

Prób izolacji, identyfikacji oraz hodowli pierwotniaka *Neospora caninum*

Katarzyna Pastusiak

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Epizootiologii i Patologii (Pracownia Fizjopatologii) Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, obroniona 22.06.2004 r.

Promotor: Doc. dr hab. Władysław Cabaj
Recenzenci: Prof. dr hab. Bogusław Nowosad
Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz

Streszczenie

Neospora caninum jest pasożytniczym pierwotniakiem należącym do typu Apicomplexa. Po raz pierwszy został opisany w 1984 roku w Norwegii jako pasożyt powodujący zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego oraz zapalenie mięśni u psów. Pierwotniaka po raz pierwszy wyizolowano i wprowadzono do hodowli *in vitro* w USA w 1988 roku. Do tej pory udało się uzyskać na świecie 27 izolatów (17 od bydła i 10 od psów).

Pies (*Canis familiaris*) był to tej pory jedynym znanym, naturalnym żywicielem ostatecznym dla tego pierwotniaka, jednak w ostatnim czasie wykazano, że również kojot (*Canis latrans*) jest żywicielem ostatecznym *N. caninum*. Żywicielami pośrednimi *N. caninum* może być wiele gatunków zwierząt domowych, hodowlanych i wolno żyjących. Neosporozę stwierdzono u takich zwierząt jak: krowy, konie, kozy, owce, jelenie. Obecność przeciwciał przeciw pasożytowi wykryto u kilkunastu gatunków dziko żyjących zwierząt. W warunkach doświadczalnych udało zarazić się myszy, szczury, gerbille, koty, świnie, ptaki oraz małpy.

Neospora caninum jest przyczyną ronień u krów i upadków nowo narodzonych cieląt w stadach hodowlanych, co powoduje duże straty ekonomiczne w hodowli bydła.

W Polsce obecność *N. caninum* stwierdzono metodą ELISA u krów rasy polska czarno-biała pochodzących ze stada Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu oraz z miejscowości Śmietki na Mazurach. Po przebadaniu 480 krów ze stada w Jastrzębcu, przeciwciała przeciw *Neospora* stwierdzono u 125 zwierząt (26%). Umożliwiło to wytypowanie seropozytywnych krów matek i wykorzystanie ich potomstwa do dalszych badań. Potomstwo od tych krów z reguły wykazywało cechy, które można przypisać do typowych objawów tej choroby (głównie zaburze-

nia typu neurologicznego). Przebadano 8 cieląt, w różnym wieku, pochodzących od seropozytywnych krów-matek z Jastrzębca oraz 2 cielęta od krowy z gospodarstwa ze Śmietek.

Krowa ze Śmietek, u której po raz pierwszy w Polsce stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko *N. caninum*, była od roku 2000 okresowo monitorowana w tym kierunku. Przez cały ten okres obserwowano u niej wysokie miano przeciwciał przeciw *Neospora*. W surowicy krwi u wszystkich badanych cieląt wykrywano przeciwciała przeciw *Neospora* metodą ELISA. Obecność specyficznych przeciwciał przeciw pasożytowi potwierdzono dodatkowo metodą immunoblot. W metodzie tej scharakteryzowano kilka dominujących antygenów pasożyta, przeciwko którym skierowane były przeciwciała surowicy krwi badanych cieląt i krów matek.

Homogenaty mózgowie pochodzące od badanych cieląt wprowadzono do hodowli komórek Vero, KH-R, GGE-R oraz podawano dootrzewnowo gerbilom oraz myszom szczepu C3H, BALB/c, C57BL6.

Gerby są podatne na zarażenie *N. caninum*. Formy rozwojowe tego pasożyta osiedlają się w tkankach (np. cysty tkankowe w mózgu), a we krwi stwierdza się wysoki poziom przeciwciał. Rozwój pasożyta odbywa się u tych zwierząt bez objawów klinicznych.

Myszy są odporne na zarażenie *N. caninum*, ale można osłabić lub znieść ich odporność poprzez modyfikacje genetyczne (np. myszy knock-out) lub przez podanie odpowiednich środków chemicznych (np. MPA, octan metylprednisolonu). Możliwe jest też osłabienie układu odpornościowego przez wprowadzenie innego pasożyta. W moich badaniach wykorzystywałam nicienia *Heligmosomoides polygyrus*. Myszom z osłabioną odpowiedzią immunologiczną podawano dootrzewnowo homogenaty mózgowie.

Dopiero 10 próba wyizolowania pasożyta zakończyła się pełnym sukcesem. Obecność pierwotniaka w hodowli zaobserwowano po 9 tygodniach jej prowadzenia i potwierdzono przy użyciu metody PCR. Wyizolowanego pasożyta udało się wprowadzić do hodowli komórkowej komórek Vero, utrzymać w hodowli *in vitro* oraz namnażać.

Jest to pierwszy przypadek wyizolowania pierwotniaka *Neospora caninum* z mózgu naturalnie zarażonego cielaka w Polsce.

Metodami biologii molekularnej (PCR i RAPD PCR) potwierdzono obecność DNA pasożyta w badanym materiale.

Potwierdzenie i określenie różnic pomiędzy izolatem polskim i referencyjnym NC-1 wymaga dalszych specjalistycznych badań.

Polski izolat *Neospora* został zgłoszony do Europejskiego Banku dla *Neospora* w Moredun Research Institute w Szkocji.