

СЕРОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА ЛЕПТОСПИРОЗА И БРУЦЕЛОЗА ПРИ БЕЗДОМНИ КУЧЕТА В СОФИЯ

ПЕТЪР СЪБЕВ, СТОЯНКА АТАНАСОВА, ТАНЯ КОСТОВА,
ВАЛЕНТИН РАДЕВ, НИКОЛАЙ ЛАЛКОВСКИ
Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт - София

Проблемът с бездомните кучета в България и в частност столицата София остава нерешен вече десетилетия. Той има не само медицински, икономически, социално-битови и екологически измерения, но от особено значение е ветеринарномедицинският му характер. С настоящото проучване се внася яснота по въпроса за разпространението на две зоонози в популацията на бездомните кучета в гр. София, а именно: лептоспироза и бруцелоза.

Лептоспирозата е трансмисивно заболяване при хората и животните (зооноза) с широко разпространение в световен мащаб – ендемична в тропиците и по-често сезонна в умерения климат. Причинява се от спирохети от род *Leptospira*. Тук спадат над 250 патогенни серовара лептоспири, базирани на разликите в карбохидратните компоненти на бактериалните липополизахариди. При кучетата в Европа заболяването се причинява от серовари лептоспири, класифицирани в 9 серогрупи според антигенната си връзка и принадлежащи към видовете *Leptospira interrogans* и *Leptospira kirschneri*. Имуניתетът срещу лептоспирите е серогрупоспецифичен и познаването на серогрупите, причиняващи най-често заболяването в дадения географски регион, е от значение за избора на ваксини. Заболяването е констатирано при повече от 150 вида бозайници (J.E. Sykes et al. 2010). Кучетата се инфектират най-често при контакт на лигавиците им или наранена кожа с урина или контаминирани с урина от заразени животни вода, храна, постеля, пръст. Бактериите проникват през мукозните мембрани и причинят ендотелни щети на бъб-

реци, черен дроб и бели дробове т.н. Клиничните признаци и кликопатологичните данни често са неспецифични и е необходимо да се пристъпва с повишено внимание. Клиничните признаци варират от безсимптомно или със слабо проявление до тежко заболяване на бъбреци, черен дроб и бели дробове (Richard E. Goldstein, 2010).

Бруцелозата по кучетата е заразно заболяване, предизвикващо се от адаптиран към организма на кучето микроорганизъм - *Brucella canis*.

За пръв път заболяването е описано през 1966 година от Carmichael в САЩ, след което е установено в цял свят. Бактерията е изолирана първоначално от мъртви кучешки фетуси.

При женските кучета характерен признак е аборт в първите седмици на бременността и трудно заплождане след това. За мъжките кучета е характерна появата на епидидимит, водещ до пълен стерилитет. Температурата при болните животни не се повишава.

Brucella canis е самостоятелен вид в род Бруцела. Характерно за този микроорганизъм е, че винаги е в R - форма и притежава антиген, общ за *Brucella ovis* и R - формите на другите бруцели.

Възприемчиви към *Brucella canis* са кучетата и в по-слаба степен човекът. Заболяването се смята за зооноза, въпреки че изключително рядко се проявява при хората, тъй като вирулентността на *Brucella canis* за човека е ниска (Aras Z. , U. S. Uçan, 2010). Костов и сътр. (1997) също съобщават за няколко случая на инфекция на хора, доказана серологично. Ав-

торите са наблюдавали пряка връзка между предаването на инфекцията от куче на човек. Въпреки съществуващите в литературата данни за зоонозия характер на заболяването повечето автори смятат, че хора, изложени на контакт с болни кучета, трудно се заразяват от *Brucella canis* (The Center for Food Security and Public Health, 2007, Scheftel, J., 2008).

Източник на инфекцията са заразните или болните животни. Излъчването на причинителя става чрез кръвта, слюнката, урината, изпражненията, семенната течност и изтеченията от матката след аборт. Микроорганизмът може да бъде открит във вагиналните секрети при женските кучета от 4 до 6 седмици след аборт. Голяма концентрация на *Brucella canis* при мъжките животни се установява в спермата до два месеца след инфекцията.

След като бруцелозата по кучетата бе извадена от Националния профилактичен план, а кучетата в страната не се мониторира по отношение на лептоспирозата, ние не разполагаме с никакви данни относно разпространението на *Leptospira spp.* и *Brucella canis* в местата за развъждане на животните (развъдници на МВР и МНО) или кучетата в приютите за бездомни животни.

Ето защо цел на нашето изследване бе да проверим има ли серопозитивни за *Leptospira spp.* и заразени с *Brucella canis* кучета в приютите за бездомни животни.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани бяха на случаен принцип кръвни проби, взети от бездомни кучета от приюти в гр. София.

За аглутинация срещу *Leptospira spp.* бяха изследвани 57 серума чрез Микроскопски аглутинационен тест (МАТ – описан подробно в ОИЕ - Terrestrial Manual - 2014, Chapter 2.1.9., т. 2.1.) със следните серовари: *Canicola*, *Hardjo*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* и *Tarassovi*. Серумните разреждания във физиологичен разтвор бяха тествани на тъмно зрително поле след инкубация 2 h при температура 30⁰ C. Титърът на антителата беше определян в зависимост от сте-

пента на аглутинация. При установяване на аглутинация в основното разреждане (1:100) беше извършвано степенно разреждане и като краен титър на реакцията приемахме последното разреждане, при което се установява аглутинация.

За *Brucella canis* бяха изследвани 110 кръвни проби от безстопанствени кучета чрез Реакция за свързване на комплемента (РСК). Методът е рутинен и е описан подробно в О.И.Е. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, където обаче видът *Brucella canis* не е описан в отделна глава като другите видове бруцели (*B. abortus* - глава 2.4.3.; *B. melitensis* - глава 2.7.2.; *B. ovis* - глава 2.7.9; *B. suis* - глава 2.8.5). Използвахме и ELISA-кит за диагностика на *Brucella canis*, като изследвахме 60-те кръвни серума, показали положителен или съмнителен резултат при използване на метода РСК.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От изследваните 57 кръвни проби от бездомни кучета, 57.9% (33) бяха серопозитивни ($\geq 1:100$) за лептоспироза, а останалите 24 серума не показаха реакция аглутинация. Този процент е много висок, дори сравнен с резултатите от последните изследвания в Индия – 53% серопозитивни животни (Sumanth Kumar R, et al. 2013), където кучешката популация живее в условия (климатични, икономически и т.н.), значително по-благоприятни за разпространението на лептоспирозата. В съседните на страната ни Румъния и Турция серопозитивните бездомни кучета са били съответно 36.89% и 43.96% (S. Ivana, et al. 2010, Özkan Aslantaş et al., 2005). В Гърция обаче, прави впечатление по-ниският дял на заразени кучета – едва 12.9% (Z. J. Arent et al., 2013). Трябва да се има предвид, че в това проучване, работейки с МАТ авторите не са използвали сероварите *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae*, които са смятани за водещи в епизоотологично отношение в региона и Европа (Broek et al. 2008, Özkan Aslantaş et al., 2005, Scanziani E. et al., 2002, S. Ivana, et al. 2010, Štritof Majatič, Z., 2012).

Разпределението на броя позитивни серуми в различна степен на титрация към различ-

ните серовари *Leptospira interrogans*, които сме използвали в МАТ е отразено в табл. 1. От нея се вижда, че най-голям процент серуми са реагирали положително срещу сероварите *Icterohaemorrhagiae* – 52.3% и *Canicola* – 43.1%, което кореспондира с установеното от **S. Ivana, et al. (2010)**, **Sumanth Kumar R. et al. (2013)** и **Broek et al. (2008)**, но за разлика от тях ние установяваме водеща роля на серовар *Icterohaemorrhagiae*.

Силно негативен е фактът, че при 40.35% от серопозитивните бездомни кучета се наблюдава реакция при титри на разреждане $\geq 1:800$, което показва остро или хронично протичане на лептоспироза към момента на прибирането на кучетата от улицата.

При извършените първоначални изследвания за *Brucella canis* на 20 кръвни проби – 7 от тях, или 35%, показаха серологично положителен резултат.

Ако съдим по това, че са изследвани само 20 кръвни серума, а показващи положителен резултат за наличие на *Brucella canis* са 7, то можем да предположим, че разпространението на заболяването никак не е за пренебрегване.

След като получихме тези обезпокоителни резултати за разпространението на *Brucella canis* си поставихме за цел да разширим нашите изследвания като обхванем по-голям брой животни. Броят изследвани кучета и получените резултати са отразени в табл. 2.

При това наше изследване получихме много висок резултат за серологично положителни кучета за *Brucella canis*. От данните, отразени в таблицата е видно, че всяко второ изследвано животно е серологично положително.

При направените задълбочени литературни справки (**The Center for Food Security and Public Health, 2007**) и консултации с **European Union Reference Laboratory (EURL)** по бруцелоза в Париж, Франция, установихме, че методът РСК е абсолютно неподходящ за изследване на кучета за носителство на антитела срещу *Brucella canis*. Кръвният серум на тези животни има изключително висока антикомплементарна активност, която трудно се преодолява с инактивирането, описано в методиката РСК.

Таблица 1. Резултати от серологичното изследване на 57 бр. бездомни кучета за *Leptospira spp.*
Table 1. Serological results of the 57 stray dogs tested for *Leptospira spp.*

Titers	Canicola (%)	Icterohaemorrhagiae (%)	Hardjo (%)	Pomona (%)	Tarassovi (%)	Total number
1:100	24 (42.1)	2 (3.5)	2 (3.5)	-	-	28 (49.1)
1:200	2 (3.5)	1 (1.75)	1 (1.75)	-	-	4 (7)
1:400	-	10 (17.5)	-	-	-	10 (17.5)
1:800	1 (1.75)	11 (19.3)	-	-	-	12 (21.1)
1:1600	1 (1.75)	8 (14)	-	-	-	9 (15.8)
1:3200	-	2 (3.5)	-	-	-	2 (3.5)
Total number	28 (43.1)	34 (52.3)	3 (4.6)	-	-	65*

*29 stray dogs are reacted with more than one serovar

Таблица 2. Кръвни серуми изследвани за *Brucella canis* чрез РСК
Table 2. Blood sera tested for *Brucella canis* by CFT

Изследвани за <i>Brucella canis</i> кучета	Метод на изследване	Реакция за свързване на комплекента (РСК)
110	Положителни (%)	Отрицателни (%)
	48 (43.64)	50 (45.45)
	12 (10.9)	
		Съмнителни (%)

Таблица 3. Кръвни серуми изследвани за *Brucella canis* чрез ELISA
Table 3. Blood sera tested for *Brucella canis* by ELISA

Изследвани за <i>Brucella canis</i> кръвни серуми	Метод на изследване ELISA
60	Положителни (%)
	6 (10.0)
	3 (5.0)
	Съмнителни (%)
	51 (85.0)
	Отрицателни (%)

С цел уточняване на ситуацията с разпространението на заболяването, продължихме нашите изследвания с друг диагностикум и метод, а именно ELISA. Използвахме ELISA кит за диагностика на *Brucella canis*, като изследвахме 60 кръвни серума, показали положителен или съмнителен резултат при използване на метода РСК. Получените резултати са отразени в табл. 3.

Посочените данни показват, че само 9 от изследваните кучета имат антитела срещу *Brucella canis*, а не 60, както се получи при използване на метода РСК.

В момента няма ваксина за *Brucella canis* (Shin, S., L.E. Carmichael, 1999). Спорен е въпросът и относно ефективността на лечението. През последните години се прилага дългосрочна терапия с антибиотици. Използват се различни схеми, като ефектът от тях е по-голям, колкото по-рано се започне.

Според чужди автори (Scheffel, J., 2008, Shin, S., L. E. Carmichael, 1999) лечението на бруцелозата по кучетата не е ефективно, тъй като *Brucella canis* е вътреклетъчен микроорганизъм и много трудно се повлиява от антибиотите. Това е основната причина, поради която организъмът на заразеното животно не може да се освободи напълно от бактерията. В резултат на това се постига само привидно излекуване на болните животни, като временно се потиска реактивността на имунната им система (The Center for Food Security and Public Health, 2007).

Допълнителна мярка, която може да се приложи за намаляване на риска от предаване на инфекцията, е кастрирането на животните, въпреки че с него организъмът на кучето също не може да освободи напълно от *Brucella canis*.

ИЗВОДИ

Установен е много висок процент (57.9%) на серопозитивни за лептоспироза бездомни кучета, обитаващи кварталите на гр. София. Към момента най-силно разпространени са сероварите Canicola и Icterohaemorrhagiae, което е благоприятно от епизоотологична гледна

точка, тъй като на българския пазар са налични ваксини само срещу тези два причинителя. Установен е и много висок процент – 40.35%, на бездомни кучета, при които се наблюдава реакция при титри на разреждане $\geq 1:800$.

Методът РСК е абсолютно неподходящ за изследване на кучета за носителство на анти-тела срещу *Brucella canis*, тъй като кръвният серум на тези животни има изключително висока антикомплементарна активност.

В заключение може да отбележим, че е необходимо е да се обхванат по-голям процент кучета в изследванията за бруцелоза и лептоспироза, за да се установи разпространението на заболяванията в национален мащаб. Това са зоонози и тяхното разпространение не бива да се допуска.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Костов, Г.**, 1997. За някои проблеми при бруцелозата по кучетата. Ветеринарна сбирка, 3.
2. **A. Mayer-Scholl, E. Luge, A. Draeger, K. Nöckler, B. Kohn**, 2013. Distribution of *Leptospira* Serogroups in Dogs from Berlin, Germany, Vector-Borne and Zoonotic Diseases. March 2013, 13 (3): 200-202. doi:10.1089/vbz.2012.1121, Volume: 13.
3. **Aras Z. , U. S. Uçan**, 2010. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. Theriogenology 74, 658–662.
4. **A. H. M. van den Broek, M. V. Thrusfield, G. R. Dobbie, W. A. Ellisi**, 2008. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow, Journal of Small Animal Practice, Volume 32, Issue 3, pages 118–124, March 1991, Article first published online: 10 APR 2008.
5. **J. E. Sykes, K. Hartmann, K. F. Lunn, G. E. Moore, R. A. Stoddard, and R. E. Goldstein**, 2010. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention, J. Vet. Intern. Med. 2011 ; 25:1–13.
6. **Özkan Aslantaş, Vildan Özdemir, Selçuk Kiliç, Cahit Babür**, 2005. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniasis among dogs in Ankara, Turkey, Veterinary Parasitology 129, 187–191.
7. **Richard E. Goldstein**, 2010. Canine Leptospirosis, Vet. Clin. Small. Anim., 40, 1091–1101.
8. **Scanziani E., Origgi F., Giusti A.M., Iacchia G., Vasino A., Pirovano G., Scarpa P., Tagliabue S.**, 2002. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy, J. Small. Anim. Pract., Apr.; 43 (4):154-7.
9. **Scheftel, J.**, 2008. *Brucella canis* Potential for Zoonotic Transmission.
10. **S. Ivana, A. T. Bogdan, I. Ipate, N. Andreescu, C. Chiurciu, V. Chiurciu, D. M. Caplan, S. Bârâitâreanu, I. Țogoe, A. N. Popescu**, 2010. Biodiversity of the Germs Involved in the Human and Animal Leptospirosis in Stray Dog of Bucharest Temporarily Adopted by the Community, Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 67 (1), ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378.
11. **Shin, S., L. E. Carmichael**, 1999. Canine Brucellosis Caused by *Brucella Canis* Nov.
12. **Sumanth Kumar R, Pillai R. M., Mukhopadhyay H. K., Antony P.X., Thanisslass J, Vivek Srinivas V. M. and Vishnupriya S.**, 2013. Seroepidemiology of canine leptospirosis by iELISA and MAT, Veterinary World 6 (11): 926-930.
13. **Štritof Majatič, Z., J. Habuš, Z. Milas, V. Mojčec Perko, V. Starešina, N. Turk**, 2012. A serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease, Vet. arhiv 82, 183-191, 2012
14. **The Center for Food Security and Public Health**, 2007. Iowa State University, College of Veterinary, Canine Brucellosis: *Brucella canis*.
15. **Z. J. Arent, S. Andrews, K. Adamama-Moraitou, C. Gilmore, D. Pardali, W. A. Ellis**, 2013. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs?. Epidemiology and Infection, Vol. 141, pp 1148-1153.

SEROLOGICAL STUDY OF LEPTOSPIROSIS AND BRUCELLOSIS IN STRAY DOGS IN SOFIA

P. Sabev, S. Atanasova, T. Kostova, V. Radev, N. Lalkovski
National Diagnostic Research Veterinary institute - Sofia

SUMMARY

The problem with stray dogs in Sofia district stands unresolved for many years. This study clarifies the seroprevalence of two zoonotic diseases in the population of stray dogs in Sofia - leptospirosis and brucellosis.

Random blood samples from stray dogs from shelters in Sofia had been surveyed. By Microscopic agglutination test (MAT) for leptospirosis were tested 57 blood sera. The following serovars were used: Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Tarassovi. 130 blood samples from stray dogs were examined for *Brucella canis* by Complement fixation test (CFT). Consequently, 60 blood sera that showed positive or doubtful results were tested by ELISA.

Seropositive for leptospirosis are 57.9% of stray dogs. The highest percentage of positive tested sera are against serovars *Icterohaemorrhagiae* – 52.3% and *Canicola* – 43.1%. Strong negative is the fact that 40.35% from seropositive samples show high agglutination titers ($\geq 1:800$). From serological testing of samples for brucellosis by CFT 43.64% (48) of them are positive and 10.9% (12) are doubtful. From the repeated study by ELISA only 5.45% (6) are positive and 2.72% (3) are doubtful. We have found that CFT is absolutely inappropriate for testing dogs for antibodies to *Brucella canis*, as blood sera of these animals have an extremely high anticomplementary activity.

Key words: *stray dog, leptospirosis, brucellosis, Leptospira, Brucella canis, zoonosis*