

Zmienność genetyczna oraz antygenowa syncytialnego wirusa oddechowego bydła a skuteczność immunoprofilaktyki swoistej

WOJCIECH SOCHA, JERZY ROLA

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Socha W., Rola J.

Genetic and antigenic variability of bovine respiratory syncytial virus and its influence on immunoprophylaxis

Summary

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is a virus of the Pneumovirus genus belonging to the subfamily Pneumovirinae of the Paramyxoviridae family. BRSV is one of the main infectious agents causing bovine diseases of the upper and lower respiratory tract, affecting mainly young animals under the age of 9 months. It is responsible for high economic losses in the cattle industry around the world. The most effective and widely used method for limiting costs of infection with BRSV is immunoprophylaxis. Till now, this subject was rarely an object of interest in Polish scientific literature, therefore the aim of this article is to present current information on the types of available vaccines, their efficiency and safety. Additionally, a description of the variability of most immunogenic regions of BRSV and its influence on the efficiency of the commonly used vaccines is included.

Keywords: BRSV, genetic variability, vaccines, immunoprophylaxis

Syncytialny wirus oddechowy bydła (BRSV) jest pneumowirusem zaliczanym do podrodziny *Pneumovirinae*, rodziny *Paramyxoviridae*. Oprócz BRSV do rodzaju tego należy kilka innych, blisko spokrewnionych z nim wirusów, takich jak ludzki syncytialny wirus oddechowy (HRSV) oraz syncytialny wirus oddechowy owiec (ORSV). BRSV jest odpowiedzialny za choroby górnych i dolnych dróg oddechowych u bydła, które u osobników młodych przebiegają z reguły w postaci ciężkiej (23). W zależności od warunków BRSV może samodzielnie wywoływać chorobę lub też może być jednym z głównych czynników w rozwoju tzw. zespołu oddechowego bydła (BRD). Ocenia się, iż straty w hodowli bydła związane z syndromem BRD sięgają nawet 750 mln dolarów w USA oraz 576 mln euro w Europie (1, 14). Straty te powodowane są wolniejszym przyrostem masy ciała oraz kosztami leczenia chorych zwierząt (6). Śmiertelność wśród zakażonych zwierząt rzadko przekracza 10% (9).

W celu ograniczenia strat ekonomicznych wynikających z zakażeń BRSV w wielu krajach europejskich oraz w Ameryce Północnej stosowana jest immunoprofilaktyka swoista. Wykorzystywane są zarówno szczepionki inaktywowane, jak i żywe, oparte na atenuowanym wirusie. Mimo potwierdzenia, że szczepionki zmniejszają nasilenie objawów klinicznych oraz

długość okresu siewstwa wirusa, szereg problemów związanych z immunoprofilaktyką zakażeń BRSV wciąż pozostaje nierozwiązanych (3). Jednym z nich jest konieczność zapewnienia odporności osobnikom bardzo młodym, u których wciąż obecne są przeciwciała matczyne. Udowodniono również, że niektóre serie szczepionek inaktywowanych powodowały zaostrezenie przebiegu choroby u zwierząt zaszczepionych (15). Opracowanie nowych, bardziej skutecznych szczepionek wymaga lepszego zrozumienia zmienności genetycznej oraz antygenowej BRSV.

Ponieważ w polskim piśmiennictwie brakuje danych na ten temat, celem tego artykułu było przedstawienie aktualnych informacji o rodzajach dostępnych szczepionek z uwzględnieniem ich skuteczności oraz bezpieczeństwa. Ponadto opisano zmienność wirusa obserwowaną w obrębie najbardziej immunogennych regionów BRSV oraz jej wpływ na efektywność powszechnie stosowanych szczepionek.

Epizootiologia BRSV

Zakażeniu BRSV ulega głównie młode bydło. Wykazano, że ok. 70% bydła w wieku do 9. miesiąca życia posiadało przeciwciała dla BRSV. Typowymi objawami towarzyszącymi infekcji są: przyspieszony oddech, kaszel, podwyższona temperatura oraz obecność du-

żej ilości wydzieliny z nosa. Cięższymi przypadkami towarzyszą trudności w oddychaniu oraz osłabienie łaknienia (23).

U bydła, podobnie jak w przypadku zakażeń HRSV u ludzi, może również dochodzić do reinfekcji, jednak w przypadku zakażeń BRSV kolejne infekcje mają łagodniejszy przebieg lub są zupełnie bezobjawowe. Prawdopodobnie wiąże się to z mniejszą zmiennością wirusa BRSV w porównaniu z wirusem HRSV (19).

Do zakażeń pneumowirusami dochodzi poprzez górne drogi oddechowe. Namnażanie wirusów zachodzi głównie w powierzchniowych warstwach nabłonka migawkowego oraz pneumocytach typu II. Towarzyszy temu niewielki efekt cytopatyczny, co wskazuje na istotną rolę układu odpornościowego gospodarza w patologii zakażenia (26). Odpowiada za nią przede wszystkim stan zapalny wywołany przez zwiększone wydzielanie cytokin oraz chemokin i związany z nim napływ limfocytów i makrofagów do tkanek układu oddechowego.

Zakażeniom BRSV często towarzyszą również oportunistyczne zakażenia bakteryjne (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*), które mogą powodować dodatkowe zmiany patologiczne w postaci zespołu oddechowego bydła (2).

Charakterystyka genetyczna i antygenowa wirusa

Genom BRSV stanowi jednoniciowa cząstka RNA o negatywnej polarności, długości ok. 15 000 zasad (2). Koduje on 10 mRNA, z których w wyniku translacji powstaje 11 białek wirusowych. RNA pozbawione jest odcinków poliA na końcach oraz struktury „cap”. Zaobserwować można polarny gradient transkrypcji genów, co powoduje, że geny położone na końcu 3' nici RNA ulegają transkrypcji najczęściej, natomiast te położone na końcu 5' najrzadziej. Przekłada się to na poziom produkcji poszczególnych białek. Układ genów w genomie BRSV jest następujący: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' (23). Ponieważ poziom ekspresji poszczególnych genów jest kluczowy dla właściwości patogennych wirusa, manipulacja układem genów BRSV może być użyta do uzyskania szczepów atenuowanych, które mogą zostać wykorzystane do produkcji szczepionek (12).

Analiza sekwencji nukleotydowych szczepów BRSV z całego świata, pozwoliła na wyodrębnienie 6 podgrup wirusa w oparciu o sekwencję genu kodującego białko G oraz 5 podgrup w oparciu o sekwencje genów białek N oraz F (22). Spośród wymienionych białek najbardziej zmienne jest białko G, które jest jednocześnie białkiem najbardziej immunogennym. Z tego też względu białko to wykorzystywane jest powszechnie do określania zależności filogenetycznej pomiędzy szczepami wirusa, jak i do rozróżniania grup serologicznych (7, 8, 22).

Badania filogenetyczne sekwencji kodujących białko G wykazały wyraźną zależność pomiędzy dystansem genetycznym między szczepami BRSV a ich geo-

graficznym występowaniem. Stwierdzono, że szczepy pochodzące z sąsiednich krajów wykazywały wyraźnie krótszy dystans genetyczny niż z krajów geograficznie oddalonych od siebie (5, 22). Ponadto, analiza sekwencji genetycznej szczepów BRSV obecnie występujących w Europie wykazała zależność pomiędzy zmiennością genu tego białka, a skutecznością stosowanych szczepionek. W krajach, gdzie szczepienia przeciw BRSV są powszechne (np. Francja, Belgia, Holandia), ewolucja sekwencji aminokwasowych w obrębie tego regionu była szybsza niż w krajach, w których zwierzęta szczepi się sporadycznie (Dania, Szwecja). Dowodzi tego wyższy stosunek zmian niesynonimicznych do synonimicznych u wirusów w populacjach, gdzie szczepienia są powszechne – 0,62; wobec populacji, gdzie szczepionki były stosowane rzadko – 0,48. Wskazuje to na ukierunkowaną ewolucję białek immunogennych wirusa w celu uniknięcia rozpoznania przez przeciwciała produkowane u szczepionych zwierząt. W efekcie szczepy wirusa izolowane obecnie w pierwszej grupie krajów należą głównie do V i VI podgrupy filogenetycznej, wykazującej znaczne różnice w stosunku do szczepów szczepionkowych stosowanych w Europie (II podgrupa filogenetyczna). Na ile zmienność ta przekłada się na skuteczność szczepionek, nie zostało jak dotąd jednoznacznie stwierdzone, jednak duże różnice w stosunku do szczepów szczepionkowych wykryte w sekwencjach szczepów izolowanych z przypadków zachorowań od zaszczepionych zwierząt mogą sugerować, że szczepionki te są mniej efektywne w zapobieganiu chorobom powodowanych przez BRSV (22).

Podobnie jak w przypadku HRSV, na podstawie reakcji wirusa z zestawem przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla białka G wyznaczono grupy serologiczne BRSV (7, 8, 16). Większość izolowanych szczepów można zakwalifikować do jednej z 3 podgrup: A, AB lub B (16), jednak ze względu na coraz większą liczbę izolowanych w ostatnich latach szczepów nie mieszczących się w żadnej z tych grup oraz wysoką homogeniczność wirusa BRSV, przypuszcza się iż wszystkie szczepy BRSV są jedynie wariantami wywodzącymi się z tej samej grupy serologicznej (5, 13). Dlatego podział szczepów BRSV oparty na reakcji z przeciwciałami monoklonalnymi wydaje się mniej przydatny dla klasyfikacji i charakterystyki szczepów niż w przypadku HRSV (5).

Immunoprofilaktyka zakażeń BRSV

Z powodu dużych strat finansowych wywołanych zakażeniami BRSV od wielu lat prowadzi się badania nad opracowaniem skutecznej profilaktyki u bydła. Mimo że pierwsze szczepionki wprowadzone zostały do użytku ponad 20 lat temu, ciągle są one modyfikowane oraz opracowuje się nowe ich odmiany (12).

Idealna szczepionka powinna posiadać zdolność wywoływania odporności u osobników młodych, mogących posiadać przeciwciała matczyne przeciw BRSV,

oraz zapewniać odporność przeciwko szczepom wirusa reprezentującym różne grupy filogenetyczne. W handlu dostępnych jest szereg szczepionek, różniących się rodzajem użytego szczepu, sposobem podawania oraz rodzajem wywoływanej odporności.

Szczepionki inaktywowane

Szczepionki tego typu dostępne są na rynku od ponad 20 lat, jednak wciąż istnieją kontrowersje co do ich skuteczności oraz bezpieczeństwa. Zakażenia eksperymentalne zwierząt szczepionych wirusem BRSV inaktywowanym formaliną wykazały, że szczepionka tego typu nie zapobiega rozwojowi objawów klinicznych choroby oraz siewstwu wirusa. Ponadto u zwierząt szczepionych przebieg zakażenia był cięższy niż u osobników kontrolnych (25). Podobny efekt zaobserwowano u naturalnie zakażonych zwierząt, które wcześniej zaszczepiono szczepionką inaktywowaną β -propiolaktone (10, 15). Zjawisko to prawdopodobnie związane jest z charakterem odporności immunologicznej, jaką wywołuje szczepionka inaktywowana. Wykazano, że po podaniu szczepionki inaktywowanej formaliną dochodzi do produkcji dużej ilości specyficznych przeciwciał klasy IgG przy niewielkiej produkcji przeciwciał neutralizujących oraz blokujących fuzję. Ponadto u zwierząt szczepionych po zakażeniu wirusem BRSV dochodzi do napływu limfocytów oraz eozynofili do układu oddechowego, co prowadzi do rozwoju lokalnego stanu zapalnego. Domięśniowa lub podskórna droga podawania szczepionek inaktywowanych sprawia, że są one bardziej narażone na neutralizację przez przeciwciała matczyne niż szczepionki żywe. Aby uzyskać optymalną odpowiedź immunologiczną, szczepionki inaktywowane podawane są zwykle wraz z adiuwantem (12). Poprzez dobór odpowiedniego adiuwantu do szczepionki, można wpłynąć na rodzaj wywoływanej odpowiedzi immunologicznej tak, aby dochodziło do produkcji dużej ilości przeciwciał neutralizujących oraz silnej aktywacji limfocytów cytotoksycznych T CD8⁺. W efekcie obecnie stosowane szczepionki inaktywowane, w których jako adiuwant wykorzystuje się saponinę, skutecznie ograniczają objawy kliniczne choroby oraz siewstwo wirusa nawet u zwierząt bardzo młodych (4, 18).

Szczepionki żywe atenuowane

Podobnie jak szczepionki inaktywowane, szczepionki żywe przeciw BRSV dostępne są na rynku od wielu lat. W szczepionkach tego typu stosuje się żywe szczepy wirusa BRSV, których zdolność do namnażania i wywoływania choroby została ograniczona. Osłabienie wirusa można uzyskać poprzez wielokrotne pasażę wirusa w hodowlach komórkowych, delecję części genów lub też modyfikację poziomu ekspresji genów wirusa (12). Do szczepień przeciwko BRSV można wykorzystać również rekombinowane żywe wirusy bydlęce inne niż BRSV (np. wirus ospy krowiej lub

BHV1), do genomu których włączono geny kodujące białka F lub G wirusa BRSV (12, 20, 21). Niezależnie od stosowanej metody atenuacji, kluczowe przy opracowywaniu szczepionki jest uzyskanie wirusa o maksymalnej immunogenności, ale o minimalnych właściwościach patogennych oraz ograniczonym ryzyku rewersji.

Współcześnie stosowane żywe szczepionki są podawane donosowo lub dotchawiczo, dzięki czemu atenuowany wirus trafia do organizmu taką samą drogą, jak wirus BRSV podczas naturalnej infekcji. W efekcie odpowiedź immunologiczna uzyskiwana w wyniku takiego szczepienia nie odbiega od odpowiedzi obserwowanej podczas infekcji naturalnej (12). Ponadto, wirus szczepionkowy podawany tą drogą w małym stopniu ulega neutralizacji przez przeciwciała matczyne, co sprawia, że szczepionki żywe są skuteczne również u osobników młodych. W wyniku szczepienia aktywowany jest przede wszystkim szlak oparty na limfocytach pomocniczych T typu 1 (Th1), dzięki czemu po zakażeniu zaszczepionych zwierząt wytwarzana jest silna odpowiedź komórkowa oraz wysokie miano przeciwciał neutralizujących (2, 24).

Szczepionki DNA

Szczepionki tego typu oparte są na wykorzystaniu plazmidów przenoszących geny, kodujące najbardziej immunogenne białka wirusa BRSV. Plazmidy te mogą być podawane poprzez zastrzyki domięśniowe lub podskórne. W wyniku podania plazmidu dochodzi do produkcji antygenów wirusowych u zaszczepionego osobnika. Wykazano, iż zastosowanie takich szczepionek może w znaczącym stopniu ograniczać siewstwo wirusa oraz zapobiegać wystąpieniu objawów u zakażonych zwierząt. Podobnie jak w przypadku szczepionek żywych, skuteczność szczepionki DNA wynika z jej zdolności do aktywowania szlaku opartego na limfocytach pomocniczych Th1 (11). Odpowiedź ta jest jednak słabsza niż uzyskiwana przy zastosowaniu szczepionek żywych (12, 17). W celu uzyskania wyższej odporności, można stosować doszczepianie zwierząt szczepionką inaktywowaną (12).

Zaletami szczepionek DNA jest łatwość przechowywania oraz podawania, ponadto nie są one podatne na neutralizację przeciwciałami matczynymi, dzięki czemu można je stosować nawet u zwierząt bardzo młodych (11). W odróżnieniu od szczepionek żywych oraz inaktywowanych, szczepionki DNA nie są jeszcze dostępne na rynku.

Reasumując można stwierdzić, że dotychczasowe badanie prowadzone z użyciem różnych rodzajów szczepionek przeciwko BRSV wykazały dość istotne różnice, jeśli chodzi o skuteczność oraz bezpieczeństwo ich stosowania (12). Ponieważ podanie niektórych szczepionek inaktywowanych potencjalnie może wiązać się z ryzykiem wystąpienia nasilonych objawów choroby oraz ze względu na niejednoznaczne wyniki badań na temat ich skuteczności u młodych

zwierząt, wydaje się, że aktualnie szczepienia z wykorzystaniem szczepionek żywych atenuowanych stanowią najbardziej efektywną metodę ograniczania strat związanych z zakażeniami BRSV.

Piśmiennictwo

1. Barret D. C.: Cost-effective antimicrobial drug selection for the management and control of respiratory disease in European cattle. *Vet. Rec.* 2000, 146, 545-550.
2. Easton A. J., Domachowski J. B., Rosenberg H. F.: Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 390-412.
3. Ellis J., West K., Konoby C., Leard T., Gallo G., Conlon J., Fitzgerald N.: Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218, 1973-1980.
4. Ellis J. A., West K. H., Waldner C., Rhodes C.: Efficacy of a saponin-*adjuvanted* inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. *Can. Vet. J.* 2005, 46, 155-162.
5. Elvander M., Vilcek S., Baule C., Uttenthal A., Ballagi-Pordany A., Belak S.: Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 2939-2946.
6. Fulton R. W., Cook B. J., Step D. L., Confer A. W., Saliki J. T., Payton M. E., Burge L. J., Welsh R. D., Blood K. S.: Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *Can. J. Vet. Res.* 2002, 66, 173-180.
7. Furze J., Wertz G., Lerch R., Taylor G.: Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 363-370.
8. Furze J. M., Roberts S. R., Wertz G. W., Taylor G.: Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity. *Virology*. 1997, 231, 48-58.
9. Larsen L. E.: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): A review. *Acta. Vet. Scand.* 2000, 41, 1-24.
10. Larsen L. E., Tegtmeyer C., Pedersen E.: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. *Acta. Vet. Scand.* 2001, 42, 113-121.
11. Letellier C., Boxus M., Rosar L., Toussaint J. F., Walravens K., Roels S., Meyer G., Letesson J. J., Kerkhofs P.: Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology. *Vaccine*. 2008, 26, 4840-4848.
12. Meyer G., Deplanche M., Schelcher F.: Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 31, 191-225.
13. Prozzi D., Walravens K., Langedijk J. P., Daus F., Kramps J. A., Letesson J. J.: Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 359-366.
14. Schneider M. J., Tait Jr R. G., Busby W. D., Reecy J. M.: An evaluation of bovine respiratory disease complex in feedlot cattle: Impact on performance and carcass traits using treatment records and lung lesion stores. *J. Anim. Sci.* 2009, 87, 1821-1827.
15. Schreiber P., Matheise J. P., Dessy F., Heimann M., Letesson J. J., Coppe P., Collard A.: High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 2000, 47, 535-550.
16. Schrijver R. S., Daus F., Kramps J. A., Langedijk J. P., Buijs R., Middel W. G., Taylor G., Furze J., Huyben M. W., Oirschot J. T. van: Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. *Vet. Microbiol.* 1996, 53, 253-260.
17. Schrijver R. S., Langedijk J. P., Keil G. M., Middel W. G., Maris-Veldhuis M., Oirschot J. T. van, Rijsewijk F. A.: Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine*. 1997, 15, 1908-1916.
18. Sluijs M. T. W. van der, Kuhn E. M., Makoschey B.: A single vaccination with an inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine primes the cellular immune response in calves with maternal antibody. *BMC Vet. Res.* 2010, 6, 1-7.
19. Stine L. C., Hoppe D. K., Kelling C. L.: Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Vet. Microbiol.* 1997, 54, 201-221.
20. Taylor G., Rijsewijk F. A., Thomas L. H., Wyld S. G., Gaddum R. M., Cook R. S., Morrison W. I., Hensen E., Oirschot J. T. van, Keil G.: Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 1759-1767.
21. Taylor G., Thomas L. H., Furze J. M., Cook R. S., Wyld S. G., Lerch R., Hardy R., Wertz G. W.: Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 3195-3206.
22. Valarcher J. F., Schelcher F., Bourhy H.: Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 2000, 74, 10714-10728.
23. Valarcher J. F., Taylor G.: Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007, 38, 153-180.
24. West K., Ellis J.: Functional analysis of antibody responses of feedlot cattle to bovine respiratory syncytial virus following vaccination with mixed vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 1997, 61, 28-33.
25. West K., Petrie L., Haines D. M., Konoby C., Clark E. G., Martin K., Ellis J. A.: The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Vaccine*. 1999, 17, 809-820.
26. Zhang L., Peeples M. E., Boucher R. C., Collins P. L., Pickles R. J.: Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J. Virol.* 2002, 76, 5654-5666.

Adres autora: mgr Wojciech Socha, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: wojciech.socha@piwet.pulawy.pl