

ZBIGNIEW GRĄDZKI, STANISŁAW WINIARCZYK

artykuł przeglądowy

Koronawirus układu oddechowego (PRCV) i jego patogenność dla świń

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Epizootologia zakażeń

Przeprowadzone w 1984 r. w Belgii badania przeglądowe pod kątem występowania przeciwciał dla wirusa TGEV (Transmissible gastroenteritis virus), wykazały zaskakujący wzrost odsetka dodatnich seroreagentów w dużych fermach trzody chlewnej (32). W okresie poprzedzającym te badania, przeciętnie u 12-24% loch stwierdzano w surowicy krwi przeciwciała neutralizujące wirus zapalenia żołądka i jelit, co wskazywało na wcześniejszy kontakt z zarazkiem. W badaniach z 1984 r. wykazano natomiast, że w ciągu krótkiego okresu czasu u ok. 70% dorosłych świń pojawiły się przeciwciała dla wirusa TGE. Zaistniały fakt nie miał związku z klinicznymi przypadkami zachorowań świń w okresie wcześniejszym, ani też ze szczepieniami profilaktycznymi przeciwko TGE. U zwierząt seropozytywnych nie obserwowano klinicznie uchwytłych objawów chorobowych w postaci biegunki lub padnięć w grupie nowo narodzonych prosiąt, nasuwających podejrzenie wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń. W 1986 r. Pensaert i wsp. wyizolowali z błony śluzowej nosa świń pochodzących ze stada zapowietrzonego, wirusa spokrewnionego antygenowo z TGEV oraz potwierdzili jego związek przyczynowy z występowaniem w surowicy krwi przeciwciał neutralizujących ten zarazek (32). Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że nowo odkryty wirus posiada morfologię typową dla koronawirusów, a zarazek otrzymał nazwę Porcine Respiratory Coronavirus (PRCV). Do końca lat 80-tych zakażenia wirusem PRCV objęły blisko 100% ferm trzody chlewnej na terenie Europy zachodniej (31), natomiast na początku lat 90-tych zarazek wyizolowano w USA (17, 51). Przeprowadzone ostatnio na terenie kraju badania inwentaryzacyjne wykazały, że w Polsce, podobnie jak w innych krajach europejskich, przeciwciała dla wirusa PRCV stwierdza się w większości ferm trzody chlewnej (14).

W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat zakażeń świń koronawirusem układu oddechowego oraz implikacji epidemiologicznych spowodowanych pojawieniem się tego zarazka w populacji trzody chlewnej.

Wirus PRCV jest obecnie szeroko rozprzestrzeniony w stadach świń na terenie Europy (24, 33, 36). Szybkość rozprzestrzeniania się zakażeń w drugiej połowie lat 80-tych we wszystkich krajach prowadzących intensywną hodowlę świń wskazywała na aerogenną drogę szerzenia się infekcji. Przykładowo w fermach duńskich, w których nigdy nie notowano przypadków TGE ani nie wprowadzano do nich świń pochodzących z importu, stwierdzono również obecność przeciwciał dla PRCV (12). Hipotezę aerogennego szerzenia się zakażenia potwierdziły badania eksperymentalne, które wykazały, że zawiesina aerozolowa wirusa jest w stanie zainicjować infekcję w układzie oddechowym, po czym dochodzi do replikacji zarazka w płucach oraz wydalania go z wydzieliną nosową przez okres 8-13 dni po zakażeniu (24). Fale zakażeń w fermach wielkotowarowych przypadają najczęściej na okres jesienno-zimowy, jakkolwiek w niektórych obiektach wirus utrzymuje się przez cały rok, powodując infekcje przetrwałę. Taki stan uwarunkowany jest zakażaniem się kolejnych miotów prosiąt, co zbiega się czasowo z obniżaniem się miana przeciwciał siarowych pomiędzy 5-8 tyg. życia. Wykazano, że do zakażenia dochodzi najczęściej w 5 tyg. życia prosiąt, tj. w okresie kiedy obecne jeszcze przeciwciała matczyne nie są już w stanie zapobiec inicjacji infekcji w układzie oddechowym (24, 35).

Charakterystyka molekularna wirusa

Poglądy dotyczące natury nowo odkrytego wirusa PRCV były zróżnicowane. Pierwotnie uważano, że mógł to być szczepionkowy szczep wirusa TGEV zaadaptowany do układu oddechowego świń w wyniku immunizacji drogą aerogenną. Inne hipotezy zakładały możliwość wyselekcjonowania nowego wirusa w drodze spontanicznych rekombinacji genomowych pomiędzy TGEV a innymi koronawirusami nie spokrewnionymi serologicznie oraz gatunkowo (37). Filogenetyczne pochodzenie PRCV zostało wyjaśnione dopiero dzięki analizie genomu wirusa, która wykazała, że zarazek ten pochodzi od

TGEV, u którego określone modyfikacje w obrębie genów kodujących białka strukturalne i niestrukturalne spowodowały istotne różnice fenotypowe (24).

Genom wirusa PRCV stanowi jednoniciowy, pozytywnie spolaryzowany kwas RNA o długości około 30 000 nukleotydów. Podobnie jak u innych koronawirusów blisko 2/3 potencjału kodującego genomu z końca 5' zaangażowane jest w funkcjonowanie mechanizmów transkrypcji RNA i w replikacji wirusa, poprzez kodowanie RNA-zależnej polimerazy RNA (18, 23, 41). Geny kodujące główne białka strukturalne wirionu oraz pozostałe białka niestrukturalne zlokalizowane są natomiast w obrębie końca 3' i obejmują 1/3 terminalną część genomu. Mechanizmy transkrypcji RNA, ekspresji genów oraz translacji poszczególnych subgenomowych mRNA wirusa PRCV są analogiczne do opisywanych u TGEV i innych koronawirusów i zostały omówione obszerniej w poprzednim artykule (15). Ścisłe pokrewieństwo antygenowe PRCV i TGEV oraz odmienny tropizm tkankowy obu wirusów sugerowały istnienie pomiędzy nimi różnic na poziomie genomu. Porównanie sekwencji genomowych obu zarazków w obrębie fragmentów o poznanej strukturze pierwszorzędowej wykazało, że globalna organizacja genomu PRCV jest identyczna z opisywaną u TGEV (28, 34). Oba wirusy posiadają także identyczny liderowy RNA tak pod względem długości sekwencji jak i struktury pierwszorzędowej (27). Istotne różnice stwierdzono natomiast w dwóch miejscach genomu PRCV tj. w genie kodującym główne białko strukturalne wirionu – glikoproteinę S oraz w obrębie ramki odczytu ORF-3a (Open Reading Frame), kodującej białko niestrukturalne o nieznannej funkcji. Różnice te polegają na istnieniu delekcji, nie stwierdzono natomiast obecności w genomie sekwencji unikatowych tylko dla PRCV (34, 50). Ponadto wykazano, że delekcje u szczepów PRCV izolowanych w USA różnią się od występujących w szczepach europejskich (47), jakkolwiek obie grupy wirusów wykazują generalnie te same różnice sekwencji w porównaniu z TGEV. Porównanie sekwencji genomowych genu glikoproteiny S szczepów amerykańskich i europejskich PRCV z genomem TGEV wykazało, że główna delekcja zlokalizowana jest w obrębie końca 5' genu S PRCV. Wielkość oraz lokalizacja tej delekcji różnią się w zależności od szczepu wirusa. U izolatów europejskich ma ona długość przeważnie 672 nukleotydów i zaczyna się od 59 nukleotydu po kodonie inicjacyjnym AUG genu S. U szczepów amerykańskich delekcje mają wielkość 621-681 nukleotydów, a początek pomiędzy 47-62 nukleotydem po kodonie AUG. Konsekwencją istnienia delekcji w genie S jest długość oraz masa syntetyzowanego przez zakażone komórki białka peplomeru. U szczepów PRCV wynosi ona 1206-1209 reszt aminokwasowych, natomiast u TGEV

1431-1433 aminokwasy, przy względnej masie odpowiednio 170 kDa i 220 kDa (50).

W obszarze ramki odczytu ORF-3a genomu europejskich szczepów PRCV stwierdzono trzy delekcje o długości 13, 22 i 36 nukleotydów (28, 34). Izolaty amerykańskie zawierały natomiast tylko jedną krótką delekcję o długości 5 nukleotydów (50). Ponieważ 13 nukleotydowa delekcja u szczepów europejskich obejmuje część tzw. sekwencji konsensusowej (CUAAAC), powoduje to zablokowanie transkrypcji subgenomowego mRNA-3, a ramka ORF-3a pełni funkcję pseudogenu (4, 34). Te różnice na poziomie genomu pozwalają wnioskować, że obydwa pneumotropowe warianty PRCV powstały niezależnie od siebie, na co wskazuje także fakt rozprzestrzeniania się w geograficznie różnych środowiskach i atakowania różnych populacji świń. Mechanizm powstawania delekcji w genomie PRCV nie został wyjaśniony. Jedną z hipotez opiera się na fakcie częstego występowania rekombinacji RNA wśród koronawirusów, co związane jest z tendencją polimerazy RNA do pauzowania w procesie transkrypcji a następnie do przeskakiwania do innych miejsc w obrębie matrycy RNA (copy-choice mechanism) (18).

Najbardziej spektakularną konsekwencją istnienia delekcji w genomie PRCV jest zmiana cech fenotypowych wirusa, a głównie tropizmu tkankowego. Glikoproteina S u koronawirusów odgrywa kluczową rolę w przytwierdzaniu się cząstek wirionów do komórek docelowych oraz w indukowaniu fuzji pomiędzy wirusem a błoną komórkową (18, 23). Wykazano, że zredukowana enteropatogenność dla prosiąt osesków niektórych zmutowanych cząstek TGEV, miała związek z istnieniem substytucji lub krótkich delekcji w obszarze aminoterminalnym białka S (24). Rolę głównego receptora komórkowego dla wirusa TGEV i PRCV odgrywa enzym aminopeptydaza N (APN) (8). Wydaje się jednak, że sama możliwość wiązania się białka wirusowego z receptorem nie jest jedynym wyznacznikiem tropizmu tkankowego wirusa. Drugą poza delekcją w genie S istotną różnicą w genomie PRCV jest konwersja ramki ORF-3a do funkcji pseudogenu. Znaczenie tej modyfikacji genomowej podkreśla fakt, że niektóre szczepy TGEV cechujące się ograniczoną zdolnością do namnażania się w jelitach, wykazywały delekcje w obszarze ramki ORF-3a przy braku zmian w genie glikoproteiny S (49). Replikacja PRCV w układzie oddechowym ma miejsce głównie w komórkach epitelialnych dróg oddechowych oraz w makrofagach pęcherzyków płucnych. Ograniczoną replikację w tych obszarach stwierdzano także w odniesieniu do TGEV, ale dotyczyła ona głównie szczepów adaptowanych do hodowli komórkowych, w mniejszym stopniu izolatów terenowych. Spostrzeżenia te pozwalają lepiej sprecyzować pochodzenie filogenetyczne PRCV, który najprawdopodobniej wywodzi się ze szczepu TGEV wykazują-

cego oryginalnie powinowactwo do układu oddechowego, natomiast jego pneumotropizm utrwalony został w wyniku zmian w genie glikoproteiny S oraz ORF-3a (24).

O bliskim pokrewieństwie PRCV i TGEV świadczy także obecność wielu wspólnych determinant antygenowych, warunkująca wzajemną krzyżową reaktywność na poziomie głównych białek strukturalnych wirionów. Nie można zatem zróżnicować serologicznie tych zarazków stosując surowice poliklonalne (5). Identyfikacja determinant różnicujących może być dokonana jedynie dzięki użyciu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko TGEV (39). Wykazano, że epitopy różnicujące oba wirusy zlokalizowane są w aminoterminalnej części białka S TGEV, a przeciwciała monoklonalne specyficznie je rozpoznające nie mają własności neutralizujących (9). Determinanty te, oznaczone symbolami D i C zostały zmapowane w tej części łańcucha polipeptydowego glikoproteiny S TGEV, która objęta jest delecją u wirusa PRCV. Tłumaczy to brak reakcji przeciwciał monoklonalnych przeciwko tym determinantom z wirusem PRCV. Na bazie przeciwciał monoklonalnych różnicujących TGEV i PRCV opracowano test ELISA wykorzystywany aktualnie w różnicowej diagnostyce serologicznej zakażeń tymi wirusami, co jest niezbędne w międzynarodowym obrocie trzodą chlewną (40).

Patogeneza

Szczegółowej analizy patogenezy zakażenia wirusem PRCV u świń dokonano w oparciu o badania eksperymentalne, w których wykazano, że lokalizacja zarazka w ustroju różni się w zależności od wieku zwierzęcia w jakim doszło do infekcji (6, 26). W przypadku doświadczalnej inokulacji metodą aerozolewą lub donosowo-doustną prosiąt w grupie wiekowej poniżej 1 tyg., pozbawionych specyficznych przeciwciał dla PRCV, wirus izolowano z błony śluzowej jamy nosowej, migdałków, tchawicy i płuc. Ponadto zarazek stwierdzano w treści żołądka i jelit cienkich (26). W grupie prosiąt zakażonych metodą aerozolewą obecność wirusa stwierdzono także we krwi, krezkowych węzłach chłonnych i okrężnicy. Pomimo wystąpienia wirerii już w drugim dniu po inokulacji, nie obserwowano lokalizacji wirusa w narządach mięsnych. Wydaje się, że głównym miejscem docelowego namnażania się PRCV jest układ oddechowy, na co wskazuje wysokie miano wirusa stwierdzane w szczytowych płatach płuc, sięgające $10^{8,3}$ TCID₅₀/g tkanki. Metodą immunofluorescencji wykazano, że wirus lokalizuje się w komórkach nabłonkowych błony śluzowej jamy nosowej, oskrzelach, oskrzelikach, nabłonku pęcherzyków płucnych i makrofagach pęcherzyków płucnych (6). Maksymalną liczbę zakażonych komórek stwierdzano w 3 dniu po zakażeniu w oskrzelach

oraz między 3-5 dniem w oskrzelikach i pęcherzykach płucnych. Antygen wirusowy wykrywano także w niektórych komórkach nabłonkowych jelita cienkiego prosiąt osesków. Wykazano, że infekcja przewodu pokarmowego postępowała od jelita biodrowego w kierunku dwunastnicy i w ciągu 4-5 dni obejmowała wszystkie segmenty jelita cienkiego. Zakażone komórki nabłonkowe identyfikowano jako enterocyty jelitowe przy użyciu metody mikroskopii elektronowej oraz techniki immunocytochemicznej (26). W świetle aktualnie dostępnych informacji na temat patogenezy infekcji PRCV, nie można jednoznacznie ustalić jaką drogą wirus przedostaje się do przewodu pokarmowego. Jedną z możliwości jest przedostawanie się zarazka namnożonego w układzie oddechowym do jamy gębowej, czemu sprzyjają odruchy kaszlu, po czym po przełknięciu wykrztusiny dostaje się on do żołądka i jelita. Nie można również wykluczyć udziału wirerii w transporcie wirusa, co mogłoby tłumaczyć kierunek szerzenia się infekcji w obrębie jelita cienkiego od odcinka końcowego do początkowego. Eksperymentalne zakażenie PRCV w grupie prosiąt starszych wykazało, że replikacja wirusa była ograniczona wyłącznie do układu oddechowego (6).

Lokalizacja zarazka w układzie oddechowym 5-tyg. prosiąt pozyskiwanych drogą histerektomii, inokulowanych metodą aerozolewą była zbliżona do obserwowanej u zwierząt nowo narodzonych, jakkolwiek nie stwierdzano swoistej fluorescencji w migdałkach. W tej grupie wiekowej nie wykazano także obecności wirusa we krwi oraz możliwości jego replikacji w przewodzie pokarmowym.

Patogenezę zakażenia PRCV u świń dorosłych prześledzono na przykładzie konwencjonalnie hodowanych tuczników o masie 80-100 kg, nie wykazujących obecności swoistych przeciwciał surowicznych, zakażonych metodą aerozolewą różnymi terenowymi szczepami wirusa. W tej grupie zwierząt metodą immunofluorescencji stwierdzono lokalizację antygeny wirusowego w nabłonku pęcherzyków płucnych, natomiast nie wykazano obecności wirusa w oskrzelach i oskrzelikach. Początek siewstwa zarazka z wydzieliną z nosa przypadał z reguły na 1-2 dzień po inokulacji, a przeciętne miano wirusa wahało się w granicach $10^{5,5}$ – $10^{6,5}$ TCID₅₀/g wydzieliny. W kolejnych dniach ilość zarazka w wydzielinie nosowej ulegała stopniowemu obniżaniu aż do ilości śladowych około 8 dnia po zakażeniu (6, 26).

Objawy kliniczne i zmiany sekcyjne

Możliwość wywoływania klinicznych objawów choroby w następstwie zakażenia PRCV nie przestaje być tematem dyskusji i polemik. Pierwszej izolacji wirusa w warunkach terenowych dokonano z układu oddechowego od zwierząt nie wykazują-

cych zaburzeń oddechowych (32). Klinicznych objawów chorobowych nie stwierdzano także u świń w tuczarniach w okresie kiedy zakażenie tym zarazkiem szerzyło się falowo w krajach Europy zachodniej, obejmując swym zasięgiem blisko 100% ferm trzody chlewnej. Niektóre doniesienia terenowe łączyły jednak fakt zakażenia wirusem PRCV z wywoływaniem objawów ze strony układu oddechowego u świń (11, 12, 16, 30, 43). Poparciem takiej tezy może być fakt wykrywania u zwierząt chorych przeciwciał dla koronawirusa układu oddechowego, przy braku obecności przeciwciał dla wirusa grypy i choroby Aujeszky'ego. Ujawnienie się klinicznych objawów infekcji układu oddechowego pozostaje w ścisłym związku ze stanem odporności lokalnej w obrębie błon śluzowych tego obszaru. Czynniki natury środowiskowej takie jak mikroklimat, warunki sanitarne pomieszczeń a także obecność zakażeń współistniejących, mogą odgrywać rolę w inicjowaniu lub nasileniu klinicznych objawów chorobowych. Wykazano, że zwierzęta nowo wprowadzane do tuczarni chorowały wśród objawów ze strony układu oddechowego głównie w okresie jesiennym, natomiast objawy były słabo wyrażone w okresie wiosenno-letnim. Infekcji PRCV towarzyszyły w tym przypadku równoczesne zakażenia wirusem grypy (19).

Wydaje się, że różny nasilenie objawów klinicznych ze strony układu oddechowego obserwowane w badaniach eksperymentalnych może pozostawać w związku z wiekiem świń oraz metodą zakażenia. U prosiąt SPF w wieku 1-5 tyg. inokulowanych PRCV metodą aerozolową, donosowo-doustną lub donosową nie stwierdzano klinicznych objawów ze strony układu oddechowego (6, 26). Natomiast inokulacja dotchawicowa zwierząt w różnym wieku powodowała wystąpienie objawów duszności, przyspieszenia oddechów, gorączki, kichania, utraty apetytu i kondycji (45). Objawom tym towarzyszył czasem wypływ z nosa oraz krwawienie z otworów nosowych. Wymienione objawy utrzymywały się do 2 tyg. po zakażeniu.

W badaniu sekcyjnym zwierząt doświadczalnie zakażonych PRCV stwierdzano najczęściej nieżyłowe zapalenie oskrzeli oraz płatowe zapalenie płuc (6, 10, 26, 43, 45). Badanie histopatologiczne tkanki płucnej wykazywało obecność zmian typowych dla śródmiąższowego zapalenia płuc z oznakami degeneracji nabłonka oskrzelików i pęcherzyków płucnych. Światło oskrzelików i pęcherzyków płucnych wypełnione było makrofagami oraz resztkami komórkowymi. Regeneracja tych zmian następowała z reguły po upływie 7 dni od zakażenia i cechowała się hiperplazją nabłonka oskrzelików oraz nacieczeniami okołoskrzelowymi makrofagów, limfocytów i komórek plazmatycznych (26).

Odporność

Specyficzne przeciwciała dla koronawirusa układu oddechowego pojawiają się w surowicy krwi świń w 7 dni po zakażeniu metodą aerozolową i miano ich wzrasta do około 4 tyg. po infekcji. Wartość ochronna tych przeciwciał dla błon śluzowych układu oddechowego nie jest jednak wysoka, o czym świadczą częste reinfekcje świń PRCV obserwowane w warunkach terenowych (24). Szerokie rozprzestrzenienie zakażeń PRCV w fermach trzody chlewnej warunkuje, że większość miotów prosiąt pochodzi od loch które przechodziły lub przechodzą infekcję układu oddechowego i w związku z tym przekazują one przeciwciała poprzez siałę na potomstwo. Okres półtrwania przeciwciał matczynych jest krótki i w przypadku braku ponownych zakażeń wirusem ich miano obniża się stopniowo do około 16 tyg. życia prosiąt (32). Wykazano, że przeciwciała te nie chronią prosiąt przed reinfekcją, ponieważ w warunkach doświadczalnego zakażenia PRCV zwierząt posiadających i nie posiadających specyficznych przeciwciał, nie obserwowano różnic dotyczących miana wirusa w tkance płucnej oraz miejsc jego replikacji (45). W warunkach terenowych serokonwersję u prosiąt, związaną ze zmianą charakteru odporności z biernej na czynną, obserwuje się najczęściej pomiędzy 5 a 10 tyg. życia zwierząt i ma ona związek z zakażeniami młodych prosiąt w okresie zaniku przeciwciał siałowych (30, 35, 36).

Aktualna sytuacja epizootyczna w zakresie występowania zakażeń PRCV w Europie łączy się z wyraźnym zmniejszeniem się występowania ostrej formy infekcji wirusem zapalenia żołądka i jelit świń (TGEV) (33). W Belgii, gdzie po raz pierwszy wyizolowano PRCV, w okresie poprzedzającym pojawienie się tego wirusa notowano rocznie około 60-70 przypadków TGE, natomiast w latach 1988-1994 stwierdzono tylko 7 przypadków ostrej formy tej choroby (cyt. 24). Fakt ten skłonił do postawienia pytania, czy i w jakim stopniu oba wirusy indukują krzyżową odporność protekcyjną w warunkach *in vivo*. Wiadomo, że ochrona prosiąt ssących przed infekcją jelitową wirusem TGEV opiera się głównie na wytworzeniu specyficznych przeciwciał klasy IgA w gruczole mlekowym uodpornionych ciężarnych macior, a następnie przekazaniu ich z siałą nowo narodzonym prosiętom (odporność laktogenna) (3, 35, 42). Wykazano, że lochy naturalnie zakażone PRCV istotnie produkują w gruczole mlekowym przeciwciała neutralizujące TGEV, ale większość tych przeciwciał należy do klasy IgG (35). Natomiast u loch reinfekowanych PRCV w okresie okołoporodowym stwierdzano indukcję lub wydatny wzrost miana przeciwciał laktogennych klasy IgA dla wirusa TGEV. Przeciwciała te wytwarzane były przez okres kilkunastu tygodni, po czym miano ich spadało do zera. Fakt ten sugeruje, że tylko regularne

fale zakażeń wirusem PRCV w fermach trzody chlewnej są w stanie stymulować i utrzymywać produkcję przeciwciał klasy IgA w gruczole mlekowym macior.

Oddzielną i dyskusyjną kwestią pozostaje wartość ochronna tych przeciwciał dla prosiąt osesków (2, 7, 29, 38, 44, 52). Doświadczalnie zakażane TGEV prosięta, pochodzące od loch posiadających przeciwciała dla PRCV i reinfekowanych tym wirusem, wykazywały kliniczne objawy biegunki, ale okres inkubacji choroby ulegał wydłużeniu do 1-2 dni a wskaźnik śmiertelności był istotnie obniżony i wynosił 12-44% (2). Generalnie indukowana PRCV odporność laktogenna chroni więc prosięta przed zakażeniem TGEV jakkolwiek w mniejszym stopniu niż przeciwciała indukowane wirusem TGEV (44). Stwierdzono, że w stadach świń uodpornionych w wyniku naturalnych zakażeń PRCV, wybuchy wirusowego zapalenia żołądka i jelit zdarzają się sporadycznie, mają łagodniejszy przebieg i krótszy czas trwania. Fakt ten można wytłumaczyć powstawaniem reakcji anamnesticznej u uczulonych wcześniej zwierząt, w wyniku której dochodzi do szybkiego wzrostu miana przeciwciał klasy IgA w gruczole mlekowym, zapewniających silną odporność laktogenną nowo narodzonym prosiętom (35). Aktualne dane piśmiennictwa nie wyjaśniają pochodzenia specyficznych przeciwciał klasy IgA dla TGEV, wykrywanych w mleku macior po zakażeniu układu oddechowego wirusem PRCV. Nie istnieją bowiem przekonujące dowody na obecność osi immunologicznej pomiędzy układem oddechowym a gruczołem mlekowym, w przeciwieństwie do znanego takiego połączenia pomiędzy przewodem pokarmowym a wymieniem (20, 30, 42). Zagadnienie to omawiał ostatnio Larski (21). Nie są znane także mechanizmy, dzięki którym wirus PRCV stymuluje system immunologiczny tak w aspekcie ogólnym jak i lokalnym do obrony przed zakażeniem TGEV. Oba wirusy stanowią natomiast doskonały model do badania tzw. wspólnego systemu immunologicznego błon śluzowych (common mucosal immune system).

Rozpoznawanie

Z uwagi na subkliniczny lub bezobjawowy przebieg infekcji PRCV u świń, rozpoznawanie tych zakażeń na podstawie objawów klinicznych nie jest możliwe. Diagnostyka laboratoryjna opiera się natomiast na izolacji i identyfikacji wirusa w hodowli komórkowej, wykazaniu obecności antygenów wirusowych w tkance płucnej lub na stwierdzeniu obecności swoistych przeciwciał w surowicy krwi (30, 33, 36). Do izolacji zarazka z tkanki płucnej lub z wymazów z błony śluzowej nosa przydatne są różne linie komórkowe. Po raz pierwszy wirusa wyizolowano w pierwotnej hodowli komórek nerki świni (32). Zarazek łatwo namnaża się także w liniach

ciągłych nerki świni (PK-15), jąder świni (ST) oraz płodów kocich (FCWF). Aktualnie do izolacji PRCV z materiału klinicznego najczęściej używana jest hodowla komórek jąder świni (ST) z uwagi na ich wysoką wrażliwość na zakażenie wirusem (25). Powodujący się po kilku dniach po inokulacji efekt cytopatyczny cechuje się tworzeniem syncytiów komórkowych, zaokrągleniem się komórek oraz odrywaniem od powierzchni wzrostowej. Identyfikacja namnożonego wirusa może być dokonana metodą immunofluorescencji. Wykorzystanie w tym odczynie specyficznych przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko glikoproteinie S umożliwia zróżnicowanie pomiędzy PRCV i TGEV. Ostatnio do detekcji i różnicowania obu wirusów blisko spokrewnionych antygenowo wykorzystuje się coraz częściej metody biologii molekularnej, w tym technikę hybrydyzacji molekularnej z użyciem specyficznych sond diagnostycznych (1, 48) oraz łańcuchową reakcją polimerazową (PCR) (13, 30, 46). Potwierdzenia obecności antygenów wirusowych w skrawkach tkanki płucnej można dokonać przy użyciu odczynu immunofluorescencji lub immunoperoksydazowego (PLA) (26). Należy się jednak liczyć z możliwością wystąpienia wyników fałszywie dodatnich z uwagi na potwierdzony tropizm niektórych szczepów wirusa TGEV do układu oddechowego i możliwość namnażania się w płucach (22). Z tych samych względów ograniczona jest także specyficzność mikroskopii elektronowej, jakkolwiek cząstki o typowej dla koronawirusów morfologii można stwierdzić w komórkach oskrzelików, w makrofagach płucnych oraz wewnątrz pęcherzyków płucnych w materiale pochodzącym od świń z ognisk zapowietrzonych (26).

Diagnostyka serologiczna może być wykonana w oparciu o klasyczny test seroneutralizacji przy wykorzystaniu TGEV jako antygeny. Metoda ta nie nadaje się jednak do różnicowania przeciwciał indukowanych przez wirus PRCV i TGEV z uwagi na krzyżowe reakcje serologiczne (5). Obecność przeciwciał neutralizujących wirus TGEV można uznać za indukowane przez PRCV w przypadku nie występowania biegunek w stadzie świń oraz braku dowodów na enzootyczne występowanie zakażeń TGEV. Powszechne występowanie zakażeń PRCV w fermach trzody chlewnej spowodowało trudności jeśli chodzi o eksport świń do krajów wolnych od TGEV. Fakt ten stworzył konieczność opracowania testu serologicznego jednoznacznie różnicującego infekcję tymi koronawirusami. Pod koniec lat 80-tych opracowano test blocking ELISA opierający się na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych nie neutralizujących, skierowanych przeciwko epitopom w obrębie glikoproteiny S TGEV które nie występują u wirusa PRCV (40). Metoda ta pozwala na wykrycie specyficznych przeciwciał dla TGEV bez możliwości interferencji ze strony

przeciwciał dla PRCV. Stwierdzono, że czułość takiego testu jest porównywalna z odczynem seroneutralizacji. W praktyce surowice świń powinny się badać wstępnie metodą seroneutralizacji, natomiast próbki pozytywne testem różnicującym – blocking ELISA. Kombinacja negatywnego wyniku w teście ELISA oraz pozytywnego wyniku w seroneutralizacji świadczy, że stwierdzone przeciwciała surowicze były indukowane przez wirus PRCV (24).

Zakażenia wirusem PRCV utrwały specyficzny status immunologiczny w populacji trzody chlewnej, dzięki któremu infekcje enteropatogennym TGEV mają łagodny przebieg i są krótkotrwałe. Z drugiej strony nie można wykluczyć udziału tego wirusa w etiologii zaburzeń układu oddechowego świń. Szerokie rozprzestrzenienie PRCV w stadach świń może być przyczyną częstego udziału tego wirusa w infekcjach mieszanych wywoływanych przez wirus grypy, PRRS, Aujeszky a także niektóre bakterie i mikoplazmy wykazujące tropizm do układu oddechowego (19, 30). Takie mieszane zakażenia z reguły mają cięższy przebieg kliniczny niż wywołane przez pojedyncze zarazki. Rzeczywiste znaczenie PRCV jako patogena pneumotropowego nadal nie jest dokładnie zbadane tak w warunkach eksperymentalnych jak i terenowych. Nie ulega jednak wątpliwości, że w przeciwieństwie do innych wirusów które pojawiły się ostatnio w populacji świń, PRCV spowodował więcej zjawisk pozytywnych niż negatywnych.

Piśmiennictwo

- Bae I., Jackwood D. J., Benfield D. A., Saif L. J., Wesley R. D., Hill H.: J. clin. Microbiol. 29, 215, 1991.
- Bernard S., Boittreau E., Aynaud J. M., Have P., Szymansky L.: Vet. Microbiol. 21, 1, 1989.
- Brim T. A., Van Cott J. L., Lunney J. K., Saif L. J.: Vet. Immunol. Immunopathol. 48, 35, 1995.
- Britton P., Mawditt M. L., Page K. W.: Virus Res. 21, 181, 1991.
- Callebaut P., Correa I., Pensaert M., Jimenez G., Enjuanes L.: J. gen. Virol. 69, 1725, 1988.
- Cox E., Hooyberghs J., Pensaert M. B.: Res. vet. Sci. 48, 165, 1990.
- Cox E., Pensaert M. B., Callebaut P.: Vaccine 11, 267, 1993.
- Delmas B., Gelfi J., L'Haridon R., Vogel L. H., Sjostrom H., Noren O., Laude H.: Nature, Lond. 357, 417, 1992.
- Delmas B., Rasschaert D., Godet M., Gelfi J., Laude H.: J. gen. Virol. 71, 1313, 1990.
- Duret C., Brun A., Guilmoto H., Dauvergne M.: Recl. Med. vet. 164, 221, 1988.
- Elazhary Y., Jabrane A., Talbot B. G.: Vet. Rec. 130, 500, 1992.
- Flori J., Mousing J., Gardner I., Willeberg P., Have P.: Prevent. vet. Med. 25, 51, 1995.
- Grądzki Z., Winiarczyk S., Britton P.: Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 1996 s. 121.
- Grądzki Z., Winiarczyk S., Pejsak Z.: Mat. X Kongresu PTNW Wrocław 1996 s. 296.
- Grądzki Z., Winiarczyk S.: Medycyna Wet. w druku.
- Halbur P. G., Paul P. S., Vaughn E. M., Andrews J. J.: J. Vet. Diagn. Invest. 5, 184, 1993.
- Hill H. T., Biwer J. D., Woods R. D., Wesley R. D.: Proc. Am. Ass. swine Pract. 333, 1989.
- Lai M. M. C.: A. Rev. Microbiol. 44, 303, 1990.
- Lanza I., Brown I. H., Paton D. J.: Res. vet. Sci. 53, 309, 1992.
- Lanza I., Shoup D. I., Saif L. J.: Am. J. vet. Res. 56, 739, 1995.
- Larski Z.: Medycyna Wet. 52, 543, 1996.

- Laude H., Charley B., Gelfi J.: J. gen. Virol. 65, 327, 1984.
- Laude H., Rasschaert D., Delmas B., Godet M., Gelfi J., Charley B.: Vet. Microbiol. 23, 147, 1990.
- Laude H., Van Reeth K., Pensaert M.: Vet. Res. 24, 125, 1993.
- McClurkin A. W., Norman J. O.: Can. J. comp. Med. 30, 190, 1966.
- O'Toole D., Brown I., Bridges A., Cartwright S. F.: Res. vet. Sci. 47, 23, 1989.
- Page K. W., Britton P., Boursnel M. G.: Virus Genes 4, 289, 1990.
- Page K. W., Mawditt M. L., Britton P.: J. gen. Virol. 72, 579, 1991.
- Paton D. J., Brown I. H.: Vet. Res. Commun.: 14, 329, 1990.
- Paul P. S., Halbur P. G., Vaughn E. M.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet. 16, 1223, 1994.
- Pensaert M., Cox E., Van Deun K., Callebaut P.: Vet. Quarterly 15, 16, 1993.
- Pensaert M. B., Callebaut P., Vergote J.: Vet. Quarterly 8, 257, 1986.
- Pensaert M. B., Cox E.: Agri-practice 10, 17, 1989.
- Rasschaert D., Duarte M., Laude H.: J. gen. Virol. 71, 2599, 1990.
- Saif L. J., Van Cott J. L., Brim T. A.: Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 89, 1994.
- Saif L. J., Wesley R. D.: Transmissible Gastroenteritis. w: Diseases of Swine, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa 1992, s. 362.
- Sanchez C. M., Gebauer F., Sune C., Mendez A., Dopazo J., Enjuanes L.: Virology 190, 92, 1992.
- Sestak K., Lanza I., Park S. K., Peggy A., Weilnau B. S., Saif L. J.: Am. J. vet. Res. 57, 664, 1996.
- Simkins R. A., Weilnau P. A., Bias J., Saif L. J.: Am. J. vet. Res. 53, 1253, 1992.
- Simkins R. A., Weilnau P. A., Van Cott J.: Am. J. vet. Res. 54, 254, 1993.
- Spaan W. M., Cavanagh D., Horzinek M. C.: J. gen. Virol. 69, 2939, 1988.
- Van Cott J. L., Brim T. A., Lunney J. K., Saif L. J.: J. Immunol. 152, 3980, 1994.
- Van Nieuwstadt A. P., Pol J. M.: Vet. Rec. 124, 43, 1989.
- Van Nieuwstadt A. P., Zetstra T., Boonstra J.: Vet. Rec. 125, 58, 1989.
- Vannier P.: J. vet. Med. 37, 177, 1990.
- Vaughn E. M., Halbur P. G., Paul P. S.: J. clin. Microbiol. 32, 1809, 1994.
- Vaughn E. M., Halbur P. G., Paul P. S.: J. Virol. 69, 3176, 1995.
- Wesley R. D., Wesley I. V., Woods R. D.: J. Vet. Diagn. Invest. 3, 29, 1991.
- Wesley R. D., Woods R. D., Cheung A. K.: J. Virol. 64, 4761, 1990.
- Wesley R. D., Woods R. D., Cheung A. K.: J. Virol. 65, 3369, 1991.
- Wesley R. D., Woods R. D., Hill H. T., Biwer J. D.: J. Vet. Diagn. Invest. 2, 312, 1990.
- Wesley R. D., Woods R. D.: Vet. Microbiol. 38, 31, 1993.

Adres autora: dr Zbigniew Grądzki, ul. Tatarakowa 2/52, 20-541 Lublin

GREIG A., STEVENSON K., PEREZ V., PIRIE A. A., GRANT J. M., SHARP J. M.: Gruźlica rzekoma u dzikich królików (*Oryctolagus cuniculus*). (Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet. Rec. 140, 141-143, 1997 (6)

Gruźlica rzekoma wywołana przez *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* występuje nie tylko u przeżuwaczy, ale też u wielu gatunków małych zwierząt laboratoryjnych. Badania przeprowadzono u 43 dzikich królików odłowionych w okresie luty-lipiec w 1994 r. na 4 fermach. U schwytanych sztuk występowały w węzłach chłonnych i w jelitach zmiany chorobowe typowe dla obserwowanych w gruźlicy rzekomej bydła. Prątki wyosobniono z tkanek 27 (82%) na 33 badane zwierzęta, przy czym analiza PCR umożliwiła zidentyfikowanie zakażenia wywołanego przez *M. avium subsp. paratuberculosis* u 67% badanych zwierząt. Zarazek wyosobniono też z kału jednego zwierzęcia. Z tkanek 4 sztuk oprócz *M. avium subsp. paratuberculosis* wyizolowano *M. smegmatis* i *M. phlei*. Dzikie króliki mogą być źródłem zakażenia oraz rezerwuarem *M. avium subsp. paratuberculosis* dla innych gatunków zwierząt.