujo mėginių: 1 262 galvijų, 596 avių, 153 avinų, 102 ožkų ir 217 laukinės faunos. Tyrimai atlikti šiais metodais: LA, KS, BBA ir IFA (IFA analizuota penkiais variantais, naudojant dviejų skirtingų firmų rinkinius). Aiškinantis galvijų bruceliozės epizootinę situaciją ištirta: karvių – 974 (77%), bulių – 116 (9,2%), telyčių – 172 (13,6%). Galvijai buvo iš 618 Lietuvos rajonų ūkių.

Neigiami rezultatai rasti 596 avių, 153 avinų, 102 ožkų, 261 laukinių ir 1 250 galvijų. Skirtingi rezultatai nustatyti 12-ai galvijų ir vieno kiškio kraujo serume. Tyrimai atlikti LA, KS, BBA ir IFA metodais septyniuose Lietuvos apskrityse.

Ištirti 1 250 galvijų jersiniozės atžvilgiu. Į *Yersinia enterocolitica* O9 kamieną teigiamai reagavo 26 karvės ir viena telyčia – 2,16% (1 lentelė).

*Yersinia enterocolitica* O9 kamieno tyrimo rezultatai tokie:

1 titre – 1:40; 5 – 1:80; 1:160; 2 (KS 21TV/ml) *Y. enterocolitica* O9 kamieną rodė 1:320; 1 (KS 37TV/ml) *Y. enterocolitica* O9 kamieną rodė titrą 1:640; 1 (KS 250TV/ml) *Y. enterocolitica* O9 kamieną rodė 1:5120 titrą.

1 lentelė. Galvijų jersiniozės tyrimai

Apskritis	Ištirta	<i>Y. enterocolitica</i> O9	Teigiamų sk.	%
Alytaus	169	1:160 1:320	3 1	2,37
Vilniaus	515	1:160 1:320 1:640	10 2 3	2,90
Utenos	180	1:320	1	0,56
Tauragės	351	1:160	2	0,57
Kauno	21	1:320	1	8,34
Marijampolės	12	1:320	2	16,67
Šiaulių	2	1:1 280 1:5 120	1 1	
Iš viso:	1 250		27	2,16

Galima teigti, kad atpažinti tikrą brucelės infekciją tikrai nelengva. Ištyrus 1 262 galvijų *Y. enterocolitica* O9 kamienu rasta 21 (1,68%) teigiamas, iš jų 12 galvijų serumo mėginiuose nustatyta *Y. enterocolitica* O9

kamienu 6 teigiami (50%).

Serumų analizei pateikta 12-os galvijų ir vieno kiškio tyrimų LA, BBA, KS ir IFA (rink.1, 2, 3, 4, 5) metodais rezultatai (2 lentelė).

2 lentelė. Galvijų bruceliozės palyginamieji serologiniai diagnostiniai metodai

Galvijų indentifikavimo Nr.	LA TV/ml	KS Sen.V/ml	BBA	IFA (%)					Jersiniozė (O9) tyrimai	
				rink. 1	rink. 2	rink. 3 (jungt. iš 5)	rink. 4 (jungt. iš 10)	rink. 5	LA 1:	kryž. (+)
1. 01033900	105	21	-	16	12	22	28	32	1:80	4+
2. 01750711	420	21	±	17	9	27	12	24	1:320	4+
3. 01738521	149	-	-	21	7	28	18	22	1:40	4+
4. 01856388	88	-	-	14	6	12	16	19	1:320	4+
5. 01305865	52	-	++	18	11	23	11	16	1:80	4+
6. 01562988	210	21	++	15	12	11	14	18	1:320	4+
7. 01593848	841	37	±	12	10	27	19	30	1:640	4+
8. 01124805	105	-	-	14	5	16	26	26	1:80	4+
9. 01130936	105	-	-	15	6	19	29	28	1:80	4+
10. 01126419	52	-	++	19	7	23	19	29	1:80	4+
11. 01842878	<30	-	-	16	4	19	23	11	1:160	2+
12. 01351690	3364	250	±	22	8	24	28	16	1:5120	2+
13-(kiškis)	940	37	++++	314	539	328	320	320	-	-
Kontrolės										
Vid.kontr.	500	500	++++	116	194	154	170	149	-	-
Stand. ser.	≥6000	≥8000	++++	539	558	528	536	544	-	-
Stand. ser.	2000	≥167	++++	539	438	521	509	512	-	-
Vertinimas teigiamas	≥30 TV/ml	≥20 Sen.V/ml	60%	Rezultatų vertinimas gamintojų nurodymais					1:160	
abejotinas neigiamas	<30 TV/ml	<20 Sen.V/ml	40%							
Apskaičiavimas teigiamas	92%	46%	54%	8%	8%	8%	8%	8%	46%	
abejotinas									39%	
neigiamas	8%	44%	46%	92%	92%	92%	92%	92%	15%	

Metodams palyginti naudoti standartiniai serumai: BgVV standartinio bruceliozės serumai (Zul. Nr. BGAF-003) iš galvijų su 1 000 tarptautinių vienetų ml lėtineje aglutinacijoje (LA), 1 000 sensibilizacijos vienetų ml komplemento sujungimo reakcijoje (KS) ir 4 kryžių buferizuoto bruceliozės antigeno (BBA) metodu.

Analizuojant tyrimų rezultatus, pateiktus 2 lentelėje, matome, kad:

LA – 11 galvijų (iš 12) ir vieno kiškio serumo mėginiai rodė teigiamus rezultatus. Metodas yra mažiau jautrus ir specifiškas nei kiti ir turėtų būti taikomas tik tada, kai negalima disponuoti kitais metodais;

BBA – 6 galvijų (iš 12) ir vieno kiškio serumo mėginiai rodė teigiamus rezultatus. Metodas tinka bandų ir atskirų gyvūnų tyrimams, bet neaiškius rezultatus reikia patvirtinti KS arba IFA metodais;

KS – 5 galvijų (iš 12) ir vieno kiškio serumo mėginiai rodė teigiamus rezultatus. Metodas tinka bandų ir atskirų gyvūnų tyrimams;

IFA – 12 galvijų rezultatai neigiami, o vieno kiškio serumas rodė teigiamus rezultatus. Metodas tinka bandų ir

atskirų gyvūnų tyrimui, jautrus, specifinis ir prilyginamas KS metodui. Bandymų rezultatams palyginti naudotas tarptautinis standartinis serumas, skiestas 1:105 (=100%).

*Yersinia enterocolitica* O9 kamienu tyrimo rezultatai šie: 1–1:40 titre; 5–1:80; 2 (KS 21TV/ml) *Y. enterocolitica* O9 kamienu rodė 1:320; 1 (KS 37TV/ml *Y. enterocolitica* O9 kamienu rodė titrą 1:640; 1 (KS 250TV/ml) *Y. enterocolitica* O9 kamienu rodė 1:5120 titrą.

Tirtos Švenčionių, Ukmergės, Kauno, Kaišiadorių, Raseinių, Radviliškio ir Utenos rajonų ožkos ir avys (ožkų – 102, avių – 596). Tyrimai atlikti BBA (*B. abortus*, *melitensis*, *sis*) ir LA (*B. melitensis*) metodais. Analogiškai KS ir IFA metodais ištirti 153 avinai Radviliškio, Kaišiadorių, Utenos, Šalčininkų, Biržų, Ignalinos rajonuose ir Elektrėnų mieste. Gauti rezultatai – identiški

(pirmą kartą naudotas diagnostikumas IFA (*B. ovis*) firma „Bommeli“ (Šveicarija). Iš laukinės faunos kraujo serumo mėginių vienas teigiamas buvo kiškio (3 lentelė).

## 3 lentelė. Laukinės faunos bruceliozės tyrimai

Ištirta		Tyrimų metodai			Rezultatai	
Gyvūnų rūšis	Skaičius	BBA	LA	KS	neigiami	teigiami
Šernai	83	10	83	57	83	-
Stirnos	97	12	97	76	97	-
Elniai	8	1	8	5	8	-
Kiščiai	23+1	2	23	21	23	1
Briedžiai	4	2	4	3	4	-
Iš viso:	217				216	1

**Rezultatai ir jų aptarimas.** Vykdamas bruceliozės likvidavimo programą, diagnostikoje naudojama keletas serologinių testų. Tyrimai atlikti serologiniais metodais – BBA, LA, KS ir IFA. Programos veiklos tikslas buvo palyginti skirtingus serologinius metodus, įrodant galvijų sveikų bandų statusą bruceliozės atžvilgiu Lietuvoje. Ištirus 1 262 galvijus – 596 avavedes, 153 avinus, 102 ožkas ir 217 laukinės faunos mėginių – nustatyta, kad 1 250 galvijų – 596 avavedžių, 153 avinų, 102 ožkavedžių ir 217 laukinės faunos atstovų kraujo mėginiuose bruceliozės nerasta. Teigiamų reakcijų rasta 12-os galvijų (0,95%) ir vieno kiškio kraujyje. Teigiamą reakciją buvo: LA – 11 (0,88%) galvijų ir vieno kiškio kraujo mėginiuose; BBA – 6 (0,48%) galvijų ir vieno kiškio; KS – 6 (0,48%) galvijų ir vieno kiškio kraujo mėginyje; IFA – vieno kiškio kraujo mėginyje. Ištirus jersiniozę (*Y. enterocolitica* 09) LA metodu, teigiamų galvijų rasta 27 (2,14%) – daugiausia karvių. IFA metodu tyrimai atlikti trimis dviejų firmų komerciniais rinkiniais. Galvijų kraujo serumo tyrimo rezultatai buvo neigiami. Tik kiškio kraujas rodė ryškiai teigiamą rezultatą, kuris buvo patvirtintas bakteriologiškai – išskirta *B. abortus* kultūra. Taigi galima teigti, kad serologinių rezultatų vertinimą tikrai apsunkina serologinės kryžminės ir (ar) pašalinės reakcijos, o bruceliozės diagnozė reikalauja kuo patikimesnių metodų. Tyrimais nenustatyta, kad gyvūno amžius, rūšis ar fiziologinė būseną mėginio ėmimo metu būtų turėję kokią nors reikšmę. Gyvūnai, kurie galėjo patirti stresą ar dėl jų neštumo organizmas būtų klaidingai reagavęs teigiamai, nebuvo pažymėti. Tirta 76,9% karvių, 9,4% bulių, 13,7% telyčių; 20,43% avinų, 79,58% avavedžių. Tirti daugiausia mažų ūkių, laikančių po vieną ir dvi karves (1,58%), nors galvijų ir kiaulių laikytojų šalyje yra per 200 tūkst., avių per 800, ožkų per 2 tūkst. M. J. Corbel ir kitų mokslininkų nuomone (1996), klaidingi teigiami ir klaidingi neigiami rezultatai gali būti esant veršingai karvei, nes infekuoti gyvūnai inkubacijos laikotarpiu, kolostraliniu periodu užkratą perduoda jaunikliams. Tokie rezultatai gali būti ir dėl kitų susirgimų.

Literatūros duomenimis, serologinės kryžminės reakcijos pasitaiko ir tarp atskirų brucelės rūšių. Nustatyta, kad serologiniais metodų rezultatais atskirti infekcijos sukėlėjo *B. melitensis*, *B. abortus* ir *B. suis* rūšių negalima (Alton et al., 1988). Serologinėje diagnostikoje šių trijų brucelės rūšių infekcijai nustatyti naudojami bendri antigenai, kurie gaminami iš grynų 99

arba 1119 *B. abortus* kamienų. Tie patys brucelių kamienai, tik nudažyti hematoksilinu, naudojami *Rosa Bengal* metodui, o nudažius kristalinio gencianvioleto dažais, naudojami pieno žiedo reakcijoje. KS antigenas specialiu metodu ruošiamas iš grynos 99 arba 1119 S užmuštų *B. abortus* kamieno ląstelių (Alton et al., 1998; Hill, 1963) ir titruojamas standartiniu tarptautiniu *B. abortus* serumu (ISABS) pagal OIE, kaip ir kiti bruceliozės antigenai. Dėl antigenų giminingumo su kitais sukėlėjais (mūsų atveju – su *Yersinia*) rastos įvairių laipsnių serologinės reakcijos, o ištirus 1 262 galvijų serumą nustatyta 2,16% reaguojančių į *Yersinia enterocolitica* O9 kamieną.

Serologinių rezultatų vertinimą tikrai apsunkina daugybė serologinių kryžminių ir (ar) pašalinių reakcijų, o bruceliozės diagnozavimas reikalauja kuo patikimesnių metodų.

Minėti ir taikyti metodai nepadedą išvengti kryžminių reakcijų. Bandose, kur bruceliozės nėra, jos kelia problemų, ir turi būti kreipiamas dėmesys į bruceliozės specifinių antigenų nustatymą, nors šiuo metu pasaulyje tai didelė problema (Kittelberger et al., 1998). Galima daryti išvadą, kad konjugatas vis dėlto geba IFA rezultatus priartinti prie LA rezultatų, kurie nustato (IgM ir IgG2) klases, arba prie KS (IgG1) rezultatų. K. Nielsen 1990 metais nustatė, kad IgG2 antikūnų reikšmė reakcijai yra gerokai mažesnė nei IgG1.

Palyginimui pateikti skirtingi IFA komerciniai rinkiniai, kurie buvo naudojami su BgVV tarptautiniu substandartiniu serumu (Ty). Pagal 3 lentelėje pateiktus serumų duomenis palyginami kiekvieno IFA rinkinio kontrolės kriterijai su pateiktu pagrindiniu (BgVV) standartiniu. Šalia pateikti kontroliniai serumo KS rezultatai.

Serologiniais bruceliozės tyrimo metodais dažniausiai nustatomos imunoglobulino klasės pagal:

- + = nustatyta pagrindinę Ig klasę;
- (+) = nustatyta nedideliu laipsniu Ig klasę;
- = nenustatyta Ig klasę (Morgan, 1982).

Serologinių tyrimų metodų parinkimas turi didelę įtaką nustatant imuninių globulinų (Ig) klasių rūšis ir kiekį, nes jie bruceliozės infekcijos eigoje keičiasi. Imunologiniai metodai pagrįsti specifine antigeno ir antikūno sąvoka. Antigeno ir antikūno reakcija yra griežtai specifinė, o reakcijos produktas – antigeno ir antikūno kompleksas – pasireiškia susidarant precipitatu arba agliutinatu. Reakcijų jautrumas ir specifiskumas priklauso nuo antikūno ir antigeno grynumo.

**Išvados.**

1. Atlikus galvijų, avių, ožkų bruceliozės tyrimus įvairiais metodais (LA, BBA, KS ir IFA), teigiamų atvejų nerasta, išskyrus vieno kiškio kraujo serumą.
2. Ištirus 217 laukinės faunos mėginius, vienas teigiamas atvejis nustatytas iš kiškio kraujo serumo.
3. Bruceliozei paneigti nepakanka įvertinti kryžminės reakcijos. Būtina atlikti ir bakteriologinius tyrimus.

## Literatūra

1. Alton G.G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche

- Agronomique (INRA). Paris.1988. P. 190.
2. Bang B. The etiology of epizootic abortion. J. Cong. Pathol. Ther. 1897. P. 125.
  3. Chart H. O., Okubadejo A., Rowe B. The serological relationship between *Escherichia coli* O 157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. Epidemiol. Infect. 1992. N. 108. P. 77–85.
  4. Chukwu C. C. Differentiation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype O9 infections in cattle: the use of specific lymphocyte transformation and brucellin skin test. The Veterinary Quarterly. 1987. N.9. P. 134–141.
  5. Corbel M. J. Brucellosis: Epidemiology and prevalence worldwide. In: Young E. J., Corbel M. J. eds. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. Boca Raton. FL: CRC: Press.1989. P. 25–40.
  6. Corbel M., Recent J. Advances in the Study of *Brucella* Antigens and their Serological Cross-Reactions. Vet. Bull. 55, 1985. N.12. P. 927–942.
  7. Corbel M. J., MacMillan A. P. Bovine Brucellosis. OIE/WHO Manual of Standard for Diagnostic Tests and vaccines, 3<sup>rd</sup> ed. 1996. P. 240.
  8. Corbel M. J., MacMillan A. P. Bovine Brucellosis. OIE/WHO Manual of Standard for Diagnostic Tests and vaccines, 4<sup>th</sup> ed. 2000. P. 314.
  9. Foster G., K. L., Jahans R. J., Reid H. M. Ross Isolation of *Brucella*-species from cetaceans, seals and an otter. Vet. Res. 1996. N.138. P. 583–586.
  10. Gallien P., C. Dorn, G., Alban C., Staak, D. Protz. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected Cattle by polymerase chain reaction Vet. Rec.1998. N. 142. P. 512–514.
  11. Garin-Bastuj I. B. Valeurs des classiques de depistage/Diagnostic de la brucellose animale Coleque Nationa „Acquis de la recherche sur les reactions serologiques non specifiques M. brucellose“. 1995. P. 35–40.
  12. Gerbier J. J., Benet M. Risk factors for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in Saone-et-Loire (France). Prev. vet. Med. 1998. N. 35. P. 165–179.
  13. Godfroid D. Epidemiosurveillance des brucelloses animales an Belgique. Colloque National „Acquis de la recherche sur les reactions serologiques non specifiques M. brucellose“. 1995. P. 63–70.
  14. Hill W. K.W. Standardisation of the complement fixation test for brucellosis. Bulletin de l'Office International des Epizooties. 1963. N. 60. P. 401–417.
  15. Kittelberger R. P. G., Bundesen A., Cloeckeaert I., Greiser-Wilke J.-J., Leteson. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV Evaluation of the and Caepitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infection Vet. Microbiol. 1998. N. 60. P. 45–57.
  16. Morgan W. J. B. *Brucella abortus* in: H Blobel und T. ShlieBer (Hrsg): Hand Booh der bakteriellen Infektionen bei Tiren. 1982. Band IV. P. 217–252.
  17. Nielsen K. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in Enzyme Immunoassays. Vet. Immunology and immunopath. 1990. N. 24. P. 373–382.
  18. Pouillot R., PhLescoat B., Garin-Bastuji D., Repiquet P., Terrier G., Gerbier J. J., Benet M., Sanaa. Risk factor for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in Saone-et-Loire(France). Prev. Vet.Med. 1998. N. 35. P. 165–179.
  19. Uzal F. A. E., Carrasco K., Nielsen S., Echaide R. F., Cabrera. An indirect ELISA using a monoclonal ant IgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology. 1996. N. 52. P. 175–180.
  20. Verger J. M., Grimont F., Grimont P. A. D., Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by desribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 1985. N. 35. P. 292–295.
  21. Wrathall E. A., Broughton K. P., Gill W., Goldsmith G. P. Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. Vet. Rec. 1993. N. 32. P. 449–454.
  22. Wright A. E, Smith F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid fever and Malta fever. Lancet. 1897. P. 656–661.