

medycyna weterynaryjna

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

Czasopismo poświęcone nauce i praktyce weterynaryjnej oraz biologii stosowanej, założone w 1945 r. przez Wydział Weterynaryjny UMCS w Lublinie.

Wydawane z dotacją Komitetu Badań Naukowych

Referowane w: Biological Abstracts, Biosis Previews, Focus On: Veterinary Science and Medicine, Food Science and Technol. Abstr., Veterinary Bulletin, Index Veterinarius

REDAKCJA: prof. dr hab. Edmund K. PROST – redaktor naczelny, prof. dr hab. Elżbieta PEŁCZYŃSKA – z-ca redaktora naczelnego, dr hab. Krzysztof SZKUCIK – sekretarz administracyjny, mgr inż. Elżbieta STACHYRA – sekretarz redakcji

RADA REDAKCYJNA: prof. dr hab. Ryszard Badura, prof. dr hab. Zdzisław Larski, prof. dr hab. Marian Tischner, prof. dr hab. Stanisław Wołoszyn

RADA PROGRAMOWA: prof. dr hab. Wiesław Barej, prof. dr hab. Zygmunt Cygan, prof. dr hab. Zdzisław Gliński, prof. dr hab. Marian Grundboeck, prof. dr hab. Tomasz Janowski, prof. dr hab. Teodor Juszkiewicz, prof. dr hab. Jerzy Kita, prof. dr hab. Włodzimierz Kluciński, prof. dr hab. Władysław Lutyński, dr hab. Henryk Maciołek, prof. dr hab. Michał Mazurkiewicz, prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, prof. dr hab. Zbigniew Samborski, prof. dr hab. Tadeusz Studziński, prof. dr hab. Eustachy Szeligowski, prof. dr hab. Krzysztof Świeżyński, prof. dr hab. Jan Tropiło, prof. dr hab. Marian Truszczyński, prof. dr hab. Janusz Wawrzkiwicz, prof. dr hab. Jan Żmudzki.

STANISŁAW WINIARCZYK, ZBIGNIEW GRĄDZKI

artykuł przeglądowy

Podstawy molekularne diagnostyki i epidemiologii zakażeń rotawirusowych u prosiąt

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

Choroby przewodu pokarmowego z objawami biegunki są jednym z istotnych problemów rzutujących na wyniki ekonomiczne w intensywnej hodowli trzody chlewnej. Jednym z ważniejszych elementów składających się na złożoną etiologię choroby biegunkowej są czynniki zakaźne. Najczęściej wykrywanymi patogenami w próbkach kału lub treści przewodu pokarmowego od prosiąt z tymi objawami są: TGEV (transmissible gastroenteritis virus), rotawirusy, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* i *Isospora suis* (46). Mogą one wywoływać zakażenia pojedyncze lub mieszane i wówczas intensywność zmian chorobowych ulega wyraźnemu nasileniu. Duże znaczenie w takich przypadkach przypisuje się infekcjom z udziałem rotawirusów i *E. coli*. Najcięższy przebieg zakażenia pojawia się wtedy, gdy wirus i bakterie atakują makroorganizm jednocześnie lub jeden po drugim. Pojedyncze infekcje tymi samymi zarazkami przebiegają znacznie łagodniej (8).

Rotawirusy z grupy A, należące do rodziny *Reoviridae*, występują ubikwitarne na wszystkich kontynentach. Zakażenia rotawirusami występują w większości stad trzody chlewnej w formie enzootii. Obecność swoistych przeciwciał anty-rotawirusowych można wykazać u 90%-100% dorosłych osobników (22, 50). W przeciągu kilku pierwszych tygodni życia większość prosiąt ulega infekcji rotawirusami i wydalają je z kałem. Maciory w okresie okołoporodowym mogą również być siewcami wirusa. Wydalane do środowiska zewnętrznego rotawirusy, dzięki swej dużej oporności, przeżywają długo na cząstkach kurzu i materii organicznej zachowując swą zjadliwość. Zakażenie alimentarne jest ogniwem zamykającym permanentnie trwający łańcuch epizootyczny (13). Zdolność rotawirusów do samodzielnego wywołania u prosiąt ostrego zapalenia żołądka i jelit została wykazana eksperymentalnie na zwierzętach bezsarowych i gnotobiotycznych (44). Kliniczny obraz i przebieg infekcji rotawirusowej determinowany jest wiekiem zakażonych prosiąt, poziomem

ich odporności czynnej i biernej, dawką i zjadliwością rotawirusa, współistniejącymi zakażeniami innymi patogenami, żywieniem i warunkami środowiska zewnętrznego (8). Wprawdzie większość naturalnych, pojedynczych infekcji rotawirusowych przebiega subklinicznie lub towarzyszy im lekka biegunka, to jednak ze względu na wysoką częstotliwość występowania tych zakażeń i zahamowanie przyrostów masy ciała prosiąt w trakcie trwania choroby i rekonwalescencji, jak również zaostrzenie przebiegu infekcji mieszanych, są one uznawane za jedną z głównych przyczyn strat ponoszonych w hodowli trzody chlewnej (55).

Pierwsze prace donoszące o wykryciu obecności rotawirusów w kale biegunkowym prosiąt ssących i nowo odsadzonych pojawiły się w połowie lat siedemdziesiątych (36, 54). Do tego czasu rotawirusy zostały opisane już u cieląt, myszy, małąp i niemowląt (15, 31). Wszystkie szczepy zbadanych wówczas rotawirusów posiadały taką samą, charakterystyczną dla tej grupy wirusów morfologię i cechowały się posiadaniem wspólnego antygeny grupowego. Ponieważ w tym czasie nie potrafiono jeszcze izolować tych wirusów w hodowli komórkowej, wymienione cechy określały metody ich wykrywania w badanym materiale patologicznym – mikroskopia elektronowa i odczyny serologiczne. Uwidocznienie rotawirusów w mikroskopie elektronowym, powszechnie używane w diagnostyce rotawirusowego *gastroenteritis* u dzieci i cieląt, zawodziło jednak niekiedy u prosiąt. Dlatego też w niektórych przypadkach, w celu wykazania patogenego wirusa w badanym materiale, zakażano nim prosięta (54). Był to najczulszy sposób, za pomocą którego można było wykryć od 10^2 do 10^3 cząstek wirusa (55). Antygeny wirusowe wykazywano głównie za pomocą immunofluorescencji, immunoelektronoskopii, odczynu wiązania dopełniacza, immunodiffuzji i metodą ELISA. Swoiste surowice antyrotawirusowe stosowane w tych testach pochodziły od rekonwalescentów ludzkich i zwierzęcych (15) oraz od zwierząt sztucznie zakażanych bezbakteryjnym filtratem kału, zawierającym cząstki rotawirusowe (6, 54). Jako antygenów w monitorowaniu odpowiedzi humoralnej używano sklarowanych i zagęszczonych wirowaniem rotawirusów z zawiesiny kału lub mrożonych skrawków jelitowych pochodzących od osobników zakażonych. W oparciu o wymieniony system rozpoznawania zakażeń rotawirusowych nie można było wykazać istotnych różnic antygenowych pomiędzy szczepami pochodzącymi od ludzi i zwierząt. Krzyżowe reakcje serologiczne ułatwiły zastosowanie antygenów i surowic pochodzenia zwierzęcego w wykrywaniu zakażeń u ludzi i *vice versa*. Były one również podstawą pochopnego przeświadczenia o łatwej drodze do opracowania skutecznej immunoprofilaktyki tych zakażeń. Sprawa skomplikowała się w chwili kiedy

okazało się, że surowice reagujące krzyżowo z większością testowanych izolatów rotawirusowych we wspomnianych testach zobojętniają właściwości zakaźne tylko szczepu homologicznego lub ewentualnie kilku szczepów heterologicznych, dość często pochodzących od tego samego gatunku gospodarza (15).

Po kilku latach od ukazania się pierwszych prac na temat rotawirusów u świń pojawiły się doniesienia o tzw. pararotawirusach. Były one podobne do rotawirusów pod względem wielkości, morfologii oraz tropizmu do enterocytów, lecz nie reagowały w testach serologicznych (ELISA, IF) z przeciwciałami przeciw wspólnemu antygenowi grupowemu a elektroforetyczny wzór rozdziału 11 segmentów genomowego dsRNA w żelu poliakrylamidowym układał się odmiennie (4, 7, 9). Typowe rotawirusy, występujące powszechnie u ludzi i zwierząt, posiadające wspólny antygen grupowy oraz wzór elektroforetyczny ułożenia segmentów genomu w żelu poliakrylamidowym, odpowiadający schematowi 4:2:3:2, umieszczono w grupie A. Pozostałe, atypowe, odrębne serologicznie szczepy zaliczono do dalszych grup, oznaczonych od B do G (31).

Już na samym początku, po potwierdzeniu występowania rotawirusów u prosiąt, postawiono kluczowe pytanie o związek etiologiczny pomiędzy ich obecnością w kale a chorobą biegunkową. Obecność rotawirusów była bardzo często stwierdzana w próbkach kału pochodzącego od prosiąt chorujących z objawami biegunki ale również i od takich, które nie wykazywały żadnych odchyśleń od normy klinicznej. Wskazuje to na fakt, że stwierdzenie rotawirusów w badanych próbkach kału nie jest wystarczającym dowodem na potwierdzenie ich roli jako pierwotnego czynnika przyczynowego choroby biegunkowej. Tak więc sugestia Woode'a wysunięta w 1976 r. (54) co do konieczności opracowania testu określającego wirulencję poszczególnych szczepów rotawirusów pozostaje nadal aktualna w kontekście poznania i możliwości identyfikowania takiej cechy tych wirusów, która korelowałaby z klinicznymi objawami infekcji. Zagadnienie znaczenia etiologicznego rotawirusów w biegunkach u prosiąt wydaje się być podobne do tego samego problemu, jaki istniał w przypadku kolibakteriozy, w czasie kiedy nie posiadano wiedzy dotyczącej występowania różnych szczepów *E. coli* (enterotoksyczne, enteroinwazyjne, enteropatogenne) o zróżnicowanej chorobotwórczości.

Charakterystyka właściwości biologicznych i struktury rotawirusów była hamowana przez dłuższy czas brakiem umiejętności izolacji tych wirusów w hodowlach komórkowych. Rotawirusy namnażały się w nich nie dłużej niż przez 2-3 pasażę a następnie traciły swą zakaźność (54). Pierwsze prosięce szczepy rotawirusów zostały zaadaptowane do pierwotnej hodowli komórek nerki prosięcej po raz pierwszy

przez Theil i wsp. (49). Oni to skutecznie zastosowali nadtrawianie inokulum wirusowego pankreatyną lub trypsyną. Niemniej jednak ze względu na mierny efekt cytopatyczny (zmiany w hodowli komórek wywołane replikacją wirusa), infekcyjność wirusa dla komórek PK wykazywana była metodą immunofluorescencji. Dopiero Fukusho i wsp. (17) uzyskali wysokie miana wirusa i wyraźny efekt cytopatyczny po zastosowaniu ciągłej linii komórek MA-104 w hodowli zawieszinowej w kombinacji z nadtrawianiem inokulum wirusowego trypsyną i jej dodatkiem do podłoża utrzymującego. Szersze badania nad wybranymi właściwościami biologicznymi i immunologicznymi rotawirusów prosięcych zaadaptowanych do hodowli przeprowadzili Bohl i wsp. (5). Wyniki otrzymane w teście neutralizacji z antysurowicami od prosiąt ozdrowieńców zakażonych uprzednio rotawirusami, pozwoliły na podzielenie badanych szczepów na dwie odrębne grupy antygenowe, określone jako serotyp 1 i 2. Do serotypu 1 zaliczono trzy rotawirusy, dla których wzorcem był szczep OSU, natomiast serotyp 2 skupiał rotawirusy, których wzorcem był szczep Gottfried. Badania na prosiętach gnotobiotycznych wykazały brak krzyżowego efektu ochronnego pomiędzy serotypami 1 i 2. Prosięta nie wykazywały objawów biegunki i nie wydalaly wirusa z kałem tylko wówczas, gdy do szczepienia ochronnego i późniejszego ich zakażenia używano tego samego szczepu rotawirusa.

Badania Greenberg i wsp. (20) wykazały, że determinanty antygenowe rotawirusów grupy A reagujące krzyżowo z przeciwciałami grupowo-swoistymi zlokalizowane są na białku VP6. W oparciu o analizę reakcji swoistych przeciwciał monoklonalnych z wymienionym białkiem, wyznaczono na nim dwa obszary. Na jednym z nich umiejscowione były epitopy reagujące krzyżowo w obrębie grupy A. Natomiast właściwości antygenowe determinant zlokalizowanych w drugim obszarze umożliwiły wyznaczenie wśród rotawirusów grupy A podgrupy 1 i 2. W podgrupie 1 obok większości testowanych rotawirusów zwierzęcych znalazły się prosięce szczepy OSU i EE, podczas gdy szczep Gottfried zaliczony został do podgrupy 2 zdominowanej przez większość znanych szczepów ludzkich. Białko to tworzące wewnętrzną warstwę płaszcza kapsydu, jest głównym białkiem strukturalnym stanowiącym 51% wszystkich białek wirionu rotawirusa. Jest wysoce immunogenne i antygenowe a reaktywność immunologiczna determinant grupowych zlokalizowanych na jego powierzchni stanowi podstawę działania większości testów diagnostycznych, służących do wykrywania antygenów wirusowych w badanym materiale (14, 31).

Dalsze badania wykazały obecność epitopów neutralizujących na białkach VP4 i VP7, tworzących zewnętrzny płaszczyk kapsydu cząsteczki rotawirusa. Grupa przeciwciał swoista dla białka VP4 neutra-

lizowała użyty w badaniach małpi szczep w mianach umiarkowanie wysokich. Druga grupa przeciwciał, skierowana przeciwko VP7 neutralizowała właściwości zakaźne tego wirusa w wysokich mianach (21).

Glikoproteid VP7 jest główny antygenem rotawirusów zubojetnianym przez przeciwciała a jego reaktywność z surowicami odpornościowymi stanowi podstawę serotypowania w obrębie grupy A. Swoistość serologiczna szczepów rotawirusów, wynikająca z polimorfizmu antygenowego VP7 pozwala wyodrębnić obecnie 14 typów serologicznych „G”, od G1 do G14 (43). Większość przeciwciał neutralizujących, które wzbudza w organizmie zakażonym lub immunizowanym cały wirion rotawirusa reaguje z determinantami na VP7, co spowodowane jest jego wysoką immunogennością i masą; tworzy 30% wszystkich białek wirusa i jest głównym składnikiem zewnętrznego płaszcza kapsydu (14, 31). Znaczącym wydarzeniem w dziedzinie badań nad różnicami i podobieństwami antygenowymi rotawirusów zwierzęcych i ludzkich było opracowanie przez Hoshino i wsp. (25) pierwszego, spójnego systemu klasyfikacji serologicznej opartego na aktywności wirusowych antygenów neutralizujących. Zostało określonych 7 serotypów „G”. Prosięce szczepy Gottfried, SB-1A, SB-2 zakwalifikowane wcześniej do 2 serotypu prosięcego znalazły się w tym zunifikowanym systemie w serotypie G4 obok szczepów ludzkich. Prosięcy szczep OSU, zaliczony wcześniej do serotypu 1 prosięcego utworzył razem ze szczepem końskim H-1 serotyp G5. Prosięce szczepy Gottfried i SB-1A należące do serotypu G4 były spokrewnione antygenowo ze szczepem CU-1 izolowanym od psa, co wykazano na podstawie jednokierunkowej reakcji neutralizacji. Wysokowartościowa surowica anti-CU-1 wydatnie neutralizowała szczepy prosięce, podczas gdy wysokowartościowa surowica anti-Gottfried neutralizowała CU-1 w mianach istotnie mniejszych, tzn. 20-krotnie mniejszych od homologicznej antysurowicy dla CU-1. Prosięce szczepy Gottfried i SB-2, należące do tego samego serotypu G4, różniły się antygenami podgrupowymi; SB-2 miał antygen podgrupy 1 a Gottfried podgrupy 2. Szczep SB-1A, który serologicznie wykazywał wszystkie cechy rotawirusów serotypu G4, reagował we wzajemnych krzyżowych reakcjach zubojetnienia ze szczepami OSU i H-1 należącymi do serotypu G5; SB-1A był neutralizowany w wysokich mianach przez wysokowartościowe surowice antyserotyp G4 (Gottfried) i antyserotyp G5 (OSU, H-1) i *vice versa*, wysokowartościowa surowica anti-SB-1A neutralizowała również w wysokich mianach wirusy obydwu serotypów G4 i G5. Był to pierwszy przypadek stwierdzenia występowania szczepu skupiającego w sobie cechy antygenowe dwóch różnych serotypów.

Podobne badania przeprowadzono w Australii, gdzie porównano zwierzęce i ludzkie szczepy rotawirusów z ich odpowiednikami amerykańskimi i europejskimi. Wykazano daleko idące podobieństwa pomiędzy badanymi rotawirusami. Jedyne w tych badaniach prosięcy szczep AT/76, został określony jako pokrewny OSU na podstawie neutralizacji z antysurowicą OSU i Gottfried. W oparciu o jednokierunkową neutralizację wykazano również jego częściowe pokrewieństwo z ludzkim szczepem RV-3 serotypu G3. Jeszcze raz okazało się, że złożone, wzajemne oddziaływania pomiędzy rotawirusami uniemożliwiły zakwalifikowanie niektórych z nich do określonego serotypu w sposób jednoznaczny (1, 16). Jednokierunkowe reakcje zobojętnienia zachodzące pomiędzy dwoma porównywanymi szczepami tłumaczono istnieniem naturalnych reasortantów, tj. takich wirusów, które powstają podczas infekcji jednej komórki dwoma różnymi rotawirusami i na skutek niezależnej segregacji dwóch genów kodujących antygeny neutralizujące, posiadają białko VP4 z jednego serotypu a VP7 z drugiego oraz występowaniem podobnych lub identycznych epitopów antygenowych na białku VP4 (24). Huang i wsp. (26) dokonali analizy sekwencyjnej genu kodującego białko VP7 pięciu prosięcych rotawirusów i porównali je z rotawirusami ludzkimi, małpimi oraz prosięciami pochodzącymi z różnych kontynentów. Dane dotyczące pierwszorzędowej struktury genetycznej VP7 korelowały z wynikami badań serologicznych. Z rezultatów ich badań (39) wynika, iż w niektórych przypadkach przyczyną jednokierunkowych reakcji zobojętnienia w klasycznym odczynie neutralizacji czy braku reaktywności niektórych przeciwciał monoklonalnych, mogły być boczne łańcuchy wielocukrowe blokujące wiązanie się przeciwciał z VP7. Wykazano, że szczepy izolowane od ludzi nie reagujące z surowicami prosięciami posiadały w pozycji 238 aminokwasu miejsce glikozylacji (miejsce dla bocznego łańcucha cukrowego), którego nie stwierdzono u rotawirusów prosięcych.

Analiza mutantów uzyskanych pod presją selekcyjną przeciwciał monoklonalnych oraz porównanie sekwencji nukleotydów i wydedukowanych na ich podstawie sekwencji aminokwasów wielu szczepów rotawirusów reprezentujących różne serotypy pozwoliło na identyfikację trzech regionów na białku VP7 (A, B, C), które pośredniczą w procesie zobojętnienia (14, 23). Przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko VP7 można zakwalifikować do trzech grup funkcjonalnych: monotypowo-swoiste, serotypowo-swoiste i krzyżowo-reagujące. W panelu neutralizujących przeciwciał monoklonalnych uzyskanych dla VP7 szczepu Gottfried można było wyodrębnić grupę krzyżowo-reagującą z serotypami G3, G4, G6, G9, G10. Ponadto wykazano, że gen VP7 szczepu Gottfried tworzy unikatową

mozaikę antygenową serotypów G3 i G4 (23). Wydaje się więc, że część krzyżowych reakcji zobojętnienia pomiędzy różnymi serotypami rotawirusowymi należy przypisać występowaniu na nich podobnych struktur czynnych antygenowo. Poznanie struktury i rozmieszczenia miejsc antygenowych na VP7 i VP4 wzbudzających heterotypową odporność krzyżową jest atrakcyjnym wątkiem badań zmierzających do opracowania szczepionki (10, 29, 35, 48). Oprócz pierwszorzędowej struktury, wpływ na aktywność immunologiczną białek antygenowych rotawirusów ma ich budowa przestrzenna. Duże znaczenie w utrzymywaniu przestrzennego ukształtowania epitopów immunogennych przypisuje się mostkom dwusiarczkowym. Nie można bowiem wytworzyć surowicy odpornościowej o właściwościach neutralizujących na zwierzętach uodpornianych antygenem VP7, który otrzymano na drodze elucji z żelu poliakrylamidowego po elektroforezie w warunkach denaturujących. Podobnie, liniowe, syntetyczne peptydy z różnych regionów VP7 nie posiadają właściwości indukcji przeciwciał o charakterze neutralizującym (14). Antygenowość VP7 warunkowana jest ponadto jego interakcją przestrzenną z innymi białkami i strukturami kapsydowymi (37). Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko VP7 mogą np. hamować aktywność hemaglutynacyjną wirusa, która zależy od właściwości VP4, prawdopodobnie poprzez oddziaływania steryczne (21).

Białko VP4, produkt ekspresji genu 4, jest nieglikozylowaną proteiną o kilku ważnych funkcjach biologicznych. Jej rozpad na dwa mniejsze fragmenty VP5 i VP8 pod wpływem trawienia trypsyną zwiększa infekcyjność rotawirusów oraz ich penetrację do zakażonej komórki. Niektóre szczepy prosięce zlepiają erythrocyty ludzkie grupy 0, świnki morskiej i szczura (44). Aktywność hemaglutynacyjna i zdolności wzrostowe rotawirusów w hodowlach komórkowych również determinowane są właściwościami VP4. Determinanty ulokowane na VP4 są immunogenne i indukują odporność ochronną u zwierząt (14). Trypsynowe miejsce cięcia na VP4 dzieli epitopy neutralizujące tego białka na dwa regiony neutralizujące. Region pierwszy, zlokalizowany na N-końcowym fragmencie VP8, zawiera determinanty swoiste głównie dla danego szczepu, drugi, na C-końcowym fragmencie VP5 bierze udział w reakcjach krzyżowych zachodzących pomiędzy rotawirusami, należącymi do różnych serotypów. Porównawcza analiza sekwencji nukleotydowych wykazała typową budowę genu 4 u badanych rotawirusów prosięcych. Podobnie jak inne szczepy rotawirusów należących do grupy A posiadały w tych samych pozycjach konserwatywne proliny, cysteiny i trypsynowe miejsce cięcia. Pomimo przynależności do różnych typów VP7 (G3, G4, G5, G11), badane szczepy rotawirusów prosięcych cechowało z jednym wyjątkiem bliskie pokrewieństwo sekwencji

genu 4. Homologia w zakresie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej w obrębie porównywanych szczepów z OSU (G5) i szczepem YM (G11) wynosiła odpowiednio 93% i 97%, lecz tylko 70% ze szczepem Gottfried (G4) (27). Wykazano również wysoką homologię sekwencji, bo aż 88%, pomiędzy ludzkimi asymptotycznymi rotawirusami a prosięcym szczepem Gottfried. Wysoki stopień pokrewieństwa struktury epitopów neutralizacyjnych na VP4 szczepu Gottfried i szczepów ludzkich został wykazany w badaniach z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (18, 30) oraz poliklonalnych. Na podstawie tych analiz zasugerowano, że szczep Gottfried może być naturalnie występującym reasortantem prosięcego i ludzkiego rotawirusa lub też rotawirusem ludzkiego pochodzenia, patogennym dla świń (30). Natomiast fakt występowania wysoce homologicznego genu 4 u pozostałych rotawirusów prosięcych o różnych serotypach G, był podstawą hipotezy, że są one naturalnie występującymi reasortantami. Stwierdzane w tym genie drobne różnice, wyrażające się pojedynczymi podstawieniami aminokwasów, tłumaczy się ciągłą presją selekcyjną przeciwciał (27). Ostatnio, badania nad występowaniem typów antygenowych VP4 w obrębie rotawirusów, przeprowadzono w oparciu o antysurowice skierowane przeciw rekombinowanemu białku VP4, uzyskanemu na drodze jego ekspresji w systemie bakulowirusa (19, 32, 41). Wśród 14 rotawirusów prosięcych, należących do czterech odrębnych serotypów G, stwierdzono występowanie dwóch swoistości antygenowych VP4, reprezentowanych przez szczepu OSU i Gottfried (33). Typ OSU-podobny (P7) spotyka się prawie we wszystkich szczepach G3, G5, G11 i niektórych szczepach G4. Typ Gottfried podobny (P6) obecny jest w niektórych szczepach G4. Prosięce szczepu rotawirusów typu P7 namnażają się dobrze w hodowlach komórek MA-104 i osiągają wysokie miana. Replikacja szczepów P6 jest dużo mniej intensywna w tym samym układzie biologicznym, czego efektem są większe trudności w zaadaptowaniu ich do hodowli komórkowej i niskie miana. Gen 4 australijskiego szczepu prosięcego MDR-13 jest dłuższy od innych alleli tego genu o 6 nukleotydów a homologia pomiędzy tym szczepem a OSU jest niewielka i wynosi 76% i 79% odpowiednio dla sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej. Ponieważ dodatkowo surowice dla prosięcych szczepów neutralizują MDR-13 w bardzo niskich mianach, przypuszcza się, że VP4 tego szczepu może być nowym typem P. Szczep MDR-13 ma unikatowy gen VP7, którego sekwencja jest podobna do OSU lecz serologicznie posiada cechy zarówno serotypu G5 i G3 (27).

Wyjaśnienie roli jaką odgrywają serotypy w epidemiologii zakażeń rotawirusowych jest obecnie jednym z podstawowych zadań na drodze do opracowania skutecznej szczepionki przeciw zakażeniom

rotawirusowym. W tym miejscu należy podkreślić, że lista serotypów rotawirusów nie jest jeszcze zamknięta. W dalszym ciągu pojawiają się doniesienia o izolacji nowych, jeszcze nie do końca scharakteryzowanych szczepów, których znaczenie epidemiologiczne nie jest wyjaśnione (2, 3, 34, 40, 42, 47). Aktualnie szczepu rotawirusów grupy A izolowane od świń zakwalifikowano do typów G1, G3, G5, G10, G11 oraz P6 i P7 (5, 11, 12, 38, 45, 47). Badania mające na celu określenie stopnia rozpowszechnienia i częstotliwości występowania serotypów rotawirusów, prowadzone w oparciu o tradycyjne odczyny serologiczne są niełatwe. Z uwagi na fakt występowania dwóch, niezależnie segregujących białek VP4 i VP7 stymulujących przeciwciała o odrębnej swoistości, w znaczącym procencie przypadków wyniki tych badań są co najmniej dwuznaczne. W celu przezwyciężenia tych trudności zastosowano w tych odczynach przeciwciała monoklonalne serotypowo-swoiste. Wkrótce okazało się, że z różnych powodów, w około 30%-40% badanych próbkach określenie serotypu jest niemożliwe (28). Użycie serotypowo-swoistych MAb dla rotawirusów prosięcych w teście ELISA nie pozwoliło na określenie serotypu w 43 na 87 próbkach kału, pozytywnych w teście ELISA grupowo-swoistym. Stwierdzono przy tym, iż cząsteczki wirusowe w nich zawarte, w przeciwieństwie do tych gdzie określono serotyp, nie miały właściwości infekcyjnych. Sugerowało to dezintegrację lub degradację zewnętrznej warstwy kapsydowej tworzonej przez VP4 i VP7 i jednocześnie wskazywało na przyczynę braku aktywności MAb. Ci sami autorzy stwierdzili wśród tej samej partii próbek również i takie, które zawierały infekcyjne cząsteczki rotawirusów nie reagujących w ogóle z żadnym MAb albo reakcja zachodziła z 2 lub większą ilością MAb (38). Zupełny brak reaktywności tłumaczy się wewnątrzserotypowym zróżnicowaniem antygenowym lub mniejszą czułością testu serotypującego, spowodowaną dużo mniejszą w stosunku do antygeny grupowej ilością glikoproteiny VP7. Natomiast reaktywność z kilkoma serotypowo-odrębnymi MAb można przypisywać, w świetle dzisiejszego stanu wiedzy, mozaikowej strukturze genów. Reaktywność tylko kilku MAb z całego, serotypowo-swoistego panelu przeciwciał, może oznaczać zmiany struktury pozostałych epitopów, wynikających z pojedynczych podstawień lub innych zmian w obrębie sekwencji kodujących je nukleotydów.

Z przedstawionego, krótkiego przeglądu osiągnięć ostatnich lat w dziedzinie badań nad rotawirusami wynika, że dalszy postęp w badaniach podstawowych determinowany jest wprowadzaniem metod biologii molekularnej, dzięki którym możliwa jest dokładniejsza analiza struktury i biologii tych wirusów. Rosnąca stale ilość informacji o budowie i organizacji genomu pozwala również na stosowanie

hybrydyzacji i techniki PCR w diagnostyce klinicznej i badaniach epidemiologicznych uwzględniających przede wszystkim charakterystykę molekularną rotawirusów w powiązaniu z klinicznym przebiegiem infekcji i naturalnym krążeniem tych wirusów w środowisku. Pewne, wspomniane już, niedoskonałości typowania rotawirusów za pomocą przeciwciał monoklonalnych można wyeliminować poprzez zastosowanie hybrydyzacji molekularnej. W większości przypadków utrata reaktywności przeciwciała monoklonalnego z odpowiadającą mu determinantą antygenową związana jest z podstawieniem lub zmianą jednego lub dwóch nukleotydów. Sondy cDNA serotypowo swoiste są niewrażliwe na tak niewielkie zmiany sekwencji i mogą wykrywać monotypy oraz warianty. Te sondy są również skuteczne w przypadku serotypowania rotawirusów z nieaktywnymi lub brakującymi epitopami na VP7 i VP4 po degradacji zewnętrznej warstwy kapsydu. Doskonałym uzupełnieniem hybrydyzacji jest 5000 razy bardziej czuła technika PCR (52, 53). Wydaje się właśnie, że ponowne sięgnięcie do źródeł, tzn. uporządkowanie zebranych danych epidemiologicznych i wyjaśnienie ich wzajemnych związków na poziomie molekularnym jest punktem wyjścia do opracowania skutecznej profilaktyki i zwalczania choroby biegunkowej na tle rotawirusowym tak u ludzi jak i zwierząt.

Piśmiennictwo

- Albert M. J., Unicomb L. E., Tzipori S. R., Bishop R. F.: Arch. Virol. 93, 123, 1987.
- Arias C. F., Ruiz A. M., López S.: J. Clin. Microbiol. 27, 2871, 1989.
- Bellinzoni R. B., Mattion N. M., Matson D. O., Blackhall J., La Torre J. L., Scodeller E. A., Urasawa S., Taniguchi K., Estes M. K.: J. Clin. Microbiol. 28, 633, 1990.
- Bohl E. H., Saif L. J., Theil K. W., Agnes A. G., Cross R. F.: J. Clin. Microbiol. 15, 312, 1982.
- Bohl E. H., Theil K. W., Saif L. J.: J. Clin. Microbiol. 19, 105, 1984.
- Bridger J. C., Woode G. N., Jones J. M., Flewett T. H., Bryden A. S., Davies H.: J. Med. Microbiol. 8, 565, 1975.
- Bridger J. C.: Pig news and information 9, 23, 1988.
- Bridger J. C.: Vet. Rec. 107, 532, 1980.
- Chasey D., Davies P.: Vet. Rec. 114, 16, 1984.
- Chen D., Estes M. K., Ramig R. F.: J. Virol. 66, 432, 1992.
- Ciarlet M., Hidalgo M., Liprandi F.: Arch. Virol. 141, 601, 1994.
- Ciarlet M., Liprandi F.: J. Clin. Microbiol. 32, 292, 1994.
- Debouck P.: Porcine rotavirus, w: Virus infections of porcines, chapter 7, red. M. B. Pensaert. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 97-109, 1989.
- Estes M. K., Cohen J.: Microbiol. Rev. 53, 410, 1989.
- Flewett T. H., Woode G. N.: Arch. Virol. 57, 1, 1978.
- Flores J., Hoshino Y., Boeggeman E., Purcell R., Chanock R. M., Kapikian A. Z.: Arch. Virol. 87, 273, 1986.
- Fukusho A., Shimizu Y., Ito Y.: Arch. Virol. 69, 49, 1981.
- Gorziglia M., Larralde G., Kapikian A. Z., Chanock R. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 7155, 1990.
- Gorziglia M., Nishikawa K., Hoshino Y., Taniguchi K.: J. Virol. 64, 414, 1990.
- Greenberg H., McAuliffe V., Valdesuso J., Wyatt R., Flores J., Kalica A., Hoshino Y., Singh N.: Infect. Immun. 39, 91, 1983.
- Greenberg H., Valdesuso J., van Wyke K., Midthun K., Walsh M., McAuliffe V., Wyatt R. G., Kalica A. R., Flores J., Hoshino Y.: J. Virol. 47, 267, 1983.
- Hess R. G., Bachmann P. A.: Proc. 6th Congress Intern. Pig Vet. Soc. June 30-July 3, Copenhagen, Denmark, 127, 1980.
- Hoshino Y., Nishikawa K., Benfield D. A., Gorziglia M.: Virology 199, 233, 1994.
- Hoshino Y., Sereno M. M., Midthun K., Flores J., Kapikian A. Z.: Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 8701, 1985.
- Hoshino Y., Wyatt R. G., Greenberg H. E., Flores J., Kapikian A. Z.: J. Infect. Dis. 149, 694, 1984.
- Huang J., Negesha H. S., Dyall-Smith M. L., Holmes I. H.: Arch. Virol. 109, 173, 1989.
- Huang J., Nagesha H. S., Holmes J. H.: Virology 196, 319, 1993.
- Johnson M. E., Paul P. S., Gorziglia M., Rosenbusch R.: Vet. Microbiol. 24, 307, 1990.
- Kang S. Y., Benfield D. A., Gorziglia M., Saif L. J.: J. Clin. Microbiol. 31, 2291, 1993.
- Kang S., Saif L. I., Miller K. L.: J. Clin. Microbiol. 27, 2744, 1989.
- Kapikian A. Z., Chanock R. M.: Rotaviruses, w: Virology, chapter 49, red. B. N. Fields, D. M. Knipe, et al, Raven Press Ltd., New York, 1353, 1990.
- Li B., Gorziglia M.: J. Clin. Microbiol. 31, 3075, 1993.
- Liprandi F., Rodrigues I., Piña C., Larralde G., Gorziglia M.: J. Virol. 65, 1658, 1991.
- Lopez S., Lopez I., Romero P., Mendez E., Soberon X., Arias C. F.: J. Virol. 65, 3738, 1991.
- Mackow E. R., Shaw R. D., Matsui S. M., Vo P. T., Benfield D. A., Greenberg H. E.: Virology 165, 511, 1988.
- McNulty M. S., Pearson G. R., McFerran J. B., Collins D. S., Allan G. M.: Vet. Microbiol. 1, 55, 1976.
- Nagesha H. S., Brown L. E., Holmes I. H.: J. Virol. 63, 3545, 1989.
- Nagesha H. S., Holmes I. H.: J. Med. Virol. 35, 206, 1991.
- Nagesha H. S., Holmes I. H.: J. Clin. Microbiol. 26, 171, 1988.
- Nagesha H. S., Huang J., Hum C. P., Holmaes J. H.: Virology 175, 319, 1990.
- Nishikawa K., Fukuhara N., Liprandi F., Green K., Kapikian A. Z., Chanock R. M., Gorziglia M.: Virology 173, 631, 1989.
- Paul P. S., Lyoo Y. S., Andrews J. J., Hill H. T.: Arch. Virol. 100, 139, 1988.
- Paul P. S., Lyoo Y. S.: Vet. Microbiol. 37, 299, 1993.
- Paul P. S., Stevenson G. W.: Rotavirus and reovirus, w: Diseases of swine, red. A. D. Leman, B. Straw, R. D. Glock, at all, Ames: Iowa State Univ. Press, 331, 1992.
- Pongsuwanna Y., Taniguchi K., Chiwakul M., Urasawa T., Wakasugi F., Jayavasu C., Urasawa S.: J. Clin. Microbiol. 34, 1050, 1996.
- Pospishil A., Guscetti F.: Pig news and information 10, 337, 1989.
- Ruiz A. M., Lopez I. V., Lopez S., Espejo R. T., Arias C. F.: J. Virol. 62, 4331, 1988.
- Taniguchi K., Hoshino Y., Nishikawa K., Green K. Y., Maloy W. L., Morita Y., Urasawa S., Kapikian A. Z., Chanock R. M., Gorziglia M.: J. Virol. 62, 1870, 1988.
- Theil K. W., Bohl E. H., Agnes A. G.: Am. J. Vet. Res. 38, 1765, 1977.
- Utrera V., Mazzali de Ilia R., Gorziglia M., Esparza J.: Res. Vet. Sci. 36, 310, 1984.
- Winiarczyk S.: Medycyna Wet. 49, 260, 1993.
- Winiarczyk S., Grądziński Z., Markowska I., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 50, 605, 1994.
- Winiarczyk S., Grądziński Z., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 49, 359, 1993.
- Woode G. N., Bridger J., Hall G. A., Jones J. M., Jackson G.: J. Med. Microbiol. 9, 203, 1976.
- Woode G. N.: Porcine rotavirus infection, w: Diseases of swine, red. A. D. Leman, B. Straw, R. D. Glock, W. L. Mengeling, R. H. C. Penny, E. Scholl, Ames: Iowa State Univ. Press, 368, 1986.

Adres autora: dr hab. Stanisław Winiarczyk, ul. Popietuski 26, 20-052 Lublin