

# Aktualne dane na temat zakażeń powodowanych przez wirus syncytialny układu oddechowego bydła

JERZY ROLA, MIROSŁAW P. POLAK

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

Rola J., Polak M. P.

## Current data on infections caused by bovine respiratory syncytial virus

### Summary

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) is one of the major infectious agents causing diseases in young cattle. The virus can be the primary cause of respiratory infections or it can be one of many agents causing a respiratory disease complex. The results of serological examinations and virus isolations have indicated that BRSV is widely distributed in cattle populations all over the world. Economical losses caused by BRSV are associated mainly with the mortality, high cost of treatment and slower growth rates of calves. Genuine progress in the diagnosis and prophylaxis of respiratory infections caused by BRSV was observed recently. The purpose of the paper is to present the current knowledge on epizootiology, diagnosis and control of respiratory infections caused by BRSV.

**Keywords:** BRSV, bovine

Ze względu na etiologię, choroby zakaźne układu oddechowego u bydła można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Do pierwszej z nich zalicza się choroby wywoływane przez pojedynczy, specyficzny patogen odgrywający decydującą rolę w procesie zakażenia. Druga grupa obejmuje tzw. zespół oddechowy (Bovine Respiratory Disease Complex, BRDC), którego etiologia jest wieloczynnikowa. Niniejsza publikacja zawiera aktualne informacje na temat biologii wirusa syncytialnego układu oddechowego bydła (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV), który w zależności od warunków może samodzielnie wywoływać zachorowania u cieląt przebiegające z objawami ostrej niewydolności oddechowej bądź może być jednym z czynników wywołujących zespół oddechowy.

BRSV został wyizolowany po raz pierwszy w Szwajcarii w 1970 r. (14). Wirus ten należy do rodziny *Paramyxoviridae*, podrodziny *Pneumovirinae*, rodzaju *Pneumovirus* (13). Do rodzaju tego należą także: wirus syncytialny układu oddechowego człowieka (Human Respiratory Syncytial Virus, HRSV), wirus syncytialny układu oddechowego owiec (ORSV) i kóz (CRSV), pneumowirus myszy oraz wirus wywołujący zapalenie nosa i tchawicy u indyków. Genom wirusa BRSV to jednoniciowy RNA o ujemnej polarności zbudowany z około 15 300 nukleotydów (9, 15). W obrębie genomu zidentyfikowano 10 genów kodujących białka wirusowe. Poszczególne geny ułożone są w następującym porządku: 3'NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-

-M2-L. Dziewięć pierwszych genów oddzielają regiony intergenomowe liczące od 2 do 52 nukleotydów. Dwa ostatnie geny zachodzą na siebie na odcinku 67 nukleotydów. Spośród 10 białek wirusowych, 8 to białka strukturalne wirionu. Białka N, P i L tworzą wspólnie kompleks nukleokapsydu, M i M2 to nieglikozylowane białka błonowe, zaś F i G to dwie glikoproteiny powierzchniowe. Białko F jest odpowiedzialne za penetrację wirusa (12). Powoduje ono fuzję otoczki wirionu z błoną komórkową, dzięki czemu wirus wnika do wnętrza komórki. Jest ono także odpowiedzialne za fuzję błon komórek przylegających do siebie, w wyniku czego dochodzi do tworzenia się syncytiów. Białko to jest syntetyzowane w postaci nieaktywnego białka prekursorowego  $F_0$ , które po pocięciu przez proteazę komórkową uzyskuje formę aktywną, składającą się z podjednostek  $F_1$  (50 kDa) i  $F_2$  (19 kDa) połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. Glikoproteina G jest białkiem wiążącym, które uczestniczy w łączeniu się wirusa z komórką. Jest ono zbudowane z 257 aminokwasów i ma masę około 28 kDa (8). Białko to jest najbardziej zmiennym białkiem wirusa BRSV. Na podstawie reakcji z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glikoproteiny G, izolaty BRSV podzielono na 3 grupy oznaczone jako A, B i AB (7, 16). Ustalono także, że przeciwciała monoklonalne łączyły się z fragmentem białka między 174 a 210 aminokwasem (5). W miejscu tym znajduje się tzw. pętla cysteinowa. Zmiana nawet pojedynczego aminokwa-

su w obrębie pętli prowadzi do strukturalnego i funkcjonalnego zróżnicowania szczepów BRSV.

### Epidemiologia

Wirus BRSV występuje w populacji bydła na całym świecie. Potwierdziły to wyniki izolacji wirusa oraz badania serologiczne. W USA przed wprowadzeniem szczepień obecność przeciwciał anti-BRSV stwierdzono u 65-81% badanych zwierząt (1, 2). W innych krajach odsetek zwierząt serologicznie dodatnich był również wysoki i wynosił w Anglii 94%, Francji 50%, a w Kanadzie około 78% (3, 11). W warunkach naturalnych choroba z wyraźnie zaznaczonymi objawami klinicznymi występuje głównie u cieląt w wieku 1-6 miesięcy, rzadko stwierdzana jest u cieląt młodszych niż 2 tyg. lub starszych niż 9 miesięcy. U bydła, które nie miało dotychczas kontaktu z wirusem, zachorowania mogą wystąpić u zwierząt w każdym wieku. Źródłem zakażenia są zwierzęta chore, które wydają duże ilości wirusa z wydzieliną z dróg oddechowych. Do zakażenia dochodzi drogą oddechową w wyniku kontaktu z chorymi zwierzętami lub z wydzieliną zawierającą wirus. Okres inkubacji choroby jest krótki i wynosi 3-5 dni. Zachorowalność wśród cieląt może dochodzić do 60-80%, zaś współczynnik śmiertelności na ogół jest niski i nie przekracza 5-10%. Obserwuje się sezonowość zachorowań ze szczytem przypadającym na okres jesień-zima, chociaż opisywano także przypadki wybuchu choroby w miesiącach letnich. Stres związany z przemieszczaniem cieląt, nadmierne zagęszczenie zwierząt, duże wahania temperatury to czynniki, które sprzyjają wystąpieniu choroby. Równie ważne są czynniki negatywnie wpływające na działanie aparatu śluzowo-rzęskowego cieląt np. stężenie amoniaku, względna wilgotność powietrza. Niestety, zachorowania mogą występować również wśród zwierząt, którym zapewniono dobre warunki dobrostanu. Oznacza to, że BRSV może wywoływać zachorowania bez współdziałania negatywnie działających czynników środowiskowych osłabiających zdolności obronne organizmu. Zakażenie BRSV może przebiegać również w formie subklinicznej. Prawdopodobnie jest to związane z występowaniem szczepów BRSV o różnej zjadliwości, poziomem odporności organizmu, sposobem chowu zwierząt oraz warunkami środowiskowymi i pogodowymi. Subkliniczny przebieg choroby obserwuje się u zwierząt serologicznie dodatnich, u których doszło do ponownego zakażenia wirusem BRSV. Wykazano, że zarówno odporność bierna, jak i czynna powstała w wyniku zakażenia pierwotnego BRSV, nie zabezpieczają całkowicie przed ponownym zakażeniem, choć wyraźnie łagodzą przebieg choroby. Nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób wirus przeżywa w okresie pomiędzy kolejnymi wybuchami choroby. Przypuszcza się, że powoduje on zakażenie trwałe/latentne komórek układu oddechowego bydła i dzięki temu przeżywa przez długi okres. Potwierdziły to badania laboratoryjne, w trak-

cie których stwierdzono, że BRSV zakażał komórki wybranych linii ciągłych bez wywoływania widocznego efektu cytopatycznego. Wykazano także, że podanie kortykosterydów zwierzętom zakażonym BRSV powodowało u nich czterokrotny wzrost miana przeciwciał swoistych (18).

### Objawy kliniczne

W przypadku naturalnego zakażenia BRSV, szczególnie u cieląt ras mięsnych, choroba przebiega w dwóch fazach. Początkowo u zwierząt obserwuje się depresję, zmniejszony apetyt oraz surowiczy wyciek z nosa i oczu. Ciężota wewnętrzna u chorych zwierząt utrzymuje się na poziomie 40°C. Po 2-3 dniach łagodnych objawów rozpoczyna się druga faza choroby, w trakcie której dominują objawy ze strony układu oddechowego. Zwierzęta mają trudności w oddychaniu, towarzyszą im napady suchego kaszlu. Oddech staje się płytki i coraz bardziej przyspieszony (ponad 100 oddechów na minutę). W miarę postępu choroby może dojść do wzrostu ciężoty wewnętrznej (wahania od 40°C do 42°C) oraz nasilenia objawów duszności. Chore zwierzęta przyjmują postawę ulgową z szeroko rozstawionymi kończynami i wyciągniętą do przodu szyją, oddychają przez otwartą jamę gębową. Duszności może towarzyszyć odma podskórna, która lokalizuje się w okolicach łopatek i grzbietu, będąca efektem pęknięcia pęcherzyków płucnych i gromadzenia się pod skórą uwolnionego powietrza. W badaniu osłuchowym stwierdza się wzmocniony szmer oskrzelowy i oskrzelowo-pęcherzykowy. U chorych cieląt niemal powszechnie występują zaparcia. Choroba może trwać 1-2 tyg. W przypadku nadkażenia bakteriami, co obserwowano głównie u cieląt starszych, wśród objawów dominują kaszel, wysoka gorączka i śluzowo-ropny wypływ z nosa.

### Zmiany anatomopatologiczne

W płucach, szczególnie w płatach przeponowych widoczne są wyraźne oznaki rozedmy. Niekiedy na powierzchni płuc obserwuje się duże pęcherze rozedmowe, a w przypadku ich pęknięcia ogniska odmy. Oskrzela wypełnione są śluzowo-ropnym wysiękiem. Węzły chłonne oskrzelowe i śródpiersiowe są obrzękłe i wyraźnie powiększone. W preparatach histologicznych z płuc widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych oraz charakterystyczne olbrzymie komórki syntycjalne.

### Rozpoznanie

Na podstawie objawów klinicznych można jedynie podejrzewać zakażenie BRSV, jednak ostateczne rozpoznanie należy potwierdzić badaniem laboratoryjnym. Opiera się ono na wykazaniu serokonwersji u podejrzanych zwierząt oraz izolacji wirusa lub wykryciu antygeny wirusowego w badanych narządach. Do izolacji wirusa można użyć wymazów z nosa i worka spojówkowego, wypłuczyn z tchawicy i oskrzeli. Użycie

do izolacji próbek pobranych z dolnych odcinków układu oddechowego zwiększa szansę wykrycia BRSV. Wymazy należy pobrać w początkowym okresie choroby (surowiczy wypływ, nieco podwyższona ciepłota wewnętrzna, zapalenie spojówek) i zalać najlepiej płynem do hodowli komórek. Od padłych cieląt należy przesłać wycinki płuc pobrane z okolic tkanki zdrowej i chorobowo zmienionej. Ponieważ wirus BRSV jest wrażliwy na działanie czynników fizycznych i szybko traci żywotność, wszystkie próbki należy umieścić w termotorbie, obłożyć wkładami chłodzącymi i jak najszybciej przesłać do laboratorium. Izolacja wirusa w hodowli komórkowej jest trudna, ponieważ efekt cytopatyczny pojawia się późno, stąd czas inkubacji zakażonej hodowli jest długi (20-30 dni). Najbardziej przydatne do izolacji są hodowle komórek nerki płodu lub jąder cielęcia (10, 17, 19).

W rutynowej diagnostyce powszechnie stosowany jest test immunofluorescencji bezpośredniej. Charakterystyczne dla izotiocjanianu fluoresceiny zielone świecenia ograniczone są do cytoplazmy komórek. Najlepsze wyniki uzyskuje się, badając testem immunofluorescencji ultracienkie skrawki z płuc, szczególnie z płatów przedniego i sercowego. Antygen wirusowy lokalizuje się głównie w nabłonku pęcherzyków płucnych i wykrywany jest do 48 godz. po śmierci zwierzęcia. Po tym czasie antygen zanika, nawet jeżeli próbki przechowywane są w temp.  $-100^{\circ}\text{C}$ . Wyróżnia się dwa typy fluorescencji. W typie A antygen jest równomiernie rozmieszczony w cytoplazmie zakażonych komórek, komórki są nieuszkodzone i często obserwuje się syncytia. W typie B antygen występuje w postaci skupisk ziarnistości, komórki są porożrywane, a skupiska antygeny dostają się do światła pęcherzyków płucnych lub oskrzelików. Typ A fluorescencji stwierdza się w próbkach płuc od 2-3 tyg. cieląt, zaś typ B przeważnie w płucach ze zmianami rozedmowymi od zwierząt starszych. Do wykrywania obecności antygeny wirusa coraz częściej stosowany jest także test PCR (6).

W badaniach serologicznych używane są następujące testy: neutralizacji wirusa, pośredniej immunofluorescencji, ELISA oraz odczyn wiązania dopełniacza. Zaleca się badanie par surowic pochodzących od tego samego zwierzęcia. Pierwszą próbkę należy pobrać w okresie ostrej fazy choroby, a drugą 2-3 tyg. później, w okresie rekonwalescencji. Pewną niedogodnością przy badaniu par surowic jest długi czas oczekiwania na wynik końcowy. U cieląt młodszych niż 3 miesiące rozpoznanie serologiczne jest utrudnione z powodu obecności przeciwciał matczynek. Alternatywą może być w tym przypadku użycie do badania testu ELISA specyficznego dla klasy immunoglobulin, gdyż przeciwciała matczyne przekazane z siałą należą do izotypu IgG1. Wykrycie w surowicy cieląt obecności innych izotypów immunoglobulin wskazuje na czynne zakażenie BRSV.

## Postępowanie

W pierwszej kolejności należy zwrócić uwagę na warunki utrzymania zwierząt. Jeżeli stwierdzi się odstępstwa od przyjętych norm w zakresie dobrostanu i żywienia zwierząt, to nieprawidłowości te należy jak najszybciej wyeliminować. Istotną rolę w profilaktyce zakażeń układu oddechowego powodowanego przez wirus BRSV odgrywa immunoprofilaktyka. Zasadniczym celem szczepień jest ochrona zwierząt przed zachorowaniami w postaci klinicznej i w konsekwencji padnięciami. Do uodporniania zwierząt używane są szczepionki żywe modyfikowane (modified-live vaccine, MLV) oraz inaktywowane. Główną zaletą szczepionek żywych jest to, że aktywują one odpowiedź immunologiczną zarówno humoralną, jak i komórkową. Ponadto szczepionki MLV stymulują odpowiedź dla większości białek wirusowych. Dlatego przeciwciała indukowane przez te szczepionki reagują krzyżowo w większym stopniu niż przeciwciała indukowane przez szczepionki inaktywowane. Jest to ważne w przypadku zakażeń BRSV, gdyż wykazano że wśród terenowych izolatów wirusa występują różne warianty antygenowe. Szczepionki MLV także silnie indukują produkcję przeciwciał neutralizujących, a powstała odporność trwa dłużej niż w przypadku szczepionek inaktywowanych. U cieląt, którym podano szczepionkę MLV stwierdzono co najmniej 16-krotny wzrost miana przeciwciał neutralizujących (4). Badania terenowe wykazały także, że podanie szczepionki MLV zmniejszyło częstotliwość występowania zachorowań ze strony układu oddechowego oraz poprawiło efektywność tuczu u cieląt szczepionych, w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku szczepionek żywych istnieje jednak ryzyko rewersji zjadliwości szczepu szczepionkowego. Ryzyko wystąpienia choroby w wyniku zakażenia wirusem szczepionkowym, który uległ rewersji jest największe u cieląt z obniżoną odpornością. Do grupy tej należą zwierzęta po odsadzeniu lub bezpośrednio po długim transporcie.

Szczepionki inaktywowane w porównaniu do szczepionek żywych słabiej indukują wytwarzanie przeciwciał neutralizujących. Stosowane są domięśniowo, a przy początkowym szczepieniu wymagane jest dwukrotne podanie szczepionki w odstępie kilku tygodni. Odporność powstająca po ich podaniu trwa krócej i dlatego konieczne jest częstsze podawanie dawek przypominających. Szczepionki inaktywowane skutecznie indukują wytwarzanie przeciwciał nieneutralizujących, które rozpoznają białko F wirusa BRSV. Przypuszcza się, że inaktywacja powoduje zmiany w epitopach konformacyjnych glikoprotein F i G, zaangażowanych w indukcję przeciwciał neutralizujących. Szczepionki inaktywowane mają ograniczoną zdolność do aktywowania limfocytów cytotoksycznych T, które odgrywają ważną rolę w procesie powrotu do zdrowia i oporności na reinfekcję.

Skuteczność szczepionek zależy w dużym stopniu od czasu szczepienia zwierząt. Przy wyborze właściwego momentu szczepienia należy brać pod uwagę wiek oraz stan zdrowotny zwierząt. Należy unikać szczepienia cieląt bezpośrednio po długim transporcie. Szczepionki MLV są nieskuteczne u cieląt, które posiadają przeciwciała matczyne, ponieważ neutralizują one wirusa szczepionkowego, przez co ograniczają jego replikację, a w konsekwencji odpowiedź immunologiczną.

Podsumowując należy stwierdzić, że zmniejszenie strat powodowanych przez BRSV jest możliwe, jeżeli w gospodarstwach hodujących bydło prowadzone są kompleksowe działania profilaktyczne. Zapewnienie prawidłowych warunków utrzymania zwierząt, właściwe postępowanie z cielętami podczas transportu i zasiedlania fermy oraz prawidłowo przeprowadzone szczepienia mają decydujący wpływ na wielkość strat.

### Piśmiennictwo

- Ames T. R.: The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med.* 1993, 88, 881-885.
- Baker J. C., Ames T. R., Markham R. J. F.: Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 240-245.
- Durham P. J. K., Hassard L. E.: Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can. Vet. J.* 1990, 31, 815-820.
- Ellis J. A., Russell H., Cavender J., Haven T. R.: Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of the specificity and activity of serum antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992, 34, 35-45.
- Langedijk J. P., Meloen R. H., Taylor G., Furze J. M., van Oirschot J. T.: Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 1997, 71, 4055-4061.
- Larsen L. E., Tjørnehoj K., Viuff B., Jensen N. F., Uttenthal A. A.: Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: application of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, 11, 416-422.
- Larsen L. E., Uttenthal A. A., Arctander P., Tjørnehoj K., Viuff B., Rontved C., Ronsholt L., Alexandersen S., Blixenkron-Møller M.: Serological and genetic characterisation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup: no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaptation and passages. *Vet. Microbiol.* 1998, 62, 265-279.
- Lerch R. A., Anderson K., Wertz G. W.: Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 1990, 64, 5559-5569.
- Lerch R. A., Stott E. J., Wertz G. W.: Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. *J. Virol.* 1989, 63, 833-840.
- McNulty M. S., Bryson D. G., Allan G. M.: Experimental respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: microbiologic and immunofluorescent findings. *Am. J. Vet. Res.* 1983, 44, 1656-1659.
- Martin H. T.: Indirect hemagglutination test for the detection and assay antibody to bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 1983, 113, 290-293.
- Matheise J. P., Walravens K., Collard A., Coppe P., Letesson J. J.: Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. *Arch. Virol.* 1995, 140, 993-1005.
- Murphy F. A., Famfuet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. W., Martelli G. P., Mayo M. A., Summers M. D.: Virus Taxonomy, Sixth report on taxonomy of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 1995, Suppl. 10.
- Paccaud M. F., Jacquire C.: A respiratory virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 1970, 303, 27-42.
- Samal S. K., Zamora M., McPhillips T. H., Mohanty S. B.: Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein. *Virology* 1991, 180, 453-456.
- Schrijver R. S., Daus F., Kramps J. A., Langedijk J. P. M., Buijs R., Middel W. G. J., Taylor G., Furze J., Huyben M. W. C., van Oirschot J. T.: Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. *Vet. Microbiol.* 1996, 53, 253-260.
- Thomas L. H., Stott E. J.: Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence. *Vet. Rec.* 1981, 108, 432-435.
- Van der Poel W. H., Langedijk J. P. M., Kramps J. A., Middel W. G. J., Brand A., van Oirschot J. T.: Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. *Arch. Virol.* 1997, 142, 1681-1696.
- Wellemmans G., Leunen J., Luchsinger E.: Isolement d'un virus (220/69) serologiquement semblable au virus respiratoire syncytial (RS) humain. *Ann. Méd. Vét.* 1970, 114, 89-93.

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