

# Głowica bydła – nowe dane na temat czynnika etiologicznego i diagnostyki choroby

JERZY ROLA, MAGDALENA LARSKA, MIROŚLAW P. POLAK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rola J., Larska M., Polak M. P., Żmudziński J. F.

## Malignant catarrhal fever: new data on the causative agent and diagnosis of the disease

### Summary

The paper presents the latest research on the etiology and diagnostics of malignant catarrhal fever. Two major epidemiological forms of MCF have been recognized. The first, wildebeest-associated malignant catarrhal fever (WA-MCF), which occurs in Africa and in zoos is caused by AHV1. The virus is carried asymptotically by many species of wild ruminants. The second form, defined as sheep-associated MCF (SA-MCF) is the result of OHV-2 infection. Sheep and goats are a reservoir of virus and the disease occurs all over the world. MCF is being diagnosed upon clinical signs, gross lesions and laboratory testing which has improved during the last few years. Beside the standard diagnostic methods, new techniques of molecular biology were implemented for the identification of MCF viruses.

**Keywords:** malignant catarrhal fever, AHV-1, OHV-2

Złośliwa niezłoty gorączka (malignant catarrhal fever, MCF) określana w polskim piśmiennictwie również jako głowica, to wirusowa choroba bydła oraz dzikich przeżuwaczy. Choroba ta występuje w dwóch różnych formach, jako głowica związana z antylopami (wildebeest-associated MCF, WA-MCF) i głowica związana z owcami (sheep-associated MCF, SA-MCF). Pierwsza z form występuje u bydła na obszarach południowo-wschodniej Afryki, które są naturalnym środowiskiem bytowania antylopy gnu (14). Choroba ta stwierdzana jest także w ogrodach i parkach zoologicznych, w których dzikie zwierzęta wrażliwe na zakażenie narażone są na kontakt z antylopami (21). Forma SA-MCF występuje na całym świecie i stwierdzana jest oprócz bydła u wielu gatunków zwierząt, szczególnie u jeleniowatych, bizonów i bawołów (17). Ostatnio opisano przypadki SA-MCF u świń w Skandynawii i w Szwajcarii (1, 22).

### Etiologia

Chorobę wywołują co najmniej dwa ściśle ze sobą spokrewnione wirusy, *Alcelaphine herpesvirus-1* (AHV-1) i *Ovine herpesvirus-2* (OHV-2) należące do podrodziny *Gammaherpesvirinae*, rodzaj *Rhadinivirus* ( $\gamma_2$ -herpeswirusy) (13, 28). Bezobjawowymi nosicielami wirusa AHV-1 są wszystkie gatunki antylopy gnu, bawolca i topi. Na zakażenie AHV-1 wrażliwe jest, między innymi, bydło domowe, bawół, bizon i wiele gatunków dzikich przeżuwaczy. Nosicielami wirusa OHV-2 są owce i kozy. Wrażliwość na zakażenie OHV-2 jest zróżnicowana. Stosunkowo odporne na zakażenie jest bydło domowe i zebu, bardziej wrażliwy jest bawół i wiele gatunków jeleniowatych, a najbardziej wrażliwe jest bydło z Bali i jeleni Dawida.

U dorosłych antylop wirus AHV-1 jest ściśle związany z komórkami organizmu gospodarza i dlatego rzadko dochodzi do jego transmisji na inne zwierzęta. U zwierząt poddanych działaniu stresu lub leczonych kortykosteroidami izolowano wirus z wymazów z nosa. U bydła i innych wrażliwych zwierząt do zakażenia dochodzi najczęściej drogą aerogenną lub pokarmową za pośrednictwem zanieczyszczonej paszy lub wody. Mimo że zakażenie śródmaciczne AHV-1 u dzikich przeżuwaczy jest możliwe, to większość cieląt ulega zakażeniu dopiero po urodzeniu. Cielęta takie stanowią główne źródło zakażenia, gdyż sieją wirus przez okres kilku kolejnych miesięcy z wydzieliną z nosa i oczu oraz z kałem (25).

Mało wiadomo na temat dróg szerzenia się wirusa OHV-2. Wydaje się, że do transmisji zakażenia wymagany jest kontakt bezpośredni między owcami a wrażliwymi zwierzętami. Okres wykotów ciężarnych owiec sprzyja zakażeniu. Według niektórych autorów, jagnięta ulegają zakażeniu dopiero po 2-3 miesiącach od urodzenia, gdy zanika u nich odporność bierna (5, 19, 20).

Wirus AHV-1 został wyizolowany i namnaża się *in vitro* (6). Zasadniczą część genomu AHV-1 (szczep C500) stanowi odcinek DNA o długości 130 608 par zasad (pz), określany jako L-DNA, charakteryzujący się niską zawartością zasad G + C (46%). Odcinek ten otoczony jest z obu stron 20-25 sekwencjami powtarzalnymi o wysokiej zawartości zasad G + C (72%), które tworzą region zwany H-DNA. Analiza sekwencji nukleotydów odcinka L-DNA wykazała, że zawiera on 70 otwartych ramek odczytu (ORF). Spośród nich 61 wykazuje homologię w stosunku do odpowiednich genów *herpesvirus saimiri* (HVS), prototypowego wirusa dla rodzaju *Rhadinivirus*. Geny odpowiadające tym ramkom są genami kon-

serwatywnymi i zlokalizowane są w pięciu odrębnych blokach. Bloki I, II i IV zawierają te same geny u wszystkich herpeswirusów. Białka kodowane przez te geny uczestniczą, między innymi, w procesie replikacji DNA (polimeraza DNA – ORF 7), metabolizmie nukleotydów (kinaza tymidynowa – ORF 21, reduktaza nukleotydowa – ORFs 60 i 61), w tworzeniu kapsydu (ORFs 25 i 62). W blokach III i V zlokalizowane są geny, dla których homologi obecne są jedynie wśród gammaherpeswirusów. Blok III zawiera ramki odczytu od 48 do 50. Funkcji białek kodowanych przez ORFs 48 i 49 dotychczas nie poznano. Stwierdzono natomiast, że ORF 50 koduje białko bezpośrednio-wczesne (immediate-early protein, IE), które może aktywować ekspresję z własnego promotora lub z promotorów innych genów. Dzięki właściwościom transaktywacyjnym białko to może przerywać fazę utajoną zakażenia latentnego i indukować cykl lityczny wirusa. Blok V zawiera ORF 75, która koduje białko tegumentu.

Z kolei geny w regionach zmiennych można podzielić na dwie duże grupy: geny, które są konserwatywne tylko u niektórych wirusów należących do podrodziny *Gammaherpesvirinae* oraz geny, które są unikatowe. W obrębie genomu AHV-1 zidentyfikowano 10 genów unikatowych, które oznaczono ORFs A1 do A10. Białka kodowane przez wspomniane geny determinują, między innymi, tropizm wirusa, uczestniczą w procesie transformacji komórek gospodarza oraz umożliwiają ustanowienie i utrzymanie zakażenia latentnego.

OHV-2 nie został dotychczas wyizolowany i dlatego mało wiadomo na temat budowy i organizacji genomu wirusa. Badania z użyciem metod biologii molekularnej wykazały podobieństwo antygenowe OHV-2 do AHV-1.

### Objawy kliniczne

Okres inkubacji choroby po zakażeniu doświadczalnym waha się od 9 do 60 dni. Obraz kliniczny głowicy może być zróżnicowany. Götze (9) na podstawie obserwowanych objawów klinicznych wyróżnił 4 postacie choroby.

W postaci nadostrej u niektórych zwierząt, szczególnie z rodziny jeleniowatych, dochodzi do nagłych padnięć bez wcześniejszych objawów choroby. U pozostałych zwierząt stwierdza się wysoką gorączkę, depresję, rozległe zapalenie błony śluzowej jamy gębowej i nosa, biegunkę. U bydła postać ta trwa 1-3 dni i zwykle kończy się śmiercią.

Postać głowowo-oczna jest najczęściej notowaną. W początkowej fazie choroby stwierdza się gorączkę 41-41,5°C, zaczerwienienie błony śluzowej jamy gębowej i nosa, surowiczy wypływ z nosa oraz wyraźne powiększenie węzłów chłonnych, szczególnie przedłopatkowych. Następnie na błonie śluzowej jamy gębowej (wargi, dziąsła, podniebienie) pojawiają się ogniska martwicy. Wysięk surowiczy zmienia się w śluzowy, a w końcu ropny. Zasychając zatyka nozdrza chorych zwierząt, wywołując u nich duszność (oddychanie przez otwartą jamę gębową). Wydechane powietrze ma nieprzyjemną, cuchnącą woń, wywołaną rozkładającym się nabłonkiem. Z reguły obserwuje się obrzęk powiek, przekrwienie i zapalenie spojówek, łzawienie oraz światłowstręt. Objawem

charakterystycznym jest zmętnienie rogówki, często obustronne. Rozpoczyna się ono od obwodu rogówki i postępuje dośrodkowo. Czasami dochodzi także do zapalenia całej gałki ocznej oraz owrzodzenia i perforacji rogówki. U niektórych zwierząt obserwuje się objawy nerwowe w postaci dreszczy, nieskoordynowanego chodu oraz oczopląs. Zwierzęta padają w ciągu 7-17 dni od wystąpienia objawów klinicznych.

Przy postaci jelitowej występują trudności w przyjmowaniu paszy, owrzodzenia błony śluzowej jamy gębowej i przełyku oraz biegunka, która prowadzi do odwodnienia organizmu. Postać łagodną obserwowano u zwierząt zakażonych atenuowanym szczepem wirusa.

### Zmiany anatomopatologiczne

W badaniu sekcyjnym stwierdza się obrzęk i przekrwienie błony śluzowej jamy gębowej oraz zalegającą na jej powierzchni wydzielinę włóknikowo-ropną. Naloty włóknika występują przede wszystkim na dziąsłach, wargach i języku. Po usunięciu włóknika widoczne są nadżerki i owrzodzenia. Podobne zmiany występują w górnych drogach oddechowych i przewodzie pokarmowym. Na skórze pojawiają się często wykwitwy w postaci osutki grudkowej i pęcherzykowej z następowym tworzeniem się grubych strupów i wypadaniem włosów. Węzły chłonne, szczególnie te znajdujące się w okolicach głowy i karku oraz migdałki i kępki Peyera są silnie obrzękłe. W miedniczkach nerkowych oraz pęcherzu moczowym występują prawie zawsze liczne wybroczyny. Do zmian patognomicznych należy włóknikowo-martwicowe zapalenie naczyń krwionośnych, najczęściej o średnim przekroju, z okołonaczyniowym naciekiem komórek limfoidalnych.

### Diagnostyka

Ważnym narzędziem w diagnostyce głowicy są laboratoryjne metody wirusologiczne i serologiczne, pozwalające na poznanie dróg szerzenia się wirusa, jego identyfikację i charakterystykę oraz na badanie odpowiedzi immunologicznej. Metody te obejmują zarówno techniki standardowe, takie jak izolacja wirusa w hodowli komórkowej, jak i metody oparte o biologię molekularną z zastosowaniem znakowanych sond DNA oraz reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). AHV-1 może być izolowany z leukocytów krwi obwodowej, płuc, węzłów chłonnych, śledziony, nadnerczy oraz tarczycy chorych zwierząt. Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem są linie komórkowe pochodzące z bydłych tkanek, takich jak nadnercza i tarczyca (34). Standardowo w diagnostyce stosuje się pierwotne hodowle komórkowe pochodzące z komórek limfoidalnych przeżuwaczy oraz linię komórkową FMSK (nerka płodu owcy muflona) oraz BT (tchawica bydła) (15, 16). Niektóre szczepy AHV-1 mogą powodować efekt cytopatyczny (CPE) w zakażonej hodowli już po około 48 h, jednakże najczęściej CPE pojawia się po 4-7 dniach od zakażenia (33). Szczepem referencyjnym do testu izolacji wirusa, PCR oraz metod serologicznych jest atenuowany szczep WC-11 (26). Do prac doświadczalnych wykorzystywane są także inne izolaty AHV-1, np. szczep C500 oraz szczep MN-MCFV pochodzący od zakażonej krowy ze stanu Minnesota (8,

10). Do identyfikacji antygeny wirusa wykorzystuje się test immunofluorescencji oraz metody immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał poli- i monoklonalnych. Wykrycie obecności kwasu nukleinowego wirusa możliwe jest dzięki testom opartym na reakcji PCR (simplex PCR, duplex PCR, semi – i nested PCR czy cPCR) oraz hybrydyzacji wirusowego DNA (11, 12, 23). Opracowano także mapę restrykcyjną dla szczepu WC-11 po trawieniu enzymami HindIII, EcoRI, BamHI i SmaI (4).

Bezpośrednia izolacja OHV-2 w hodowli komórkowej nie jest możliwa, jednakże obecność genomu wirusa stwierdzono w komórkach nabłonkowych obecnych w wymazach z nosa, mleku oraz sيارze, limfocytach B i T krwi obwodowej oraz w próbkach tkanek pobranych z ognisk zapalnych (2, 30, 33). W 1993 r. Baxter i wsp. (3) opracowali dla OHV-2 czuły i specyficzny test nested PCR pozwalający na wykrycie 35 kopii wirusowego DNA. Obecnie metoda PCR jest coraz częściej stosowana w diagnostyce głowicy. Pozwala na identyfikację wirusa zarówno w leukocytach krwi obwodowej, jak i w świeżych tkankach zakażonych zwierząt oraz próbkach zatopionych w parafinie pobranych podczas sekcji do badania histologicznego (7).

### Serologia

Do wykrywania przeciwciał dla wirusów AHV-1 i OHV-2 stosowany jest test seroneutralizacji. Jako antygen używany jest najczęściej szczep WC-11 wirusa AHV-1. Szacuje się, że jedynie u 70-80% zakażonych zwierząt można wykryć specyficzne dla wirusów MCF przeciwciała (24). U owiec zakażonych AHV-1 poziom przeciwciał neutralizujących jest bardzo niski (29). W badaniach serologicznych stosowane są także inne metody, np. test pośredniej immunofluorescencji, immunoperoxydazowy, ELISA z użyciem specyficznych przeciwciał monoklonalnych oraz odczyn wiązania dopełniacza (18, 32). Czułość i specyficzność niektórych testów serologicznych jest jednak ograniczona, ponieważ antygeny wirusów MCF reagują krzyżowo z przeciwciałami specyficznymi dla innych herpeswirusów bydłowych (31).

W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić wirusową biegunkę bydła i chorobę błon śluzowych wywołaną przez wirus BVD-MD, pryszczycę, chorobę niebieskiego języka, księgosusz.

Zapobieganie chorobie polega na izolowaniu zwierząt wrażliwych od potencjalnego źródła zakażenia, jakim są owce, kozy i dzikie przeżuwacze. Dotychczas brak jest skutecznej szczepionki przeciwko głowicy bydła. Próby z użyciem szczepionki atenuowanej nie dały pomyślnych rezultatów, gdyż szczepionka nie indukowała długotrwałej i skutecznej odporności (27).

### Piśmiennictwo

- Albini S., Zimmermann W., Neff F., Ehlers B., Hani H., Hussy D., Casura Ch., Engels M., Ackermann M.: Porcine malignant catarrhal fever: diagnostic findings and first detection of the pathogenic agent in diseased swine in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2003, 145, 61-68.
- Baxter S., Wiyono A., Pow I., Reid H. W.: Identification of ovine herpesvirus-2 infection in sheep. *Arch. Virol.* 1997, 142, 823-831.
- Baxter S. I. F., Pow I., Bridgen A., Reid H. W.: PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* 1993, 132, 145-159.
- Bridgen A.: The derivation of a restriction endonuclease map for Alcelaphine herpesvirus 1 DNA. *Arch. Virol.* 1991, 117, 183-192.
- Buxton D., Reid H. W.: Transmission of malignant catarrhal fever to rabbits. *Vet. Rec.* 1980, 106, 243-245.
- Coulter L. J., Wright H., Reid H. W.: Molecular genomic characterization of the viruses of malignant catarrhal fever. *J. Comp. Pathol.* 2001, 124, 2-19.
- Crawford T. B., Li H., O'Toole D.: Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, 11, 111-116.
- Ensser A., Pflanz R., Fleckenstein B.: Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.* 1997, 71, 6517-6525.
- Götze R.: Untersuchungen über das bösartige Katarrhalieber des Rindes III. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 1930, 38, 487-491.
- Hamdy F. M., Dardiri A. M., Mebus C., Pierson R. E., Johnson D.: Aetiology of malignant catarrhal fever outbreak in Minnesota. *Proceedings of the 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association* 1978, s. 248-267.
- Hsu D., Shih L. N., Castro A. E., Zee Y. C.: A diagnostic method to detect Alcelaphine herpesvirus-1 of malignant catarrhal fever using the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 1990, 114, 259-263.
- Hua Y., Li H., Crawford T. D.: Quantitation of sheep-associated malignant catarrhal fever viral DNA by competitive PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, 11, 117-121.
- Li H., Dyer N., Keller J., Crawford T. B.: Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1313-1318.
- Li H., Gailbreath K., Bender L. C., West K., Keller J., Crawford T. B.: Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx gazella*). *J. Wildl. Dis.* 2003, 39, 875-880.
- Li H., Shen D. T., Davis W. C., Knowles D. P., Gorham J. R., Crawford T. B.: Identification and characterization of the major proteins of malignant catarrhal fever virus. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 123-129.
- Li H., Shen D. T., O'Toole D., Davis W. C., Knowles D. P., Gorham J. R., Crawford T. B.: Malignant catarrhal fever virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996, 791, 198-210.
- Li H., Shen D. T., Jessup D. A., Knowles D. P., Gorham J. R., Thorne T., O'Toole D., Crawford T. B.: Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive ELISA. *J. Wildl. Dis.* 1996, 32, 437-443.
- Li H., Shen D. T., Knowles D. P., Gorham J. R., Crawford T. B.: Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1674-1679.
- Li H., Snowden G., Crawford T. B.: Effect of passive transfer of maternal immunocomponents on infection with ovine herpesvirus 2 in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 2002, 63, 631-633.
- Li H., Snowden G., O'Toole D., Crawford T. B.: Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 223-226.
- Li H., Westover W. C., Crawford T. B.: Sheep-associated malignant catarrhal fever in a petting zoo. *J. Zoo. Wildl. Med.* 1999, 30, 408-412.
- Loken T., Aleksandersen M., Reid H., Pow I.: Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.* 1998, 143, 464-467.
- Michel A. L., Buchholz G. S., Van der Lugt J. J.: Monitoring experimental alcelaphine herpesvirus-1 infection in cattle by nucleic-acid hybridization and PCR. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1995, 62, 109-115.
- Muller-Doblies U. U., Li H., Hauser B., Adler H., Ackermann M.: Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2970-2972.
- Plowright W.: Malignant catarrhal fever in East African. I. Behaviour of the virus in free-living populations of blue wildebeest (*Gorgon taurinus*, Burchell). *Res. Vet. Sci.* 1965, 6, 69-83.
- Plowright W., Ferris R. D., Scott G. R.: Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine malignant catarrhal fever. *Nature* 1960, 188, 1167-1169.
- Plowright W., Herniman K. A. J., Jessett D. M., Kalunda M., Rampton C. S.: Immunisation of cattle against the herpesvirus of malignant catarrhal fever: failure of inactivated culture vaccines with adjuvant. *Res. Vet. Sci.* 1975, 19, 159-166.
- Roizman B.: The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 1992, 123, 425-449.
- Rosbottom J., Dalziel R. G., Reid H. W., Stewart J. P.: Ovine herpesvirus 2 lytic cycle replication and capsid production. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 2999-3002.
- Rossiter P. B.: Antibodies to malignant catarrhal fever virus in sheep sera. *J. Comp. Pathol.* 1981, 91, 303-311.
- Rossiter P. B., Gumm I. D., Mirangi P. K.: Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (alcelaphine herpesvirus 1) and bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 3). *Vet. Microbiol.* 1988, 16, 208-211.
- Sentsui H., Nishimori T., Nagai I., Nishioka N.: Detection of sheep-associated malignant catarrhal fever virus antibodies by complement fixation tests. *J. Vet. Med. Sci.* 1996, 58, 1-5.
- Simon S., Li H., O'Toole B. D., Crawford T. B., Oaks J. L.: The vesicular lesions of a cow and bison with sheep-associated malignant catarrhal fever contain ovine herpesvirus 2-infected CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 2003, 84, 2009-2013.
- Wibberley G.: Observations on two strains of bovine malignant catarrhal fever virus in tissue culture. *Res. Vet. Sci.* 1976, 21, 105-107.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Rola, ul. Kaniowczyków 11/2, 24-100 Puławy; e-mail: jrola@piwet.pulawy.pl