

Wirus mogący powodować zespół nabytego niedoboru odporności u bydła

Zakład Wirusologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

W 1972 r. Van Der Maaten i wsp. dokonali izolacji nieznanego u bydła wirusa, powodującego trwałą limfocytozę u zakażonych zwierząt (1). Wirus ten o symbolu R29 zaliczono do rodziny *Retroviridae*, rodzaju *Lentivirus*. Ogólnie choroby wywołane przez te wirusy dzieli się na pierwotne i wtórne (9). Choroby pierwotne są bezpośrednim następstwem replikacji wirusa w populacji makrofagów zaatakowanych tkanek organizmu. Natomiast choroby wtórne są konsekwencją zakażenia subpopulacji limfocytów o fenotypie CD4+ (T4), wynikiem czego jest ich delecja i supresja immunologiczna.

Do typowych cech wirusów powolnych (*Lentivirus*) według Haase (cyt. 1) należą:

- ograniczona replikacja w zakażonych komórkach gospodarza z długim okresem utajenia;
- wywoływanie wolno rozwijającej się choroby nieonkotworowej;
- zdolność do złuszczenia białek otoczki zewnętrznej;
- zdolność do zmiany struktury białek otoczki zewnętrznej w wyniku mutacji punktowych genu env, co określane jest mianem dryftu antygenowego.

Wirus R29 wyizolowany z limfocytów bydłych prowadził u zakażonych zwierząt do trwałej limfocytozy, uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych, nasilającego się osłabienia i wychudzenia (2). Choroba przebiegała wśród objawów ogólnych: gorączki, niedokrwistości, obniżonej odporności, czego klinicznym wyrazem było zapalenie płuc (Haase 1986, Gonda 1988). Objawy chorobowe narastały powoli, co powodowało, że przebieg choroby był przewlekły i progresywny (3).

Badania Gondy i wsp. wykazały, że nowo odkryty wirus koduje odwrotną transkryptazę, która jest cechą charakterystyczną retrowirusów (2). Wirus ulega replikacji *in vitro* w hodowlach komórek embrionalnych tkanek bydłych, czego wyrazem jest powstawanie zespólni (syncytii). Pod względem morfologii wirus jest podobny do ludzkiego wirusa HIV – powodującego syndrom nabytego niedoboru odporności (AIDS). Dojrzałe, pozakomórkowe cząstki wirusów HIV i BIV (wirus nabytego syndromu niedoboru odporności u bydła) mają średnicę 110-130 nm, posiadają skondensowany rdzeń o zmiennej gęstości elektronowej w kształcie pasa. Badania serologiczne wykazały, że główne białka rdzenia u retrowirusa człowieka (HIV) i bydła (BIV) są wysoce konserwatywne. Wspólne determinanty antygenowe stwierdzono także u retrowirusów innych gatunków zwierząt należących do rodzaju *Lentivirus*, jak np.: wirus choroby maedi-visna u owiec, wirus niedokrwistości zakaźnej koni, wirus zapalenia mózgowia i stawów u kóz, wirus (nabytego) niedoboru odporności u małp (SIV), wirus niedoboru odporności u kotów (4).

W odniesieniu do nowo odkrytego wirusa izolowanego od bydła Gonda i wsp. zaproponowali nazwę BIV – Bovine Immunodeficiency Virus – wirus (nabytego zespołu)

niedoboru odporności, co podkreśla genetyczne i biologiczne pokrewieństwo z wirusem HIV u człowieka. Zarówno wirus BIV, jak i HIV wykazują zdolność do tworzenia syncytiów, co w połączeniu z obumieraniem komórek uznawane jest za główny efekt cytopatyczny, jaki wirusy te powodują w hodowli komórek *in vitro*. Komórki nabłonkowe tchawicy bydłej lub inne pierwotne komórki bydłace zakażone BIV wykazują obecność wirusa zaledwie w kilku pasażach i nie udało się wyprodukować z nich linii ciągłych. Utrudnia to badanie długotrwałych efektów oddziaływania wirusa BIV na komórki po zakażeniu *in vitro* (3).

Patogenezę zakażeń wirusem BIV u bydła badali Scott i wsp. (5). Dwom cielętom podano wirus BIV-R29 wyizolowany przez Van Der Maatena. Wirus namnożono *in vitro* w hodowli komórek embrionalnych śledziony cielęcia. Po 21 dniach od podania BIV stwierdzono obecność przeciwciał metodą immunofluorescencji pośredniej. Potwierdzenie zakażenia produktywnego uzyskano przy kokultywacji hodowli komórek śledziony płodu bydłacego z jednojądrzastymi leukocytami krwi obwodowej cieląt zakażonych, wykazując wzrost aktywności odwrotnej transkryptazy. Obecność zintegrowanego prowirusa BIV w DNA jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej potwierdzono reakcją polimeryzacji łańcuchowej (PCR). W okresie pomiędzy 3 a 4 miesiącem po zakażeniu zmniejszył się u cieląt odsetek oraz bezwzględna liczba jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej, reprezentowanych przez limfocyty T. Spadek liczby limfocytów wydawał się być wynikiem wybiórczej utraty z organizmu komórek T-pomocniczych w stosunku do komórek T-supresorowych.

Odpowiedź humoralną po eksperymentalnym i naturalnym zakażeniu BIV badała Whetstone i wsp. (6). Okresowe występowanie przeciwciał i ich swoistość badano przy pomocy pośredniej immunofluorescencji oraz techniki Western Blot. Obie techniki dały wynik negatywny w reakcji krzyżowej z przeciwciałami dla wirusa białaczki bydła (BLV) i wirusa syncytialnego bydła (BSV) – dwóch powszechnie znanych retrowirusów bydłych oraz z przeciwciałami dla wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD), który należy do rodziny *Flaviviridae*. Wirus BVD-MD występuje powszechnie w populacji bydła, a także stanowi częste zakażenie i zanieczyszczenie surowic bydłych i hodowli komórek w laboratoriach wirusologicznych, mógłby zatem być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych. U wszystkich eksperymentalnych cieląt nie wykryto obecności przeciwciał dla wirusów BIV, BLV, BSV przed eksperymentalnym zakażeniem wirusem BIV. W okresie do dwóch miesięcy po zakażeniu stwierdzano pojawienie się przeciwciał dla wirusa BIV zarówno w odczynie immunofluorescencji pośredniej, jak i techniką Western Blot. Wykrywalny poziom przeciwciał utrzymywał się przez okres 2 lat. Wyniki

uzyskane techniką Western Blot wykazały, że wszystkie doświadczalnie zakażone cielęta wytworzyły przeciwciała dla białka p26 kodowanego przez wirus BIV. Przeciwciała te pojawiły się jako pierwsze i wykazywały najsilniejszą reakcję w dalszych badaniach. U zwierząt kontrolnych, którym podano hodowlę embrionalnych komórek śledziony cielęciana nie zakażonych wirusem BIV, przeciwciał dla białka p26 nie wykryto.

Kolejnym eksperymentem było określenie możliwości przenoszenia wirusa BIV ze zwierzęcia na zwierzę poprzez krew. Jednemu z pięciu cieląt bezsiarowych w wieku 4-6 tyg., reagujących serologicznie negatywnie w stosunku do wirusa BIV, podano dożylnie hodowlę komórek zakażonych tym wirusem. Następnie pozostałym cielętom podano dożylnie po 100 ml krwi pobranej od pierwszego cielęcia. Pasaże *in vivo* wykonywano zakażając kolejne cielęta w odstępach co dwa tygodnie. Wirus BIV izolowano ze wszystkich próbek krwi pobranych od cieląt z kolejnych zakażeń. Wszystkie cielęta, którym podano krew w kolejnych pasażach wytworzyły przeciwciała dla wirusa BIV. Cielę, które otrzymało wirus BIV jako drugie wykazywało w okresie 1-3 tyg. po zakażeniu niskie miano przeciwciał w teście immunofluorescencji pośredniej. Miało to wykazywać tendencję wzrostową osiągając wartość 512 w piątym tygodniu po zakażeniu. Dane te potwierdzają możliwość przenoszenia wirusa BIV z krwią, również w okresie przed pojawieniem się przeciwciał w surowicy krwi „dawcy”. Jest to wspólna cecha wirusów HIV i BIV.

Whetstone i wsp. starali się także określić, czy istnieje możliwość wykrycia przeciwciał u zwierząt eksponowanych na zakażenie naturalne wirusem BIV (6). Próbkę surowicy krwi pobrano od krów mlecznych z czterech stad:

1. stado, w którym stwierdzono wysoki odsetek występowania mięsaka limfatycznego, ciągłe problemy zdrowotne i zejścia śmiertelne w okresie okołoporodowym (78 próbek);
2. stado cechujące się niską wydajnością mleczną, z ciągłymi problemami zdrowotnymi zwłaszcza obrzękami stawów i kulawiznami w okresie okołoporodowym (21 próbek);
3. stado krów z trwałą leukocytozą bez przeciwciał dla wirusa BLV (7 próbek);
4. stado krów klinicznie zdrowych – grupa kontrolna (17 próbek).

Wyniki testów pośredniej immunofluorescencji oraz Western Blot wypadły pozytywnie u 54 zwierząt na 78 (69,2%) w stadzie 1. W surowicach 34 krów (43,6%) miana przeciwciał wynosiły od 64 do ponad 512. Wszystkie próbki surowicy dodatnich ze stada 1 zawierały przeciwciała dla białka p26, ale rozpoznawały także polipeptydy p110, p55, p42, p24, p18, p15 i p13 wirusa BIV. Spośród 78 próbek surowicy krwi stada 1 – 58 (74,3%) reagowało serologicznie pozytywnie w stosunku do wirusa BLV i 35 (44,9%) w stosunku do BSV. Jednakże nie stwierdzono prostej korelacji pomiędzy tymi wynikami.

Próbki surowicy krwi ze stad 2, 3, 4 nie zawierały przeciwciał dla wirusa BIV (test immunofluorescencji; Western Blot nie wykonywano). Podsumowując badania Whetstone i wsp. nad odpornością humoralną na zakażenie BIV można stwierdzić, że zwierzęta zakażone doświadczalnie wytwarzały przeciwciała w okresie 3 tyg. po zakażeniu. Ponieważ wykazano możliwość transmisji wi-

rusa za pośrednictwem krwi zwierząt zakażonych, istnieje realna groźba roznoszenia zakażenia BIV drogą zabiegów lekarsko-weterynaryjnych. Technika Western Blot wykazała, że pierwsze przeciwciała skierowane są przeciwko białku wirusowemu p26. Przeciwciała te wykrywano jeszcze po dwóch latach po zakażeniu. Wyniki badań nad innymi wirusami powolnymi wskazują, że białko rdzenia – kapsydu jest proteiną dominującą immunologicznie. Przypuszcza się, że białko p26 jest głównym białkiem rdzenia lub kapsydu BIV.

W 1990 roku Garvey i wsp. określili sekwencje nukleotydów biologicznie aktywnych prowirusów wirusa BIV (kłony 106 i 127) (4). Poza genami gag, pol i env, genom wirusa BIV zawiera pomiędzy pol i env pięć krótkich odcinków otwartej ramki odczytu (ORF) zachodzących jednocześnie na wymienione dwa geny strukturalne w rejonie centralnym, który jest znakiem rozpoznawczym wirusów powolnych i który, jak się przypuszcza, odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby. Trzy spośród pięciu krótkich odcinków ORF w rejonie centralnym genomu wirusa BIV zidentyfikowano poprzez podobieństwo położenia i struktury genów regulacyjnych (niestrukturalnych) vif, tat, rev innych wirusów powolnych. Ponadto odkryto dwie rzadko występujące otwarte ramki odczytu, oznaczone W i Y, mogące działać jako eksony dla nowych genów. W przypadku wirusa BIV nie stwierdzono obecności genu nef, który występuje w genomach innych lentiwirusów Naczelnych.

Struktura genomu wirusa BIV nasuwa przypuszczenie występowania wielokrotnych transkrypcji podczas cyklu replikacyjnego wirusa, podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych lentiwirusów (7). Carpenter i wsp. badając wczesne skutki zakażenia wirusem BIV szczep R29 wykazali serokonwersję u wszystkich zakażonych cieląt w okresie do 6 tyg. po zakażeniu. Wirus można było wyizolować od każdego cielęcia po 2 tyg. od zakażenia. Jednakże poziom replikacji wirusa BIV *in vivo* okazał się niski (8). Badania metodą hybrydyzacji *in situ* wykazały bowiem, że w szczytowym okresie replikacji wirusa BIV mniej niż 0,03% jednojądrzastych komórek krwi obwodowej wykazywało reakcję pozytywną. Oceniając reakcję hybrydyzacji ilościowo wykazano, że ilość wirusowego RNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej była mniejsza niż 1/10 wartości obserwowanej w trwale zakażonych komórkach *in vitro*. Cielęta zakażone wirusem BIV miały znamienne wyższą liczbę limfocytów krążących. W węzłach chłonnych i śledzionie stwierdzono rozrost grudkowy. Zmiany histopatologiczne występujące u cieląt zakażonych wirusem BIV były podobne do zmian w początkowym okresie zakażenia wirusem HIV 1 u człowieka. Badania *in vivo* wskazują, że byłoby zakażone wirusem BIV może stanowić przydatny model zwierzęcy do badań początkowego okresu patogenyzy syndromu nabytego niedoboru odporności u człowieka (AIDS) wywołanego zakażeniem wirusem HIV 1.

Piśmiennictwo

1. Van Der Maaten M.J., Boothe A.D., Seger C.L.: J. Natl. Cancer Inst. 49, 1649, 1992.
2. Gonda M.A., Braun M.J., Carter S.G., Kost T.A., Bess J.W., Arthur L.O., Van Der Maaten M.J.: Nature (London) 330, 388, 1987.
3. Braun M.J., Lahn S., Boyd A.L., Kost T.A., Nagashima K., Gonda M.A.: Virology 167, 515, 1988.

4. Garvey K.J., Oberste M.S., Elser J.E., Braun M.J., Gonda M.A.: *Virology* 175, 391, 1990.
5. Scott J.L., Thurmond M.A., Theilen G.H., Sninsky J., Kwon D., Taylor B.: 70th Annual Meeting of the Conf. of Res. Work in Anim. Dis. 44, 1989.
6. Whetstone C.A., Van Der Maaten M.J., Black J.W.: *J. Virol.* 64, 3557, 1990.
7. Oberste M.S., Greenwood J.D., Gonda M.A.: *J. Virol.* 65, 3932, 1991.

8. Carpenter S., Miller L.D., Alexandersen S., Whetstone C.A., Van Der Maaten M.J., Vivf B., Wannemuehler Y., Miller J.M., Roth J.A.: *J. Virol.* 66, 1074, 1992.
9. Narayan O., Clements J.E.: *J. Gen. Virol.* 70, 1617, 1989.

Adres autora: lek. wet. Mirosław P. Polak, ul. Krzywa 10, 24-130 Końskowola

ZYGMUNT PEJSAK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI
Puławy

artykuł przeglądowy

Aktualne dane dotyczące syndromu epizootycznego ronienia i zaburzeń oddechowych u świń (PRRS)

W ostatnim okresie obserwuje się wyraźnie zmniejszone zainteresowanie lekarzy praktyków oraz pracowników naukowych zespołem PRRS, który pojawił się w Europie w roku 1990. Przyczyną jest przede wszystkim obserwowana we wszystkich krajach Europy zmiana postaci choroby. Stwierdzana w latach 1990 i 1991 często ostra postać PRRS ustąpiła na rzecz postaci o przebiegu łagodnym, przy której obraz kliniczny w większym stopniu zależy od występujących w chlewni zakażeń wtórnych niż od czynnika pierwotnego, którym jest wirus *Lelystad* (LV).

Podkreślając zmianę charakteru choroby należy zwrócić uwagę, że jej występowanie stało się bardziej powszechne, a straty związane z immunosupresyjnym działaniem LV i coraz częstsze ujawnianie się chorób układu oddechowego świń mogą mieć ścisły związek z prawie ubikwitarным występowaniem tego czynnika patogenego (8).

Mając na uwadze przedstawione zjawiska uznano za celowe omówienie najnowszych danych dotyczących PRRS.

W roku 1991 oraz 1992 w szeregu laboratoriów potwierdzono doświadczalnie, że wyizolowany w Instytucie Weterynarii w Lelystad (Holandia), należący do rodziny *Togaviridae*, wirus *Lelystad*, jest czynnikiem etiologicznym PRRS (15). Jak wynika z badań autorów niemieckich i amerykańskich (3, 12), drobnoustroj ten jest niehemaglutynującym otoczkowym wirusem RNA. W mikroskopie elektronowym jego wiriony mają kształt sferyczny oraz średnicę około 62 nm (48-83 nm). Zawarty w otoczce rdzeń wirusa ma wielkość 25 – 30 nm. Wirus namnaża się wyłącznie w cytoplazmie komórek. Nie reaguje on z przeciwciałami dla wirusów występujących ubikwitarne np. parwowirusów świń, a także wirusów z rodziny *Togaviridae* – rodzaju alfawirus, rubiwirus oraz pestiwirus. Wszystkie izolowane szczepy LY wykazują homologiczność białek wirusa. Poprzez morfologiczne podobieństwo białek strukturalnych i powinowactwo do makrofagów LV podobny jest do należących do podrodziny *Arteriviridae*, rodziny *Togaviridae* wirusów: zapalenia tętnic u koni (EAV), wirusa LDV (lactase dehydrogenase – elevating virus) oraz wirusa SHF (simian hemorrhagic fever virus).

Wirus *Lelystad* przeżywa dobrze w temperaturze +4°C i -70°C. Jest natomiast bardzo wrażliwy na temperaturę 56°C (2). Makrofagi pęcherzyków płucnych i makrofagi śledziony wydają się być jedynymi komórkami (target cells), w których dochodzi do replikacji wirusa w warunkach

in vivo; zakażone przez LV komórki ulegają lizie (Molitor). Makrofagi pęcherzyków płucnych młodych świń są, obok linii komórkowej CL2621 – Ingelheim Behringer (10), jedynymi komórkami, w których omawiany wirus namnaża się *in vitro*. Choi i wsp. (4) wykazali, że LV może przebywać w organizmie zakażonych świń w postaci immunokompleksów; stwarza to możliwość ciągłego namnażania tego czynnika patogenego. Wymienieni autorzy dowiedli również istnienia fenomenu stymulacji namnażania się LV w obecności swoistych przeciwciał (antibody-dependent enhancement of virus replication). Ohlinger i wsp. (12) podają, że obok zjadliwych szczepów LV na niektórych obszarach Niemiec, tam gdzie nie obserwowano klinicznej postaci omawianej choroby, stwierdzano występowanie niepatogennych lub mało patogennych szczepów tego drobnoustroju. Wykazano, że LV posiada zdolność przekraczania bariery łożyskowej i zakażenia zarodków i płodów. Najbardziej wrażliwe na zakażenie są płody w końcowym okresie trzeciego trymestru ciąży (5). Doświadczalnie dowiedziono immunosupresyjnych właściwości LV (9).

Oceniając przydatność różnych środków dezynfekcyjnych na przeżywalność omawianego drobnoustroju wykazano, że preparaty dezynfekcyjne, inaktywujące wirus pomoru klasycznego świń, są również efektywne w zwalczaniu PRRS. Wyniki badań Centralnego Instytutu Weterynarii w Weybridge wykazały szczególną przydatność preparatu Vircon S, stosowanego w rozcieńczeniu 1 : 700 (8).

Obserwacje własne oraz dane piśmiennictwa (8) wskazują, jak wspomniano uprzednio, że w ostatnim okresie bardzo rzadko stwierdza się ostry przebieg choroby; utrudnia to możliwość postawienia diagnozy wyłącznie w oparciu o obserwacje stanu zdrowotnego stada. Warto pamiętać, że również inne jednostki chorobowe, jak: grypa świń, zapalenie mózgu i mięśnia sercowego oraz choroba Aujeszkiego, charakteryzują się przebiegiem klinicznym podobnym do PRRS. Mało typowe są również zmiany anatomopatologiczne. Reasumując, można stwierdzić, że postawienie rozpoznania na podstawie zmian klinicznych i anatomopatologicznych jest trudne.

W diagnostyce serologicznej PRRS w wielu krajach Europy wykorzystuje się, w badaniach par surowic, test immunoperoksydazowy, ELISA, próbę immunofluorescencji pośredniej oraz odczyn seroneutralizacji (1, 6). Wspomniane metody stosuje się przede wszystkim dla oceny