

Herpeswirusy przeżuwaczy

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

Rodzina *Herpesviridae* obejmuje ponad 100 wirusów powodujących zakażenia u ludzi i zwierząt (11, 33). Genom tych wirusów zawarty w wirionie, jest dwuniciowym DNA o długości 138 Kbp (tys. par zasad) u herpeswirusa bydłowego typ 1, lub 152 Kbp u wirusa opryszczki człowieka. Niektóre z nich mają właściwości onkogenne. Wirusy te wykazują szczególnie powinowactwo do tkanek pochodzenia ektodermalnego. Drogi wniknięcia wirusa do organizmu oraz miejsca replikacji określają obraz kliniczny choroby. Charakterystyczną właściwością herpeswirusów jest ich zdolność przebywania w komórkach gospodarza w stanie latencji czyli bez namnażania się wirusa, a istota tego zjawiska jest bardzo złożona i nie do końca wyjaśniona. Prowadzone obecnie badania skierowane są na poznanie określonych sekwencji DNA odpowiedzialnych za ekspresję genomu herpeswirusa w stanie latencji (30, 31). Po przechorowaniu, postać kliniczna choroby przechodzi w postać bezobjawową a zakażenie przyjmuje postać latentną. Dopiero immunosupresyjne zadziaływanie czynników fizykochemicznych jak: stres, promieniowanie nadfioletowe, hydrokortyzony, węglowodory aromatyczne i inne czynniki powodują przejście herpeswirusów ze stanu latencji do infekcji litycznej, w której ma miejsce replikacja wirusa. Postać bezobjawowa choroby przechodzi w postać jawną (1, 37, 38). Na podkreślenie zasługuje fakt, że stan utajenia wirusów nie jest zależny od obecności w surowicy krwi przeciwciał neutralizujących wirus (14, 37).

Choroby wywołane przez herpeswirusy zajmują ważną pozycję wśród wirusowych schorzeń bydła (15, 17, 18). Zakażenia tymi wirusami powodują głównie choroby układu oddechowego i rozrodczego, co obniża efekty produkcyjne i hodowlane oraz zwiększa koszty związane z profilaktyką.

Herpeswirusy izolowano od wszystkich przeżuwaczy udomowionych (bydło, owce, kozy) oraz od wielu gatunków dziko żyjących jak: jelenie, renifery, antylopy. Wirusy te należą do 2 podrodzin: *Alphaherpesvirinae* – wirusy po replikacji szybko uwalniają się z komórek powodując ich zniszczenie i *Gammaherpesvirinae* – wiriony namnażają się w komórkach limfoblastycznych i wykazują powinowactwo do limfocytów B i T (17).

W niniejszym opracowaniu omówiono nowy podział herpeswirusów przeżuwaczy (tab. 1) w oparciu o przedstawiony w 1992 roku przez Roizmanna uaktualniony podział klasyfikacyjny całej rodziny *Herpesviridae* (33). Szybki postęp w naukach biologicznych przede wszystkim wirusologii molekularnej powoduje ciągłe zmiany i przesunięcia w klasyfikacji wirusów. Zmiany te bardzo często wyprzedzają możliwości opracowania wyników i ich publikowanie (17).

Herpeswirus bydłowy typ 1 (BHV-1)

Wirus ten określany jako IBR/IPV jest czynnikiem etiologicznym schorzeń u bydła przebiegających w wielu postaciach chorobowych (1, 19). Występuje w jednym typie antygenowym w obrębie którego istnieją różne warianty. Badania nad strukturą DNA wykazały różnice w budowie genomu poszczególnych

szczepów BHV-1 izolowanych z różnych postaci chorobowych (8, 42). Stało się to podstawą do zmian i podziału BHV-1 na 3 podtypy (warianty) oznaczone: BHV-1.1, BHV-1.2a i BHV-1.2b. Dwa pierwsze odpowiedzialne są za wywoływanie u bydła postaci oddechowej, natomiast podtyp BHV-1.2b wywołuje płciową postać choroby czyli otręt. Zachorowania spowodowane przez ten wirus występują w wielu krajach świata. Zaobserwowano, że zróżnicowanie tych 2 postaci klinicznych choroby związane jest z odmiennymi warunkami chowu. W Europie częściej występuje postać płciowa, a w krajach Ameryki Północnej i Południowej częściej stwierdza się postać oddechową, czemu sprzyja duża koncentracja stad wypasowych (16, 19).

Herpeswirus bydłowy typ 2 (BHV-2)

Herpeswirus ten obejmuje dwa wyizolowane szczepy z dwóch różnych schorzeń u bydła: zapalenie strzyków u krów (*mamillitis*) oraz guzowate zapalenie skóry u bydła i bawołów (36). Po raz pierwszy wirus wyizolowano w Afryce od krów ze zmianami na skórze wymienia, strzyków i krocza. Chorobę notowano również w Europie (13, 23, 35, 36). Najczęstsze zachorowania obserwuje się u krów w okresie laktacji, a zakażeniu sprzyja bezpośredni kontakt zwierząt. Również brak higieny skóry wymienia podczas udoju umożliwia przeniesienie się wirusa. Drugą postacią choroby stwierdzono u bydła i bawołów w Północnej Afryce (36). Choroba ta manifestuje się występowaniem licznych zmian guzowatych na skórze i błonach śluzowych. Bardzo często w przewlekłych przypadkach wtórne powikłania bakteryjne powodują powstanie owrzodzeń i ognisk martwiczych.

Herpeswirus bydłowy typ 4 (BHV-4)

W 1967 r. na Węgrzech z płuc chorego cielęcia z objawami zapalenia płuc i spojówek wyizolowano wirus, który określono jako herpeswirus – szczep Movar 33/63 (2). Analogiczny wirus oznaczony jako szczep DN-599 wyosobniono w USA od krów z błony śluzowej pochwy macicy (22). Badania serologiczne przeprowadzone w wielu krajach wskazują na znaczne rozprzestrzenienie wirusa w populacji bydła (7, 12, 25, 39). Ponieważ wykazuje on duże podobieństwo cech morfologicznych i biologicznych do wirusów cytomegalii człowieka wirus ten określa się również jako cytomegalowirus bydła. Analiza DNA przy użyciu enzymów restrykcyjnych różnych szczepów tego herpeswirusa wykazała jedynie nieznaczne różnice w budowie genomu, co w ostateczności zdecydowało na zaklasyfikowanie go jako BHV-4. Patogeneza schorzeń wywołanych przez ten wirus nie została dotąd całkowicie poznana, prawdopodobnie odgrywają znaczną rolę zaburzenia immunologiczne (26).

Tab. 1. Herpeswirusy przeżuwaczy udomowionych

Nazwa herpeswirusa	Inne nazwy, synonimy	Gatunki wrażliwe na zakażenie naturalne	Główne objawy chorobowe wywołane przez wirus
Herpeswirus bydlęcy typ 1	BBV-1, IBR/IPV, wirus otętu	bydło	zapalenie dróg oddechowych i narządów płciowych, poronienia, zapalenia spojówek
Herpeswirus bydlęcy typ 2	BHV-2, Bovine mamillitis virus, Allerton virus	bydło	zmiany zapalne na skórze wymienia i strzyków
Herpeswirus bydlęcy typ 4	Herpeswirus DN 599	bydło	zapalenie dróg oddechowych, oczu, narządów płciowych
Herpeswirus bydlęcy typ 5	BHV-1	bydło	zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego
Herpeswirus owczy typ 1	wirus gruczolakowatości (adenomatozy) płuc owiec	owce	zapalenie płuc
Herpeswirus owczy typ 2	wirus głowicy, złośliwej nieżytowej gorączki u przeżuwaczy, SA-MCF	owce	nieżytowe, dyfteroidalne zapalenie błon śluzowych głowy, objawy nerwowe
Herpeswirus kozi typ 1	BHV-6	kozy	zapalenie dróg oddechowych, narządów płciowych, poronienia

Herpeswirus bydlęcy typ 5 (BHV-5)

Do niedawna wirus ten określano jako BHV-1. Stwierdzono, że herpeswirus ten, poza zakażeniem dróg oddechowych oraz narządów płciowych, może wywoływać zapalenie mózgu i rdzenia u cieląt (11, 19). Nowsze badania przy pomocy analizy restrykcyjnej i techniki hybrydyzacji DNA izolowanych szczepów BHV-1 od cieląt z zaburzeniami nerwowymi pozwoliły na wyodrębnienie nowego wariantu: BHV-1.3 (4, 9, 38). W wyniku tej analizy stwierdzono, że stopień powtarzalności określonych sekwencji nukleotydów genomu BHV-1 i wariantu BHV-1.3. wyniósł 95%. Obecna klasyfikacja opracowana przez Roizmanna zawiera już nowy typ herpeswirusa bydlęcego: BHV-5 (32, 33).

Herpeswirus owczy typ 1 (OHV-1)

W 1967 r. w Anglii wyisobniono herpeswirusy z leukocytów chorych owiec z objawami adenomatozy płuc (29). Choroba ta była znana od początku XX wieku, a przebiega u owiec z postępującą proliferacją nabłonka pęcherzyków płuc i oskrzeli, której towarzyszą objawy duszności i wychudzenia. Mimo następnych izolacji wirusa od owiec i badań serologicznych potwierdzających występowanie przeciwciał dla tego herpeswirusa, dotychczas nie uzyskano wystarczających dowodów roli etiologicznej tego czynnika zakaźnego w adenomatozie owiec (20, 40, 41). Wcześniej wirus ten był sklasyfikowany jako BHV-4 (18).

Herpeswirus owczy typ 2 (OHV-2)

Izolowany w 1960 r. przez Plowrighta i wsp. wirus od chorych gnu (*Capra hircus*) okazał się czynnikiem wywołującym głowicę czyli złośliwą nieżytową gorączkę u przeżuwaczy (29). Choroba wyraża się nieżytywym i dyfteroidalnym zapaleniem błony śluzowej głowy, zapaleniem oczu i zaburzeniami nerwowymi. Wirus namnaża się w tkance limfopoetycznej, doprowadzając do proliferacji komórek układu limfatycznego. Z czasem izolowano ten wirus od innych przeżuwaczy dziko żyjących i nazwano Alcelaphine herpeswirus typ 1 (AHV-1). Przeciwciała dla tego wirusa stwierdzono w populacji owiec w USA (6, 36). Mimo, że próby izolacji wirusa nie dały pozytywnych rezultatów uznano, że czynnikiem etiologicznym tej choroby u owiec może być podobny herpeswirus nazwany sheep-associated MCF (SA-MCF). Interesujące są rezultaty wieloletnich badań przeprowadzonych przez Bridgen i Reida

(5). Autorzy za pomocą techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych, w tym techniki hybrydyzacji DNA-DNA, wykazali w komórkach hodowli ciągłych, zakażanych limfocytami chorych zwierząt obecność homologicznego DNA specyficznego dla herpeswirusa AHV-1. Badania te pozwalają wnioskować, że homologiczne sekwencje kodują wspólne funkcje dla wirusa SA-MCF i AHV-1.

Herpeswirus kozi typ 1 (CHV-1)

Wirus ten do niedawna był klasyfikowany jako herpeswirus bydlęcy typ 6. Pod względem budowy antygenowej wykazuje on ściśle pokrewieństwo z BHV-1 i nie wyklucza się hipotezy, że jest to wariant BHV-1, który zaadaptował się do kóz (cyt. za 43). Po raz pierwszy CHV-1 izolowano w 1974 r. w USA od młodych kóz chorujących z objawami ze strony układu pokarmowego (34). W następnych latach wyisobniono go od kóz, ze stad gdzie stwierdzono liczne przypadki ronień oraz nieżytywego zapalenia błony śluzowej pochwy. U samców występowały zapalenia błony śluzowej prącia i napletka (3, 10). Wyniki serologicznych badań kóz w Szwajcarii, Norwegii, Austrii i Grecji wykazały wysokie miana przeciwciał świadczące o przebyciu bezobjawowych zakażeń.

Piśmiennictwo

- Ackermann M., Belak S., Bitch V., Edwards S., Mouss A., Rockborn G., Thiry E.: Microbiol. 23, 361, 1990.
- Bartha A., Judasz M., Liebermann H.: Acta Vet. Hung. 16, 357, 1966.
- Berrios P. E., McKercher D. G.: Am. J. Vet. 36, 1755, 1975.
- Brake F., Studdert M. J.: Aust. Vet. J. 62, 331, 1985.
- Bridgen A., Reid H. W.: Res. Vet. Sci. 50, 38, 1991.
- Castro A. E., Ramsay E. C., Dotson J. F., Schramke M. L., Kocan A. A., Whitenack D. L.: Am. J. Vet. Res. 45, 409, 1984.
- Drolet R., Werdin R. E., Goyal S. M.: Amer. Assn. Vet. Lab. Diag. 29 th Annual Proceedings, 335, 1986.
- Edwards S., Newman R. H., White H.: Brit. Vet. J. 147, 216, 1986.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T. M., Loepfe E., Wyler R.: Virus Res. 6, 57, 1986.
- Engels M., Gelderblom H., Gholamreza D., Ludwig H.: J. gen. Virol. 64, 2237, 1983.
- Foulon T.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 15, 13, 1992.
- Goltz M., Ludwig H.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 14, 187, 1991.
- Hofmann M., Engels M., Metzler A. E., Wyler R.: Schweiz Arch. Tierheilk. 128, 289, 1986.
- Kohl S.: Curr. Top. Microbiol. Immunol. 179, 75, 1992.
- Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna, PWRiL, Warszawa 1982.
- Larski Z.: Medycyna Wet. 35, 641, 1978.
- Larski Z., Truszczyński M.: Zarys mikrobiologii weterynaryjnej ART, Olsztyn 1992.

18. Ludwig H.: Bovine herpesviruses, w: The Herpesviruses, red. B. Roizmann, Plenum Press, New York 1983.
19. Ludwig H., Gregersen J. P.: Rev. sci. tech. off int. Epiz. 5, 869, 1986.
20. Mackay J. M. K.: J. Comp. Pathol. 79, 147, 1969.
21. Malmquist W. A., Krauss H. H., Moulton J. E., Wandera J. G.: Lab. Invest. 26, 528, 1972.
22. Mohanty S. B., Hammond R. C., Lillis M. G.: J. Am. Vet. Med. Ass. 158, 1978, 1971.
23. O'Connor M.: Irish Vet. J. 41, 345, 1987.
24. Offay J. M., Mock R., Fulton R. W.: Am. J. Vet. Res. 54, 4, 1993.
25. Opendbosch Van E., Wellemans G., Ooms L. A., Degrese A. D.: Vet. Res. Communications 12, 111, 1988.
26. Osorio F. A., Rock D. L., Reed D. E.: J. gen. Virol. 66, 1941, 1985.
27. Papanastasiopoulou M., Koptopoulos O., Ludwig H.: Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis. 14, 47, 1991.
28. Pierson R. E., Hambdy F. M., Dardiri A. H., Ferris D. H., Schloer G. M.: Am. J. Vet. Res. 40, 1091, 1979.
29. Plowright W., Ferris R. D., Scott G. R.: Nature 4757, 1167, 1960.
30. Rock D. L., Haymoser W. A., Osorio F. A., Reed D. E.: J. gen. Virol. 67, 2515, 1986.
31. Rock D. L., Nesburn A. B., Ghiasi H., Ong J., Lewis T. L., Lokensgard J. R., Wechsler S. L.: J. Virol. 61, 3820, 1987.
32. Roizmann B., Baines J.: Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis. 14, 47, 1991.
33. Roizmann B.: Arch. Virol. 123, 425, 1992.
34. Saito J. K., Gribble D. H., Berrios P. E., Knight H. D., McKercher D. G.: Am. J. Vet. Res. 35, 847, 1974.
35. Scott F. M., Martin W. B.: Vet. Rec. 102, 464, 1978.
36. Scott F. M.: Bovine herpesvirus 2 infections, w: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, red. G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston 1989.
37. Stanberry L. R.: Prog. med. Virol. 33, 61, 1986.
38. Studdert M. J., Brake F., Browning G. F.: Austr. Vet. J. 66, 402, 1989.
39. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P. P.: Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) infectious of cattle, w: The Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, red. G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston 1989.
40. Verwoerd D. W., Meyer-Scharrer E., Broekman J., De Villers E. M.: Onderstepoort J. Vet. Res. 46, 61, 1979.
41. Villers de E. M.: J. Virol. 22, 705, 1979.
42. Wentink G. H., van Oirschot J. T., Verhoeff J.: Vet. Quart. 15, 30, 1993.
43. Zmudzinski J. F.: Charakterystyka i podstawy zwalczania zakażeń wirusem otrętu u buhajów. Praca hab., Puławy 1987.

Adres autora: dr Andrzej Salwa, ul. Chałubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk

WIESŁAW BIELAS, ANDRZEJ DUBIEL

artykuł przeglądowy

Konserwacja nasienia knura w niskich temperaturach

Katedra Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Pomimo wysiłków badawczych na całym świecie nie została jeszcze opracowana w pełni zadowalająca metoda konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach (2, 3). Stan ten spowodowany jest brakiem niezawodnych metod, które mogą prognozować *in vitro* o zdolności do zapłodnienia mrożonego nasienia knura oraz ekstremalną gatunkową wrażliwością jego nasienia na procesy kriokonserwacji spowodowaną charakterystyczną budową błon komórkowych plemników (3, 6, 13).

Do 1970 r. niekorzystnymi wynikami kończyły się próby zamrażania nasienia knura w oparciu o metody konserwacji nasienia buhaja (3). Dopiero w 1970 r. Polge i wsp. (16) opisali pierwsze skuteczne zapłodnienia uzyskane po zastosowaniu nasienia mrożonego knura, które nastąpiły po inseminacji chirurgicznej bezpośrednio do jajowodu loszki. Rok później opisano trzy metody głębokiego zamrażania nasienia knura, wynikiem których było uzyskanie ciąży po inseminacji doszyjkowej (5, 8, 18). Jednak żadna z tych wczesnych metod nie została zastosowana na szeroką skalę w inseminacji trzody chlewnej ze względu na niski wskaźnik oproszeń w porównaniu z nasieniem świeżym (3).

Niniejsza praca ma na celu wyeksponowanie osiągnięć badawczych w dziedzinie konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach.

Metody konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach

Istnieją cztery podstawowe metody zamrażania nasienia knura w niskich temperaturach, które testowane były w warunkach polowych przez Pursela w 1975 r. (19), Westendorfa w 1975 r. (28), Paquignona w 1976 r. (14) i Larsona w 1977 r.

(11). Według danych piśmiennictwa (9, 10) aktualnie stosowane metody konserwacji opierają się głównie na pracach wymienionych badaczy. Wszystkie badania, oprócz metody Westendorfa, wymagają zamrażania nasienia w kulkach według Nagase i Niva oraz posiadają następujące wspólne cechy: inkubację nasienia przed wirowaniem oraz zamrażanie plemników w formie skoncentrowanej przy niskim stężeniu glicerolu (19). Z powyższych danych, które prezentują wymienieni autorzy wyszczególnić można cztery następujące zasady:

- ekwilibracja przez około 4,5 godziny,
- koncentrację nasienia przez wirowanie oraz usunięcie plazmy nasienia przed schładzaniem plemników do 15°C. Wirowanie odbywa się albo tuż po pobraniu, albo po inkubacji,
- zamrażanie skoncentrowanej zawiesiny plemników w formie kulek lub konfekcjonowanie nasienia w mikro- i makrotubach (3, 26), torebkach plastikowych (4) oraz w tubach aluminiowych (25). Powszechnie stosowana jest koncentracja od 450 milionów do 1 miliarda plemników w 1 ml (7, 14, 28),
- dodawanie tuż przed zamrożeniem do zawiesiny plemników niewielkiej ilości glicerolu (1).

Problematyka zamrażania i konfekcjonowania nasienia knura

Nasienie knura wymaga szybszego tempa mrożenia niż nasienie innych gatunków zwierząt (17). Warunek ten spełnia zamrażanie nasienia knura w formie kulek na suchym lodzie, co zostało uwzględnione przez wymienionych autorów (10, 11, 14, 19).

Brakuje wyczerpujących danych na temat schładzania nasienia w makrotubach metody Westendorfa (28). Uczony ten