

Diagnostyka zakażeń syncytialnym wirusem oddechowym bydła

JERZY ROLA, WOJCIECH SOCHA, MIROSŁAW P. POLAK, MAGDALENA LARSKA

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

Rola J., Socha W., Polak M. P., Larska M.

Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections

Summary

The purpose of the paper was to present current knowledge on the epizootiology and diagnosis of respiratory infections caused by BRSV. This virus is one of the major infectious agents causing diseases in young cattle. BRSV can be the main cause of a respiratory infection or it can be one of the etiological agents of respiratory disease complex. The results of serological examinations and virus isolation showed that BRSV is widely distributed in cattle population all over the world. Economic losses caused by BRSV are associated mainly with high costs of treatment, decreased growth rates and calf mortality. A rapid diagnosis of the disease is crucial for further therapeutic management and the treatment should be concentrated on limiting losses within the herd. During recent years several papers concerning the diagnosis of BRSV have been published. This review describes not only the classical methods of virus detection (virus isolation in a cell culture, immunofluorescence, immunohistochemistry) but also the recently applied PCR assay.

Keywords: BRSV, epizootiology, diagnostic methods

Syncytialny wirus oddechowy bydła (bovine respiratory syncytial virus, BRSV) należy do najważniejszych czynników chorobotwórczych odpowiedzialnych za zakażenia układu oddechowego u bydła. W zależności od warunków wirus ten może samodzielnie wywoływać zachorowania bądź może być jednym z czynników wywołujących tzw. zespół oddechowy (Bovine Respiratory Disease Complex, BRDC). Powszechne występowanie wirusa oraz wysoka zachorowalność zwierząt w czasie epizootii sprawiają, że zakażenia tym wirusem są poważnym problemem dla hodowców bydła na całym świecie. Straty ekonomiczne powodowane przez BRSV w krajach o intensywnej hodowli bydła, liczone są w setkach milionów dolarów rocznie. Artykuł ten przedstawia aktualny stan wiedzy na temat epizootiologii oraz diagnostyki zakażeń wywołanych przez BRSV.

Charakterystyka wirusa

Wirus BRSV należy do rodziny *Paramyxoviridae*, podrodziny *Pneumovirinae*, rodzaju *Pneumovirus*. Wiriony BRSV posiadają białkową otoczkę o grubości 7-15 nm, która zbudowana jest z 3 glikoprotein powierzchniowych: G, F i SH. Kapsyd wirusa ma kształt helikalny i składa się z białek: N, P i L. Kapsyd otacza genom wirusa, który stanowi jednoniciowy, liniowy RNA o ujemnej polarności, długości ok. 15 000 za-

sad. RNA wirusa pozbawiony jest odcinków poli A na końcu 3' oraz struktury czapeczki na końcu 5'. Genom BRSV koduje łącznie 11 białek, w tym 9 strukturalnych oraz 2 niestructuralne (25). W tab. 1 przedstawiono lokalizację poszczególnych białek i ich zasadnicze funkcje (5, 14, 15, 20, 25).

Epidemiologia

Wirus BRSV występuje w populacji bydła na całym świecie (2, 6, 10, 11, 16, 18). W USA przed wprowadzeniem szczepień obecność przeciwciał anty-BRSV stwierdzano u 65-81% badanych zwierząt. Naturalnym gospodarzem wirusa jest bydło, jednakże zakażeniu mogą też ulegać inne gatunki zwierząt np.: bizony, owce czy kozice górskie (8, 19). W ciągu pierwszych dni po zakażeniu BRSV namnaża się głównie w komórkach nabłonkowych górnego, a następnie dolnego odcinka układu oddechowego. Począwszy od 7.-8. dnia ilość wydalanego wirusa z wydzielinami z układu oddechowego zmniejsza się, przez co izolacja wirusa staje się coraz trudniejsza. Najwyższą zachorowalność, najcięższy przebieg infekcji oraz największą śmiertelność obserwuje się u osobników młodych w wieku około 6 miesięcy (9, 21, 25). Istnieje kilka teorii wyjaśniających większą podatność na zakażenie BRSV osobników w tej grupie wiekowej. Według niektórych autorów związane jest to z niższym

poziomem specyficznych przeciwciał u zwierząt młodych niż u osobników dorosłych (25). Inne możliwe wyjaśnienie to niedojrzałość tkanek układu oddechowego oraz silniejsza reakcja zapalna w odpowiedzi na zakażenie (9). U osobników najmłodszych (poniżej 2 tygodni) łagodny przebieg zakażenia może być związany z obecnością przeciwciał matczynych. Przeciwciała te nie zapobiegają zakażeniu, ale wyraźnie łagodzą jego przebieg w porównaniu do zwierząt z grupy ryzyka (13). Do czynników wpływających na zwiększoną zapadalność na choroby układu oddechowego związane z zakażeniem BRSV należą także: stres spowodowany transportem oraz gwałtowne zmiany temperatury. W warunkach klimatu umiarkowanego zakażenia BRSV wykazują sezonowość z najwyższą liczbą zachorowań w okresie jesień–zima (23, 25). Ponieważ wirus BRSV przenosi się głównie poprzez kontakt bezpośredni, rozprzestrzenianiu się wirusa w stadzie sprzyja duże zagęszczenie zwierząt. Równie ważne są czynniki negatywnie wpływające na działanie aparatu śluzowo-rzęskowego cieląt: np. wysokie stężenie amoniaku, nieodpowiednia względna wilgotność powietrza. Niestety, zachorowania mogą występować również wśród zwierząt, którym zapewniono dobre warunki bytowania. Świadczy to o tym, że BRSV może wywoływać zachorowania bez współdziałania negatywnie działających czynników środowiskowych osłabiających zdolności obronne organizmu.

Objawy kliniczne

Przebieg zakażenia może być bardzo zróżnicowany: od bezobjawowego po bardzo ciężki, z wyraźnie zaznaczonymi objawami zapalenia górnych i dolnych dróg oddechowych. Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się w 2 do 5 dni po zakażeniu. W łagodnym przebiegu choroby obserwuje się obecność dużej ilości surowiczo-śluzowej wydzieliny w jamie nosowej, kaszel, przyspieszony oddech i podwyższoną ciepłotę wewnętrzną. Cięższymi przypadkami oprócz większego nasilenia powyższych objawów towarzyszą trudności w oddychaniu oraz osłabienie łaknienia. W najcięższych przypadkach w płucach powstają rozległe ogniska rozedmowe (14, 24-26).

Zakażeniom BRSV towarzyszą charakterystyczne zmiany patologiczne w tkankach górnych i dolnych odcinków dróg oddechowych. Można wyróżnić trzy różne przyczyny tych zmian: uszkodzenia wywołane

Tab. 1. Zasadnicze funkcje białek wirusa BRSV

Białko	Lokalizacja	Funkcja	Niezbędne do replikacji
NS1	obecne w wirionie w śladowych ilościach (w dużych ilościach w zakażonej komórce)	ochrona przed odpowiedzią antywirusową organizmu, regulacja transkrypcji i replikacji, współdziała z białkiem NS2	nie
NS2	obecne w wirionie w śladowych ilościach (w dużych ilościach w zakażonej komórce)	ochrona przed odpowiedzią antywirusową organizmu, regulacja transkrypcji i replikacji, współdziała z białkiem NS1	nie
N	nukleokapsyd	podstawowe białko strukturalne nukleokapsydu, ochrona RNA przed RNAzami, bierze udział w regulacji transkrypcji i replikacji, współdziała z białkiem P	tak
P	nukleokapsyd	czynnik regulacyjny transkrypcji i replikacji, współdziała z białkiem N	tak
M	wewnętrzna powierzchnia otoczki	bierze udział w składaniu wirionu	tak
SH	białko transmembranowe otoczki z domeną na zewnętrznej powierzchni błony	udział w fuzji komórek (wspólnie z białkiem F)	nie
G	białko transmembranowe otoczki z domeną na zewnętrznej powierzchni błony	wiązanie się wirusa z komórką gospodarza	nie
F	białko transmembranowe otoczki z domeną na zewnętrznej powierzchni błony	bierze udział w wiązaniu wirusa z zakażoną komórką, fuzji błony komórkowej z otoczką wirusa oraz fuzji komórek zakażonych z niezakażonymi	tak
M2-1	wewnętrzna powierzchnia otoczki	antyterminacyjny czynnik transkrypcyjny	nie
M2-2	wewnętrzna powierzchnia otoczki	białko regulatorowe w procesie transkrypcji	nie
L	nukleokapsyd	polimeraza RNA	tak

bezpośrednio przez wirus, zmiany związane z odpowiedzią układu odpornościowego oraz skutki wtórnych zakażeń bakteryjnych (12). Wirus BRSV wykrywany jest przede wszystkim w dolnej części płuc, w oskrzelikach objętych stanem zapalnym. Do charakterystycznych zmian wywołanych zakażeniem dróg oddechowych należą zmiany martwicze, łuszczenie się komórek nabłonka oraz obecność syncytiów. Ponadto obserwuje się stan zapalny oskrzeli i oskrzelików oraz infiltrację przestrzeni międzyoskrzelikowej oraz międzyoskrzelowej przez monocyty. Zmiany zapalne występują także w pęcherzykach płucnych. Często stwierdza się obrzęk płuc, zapadanie się pęcherzyków oraz nacieki monocytów do przestrzeni międzypęcherzykowej. Światło oskrzeli, oskrzelików oraz pęcherzyków ulega wypełnieniu szczątkami łuszczących się komórek nabłonka oraz neutrofilii. Konsekwencją zmian w pęcherzykach może być śródmiąższowe zapalenie płuc, rozedma oraz odma płuc (12, 26). Wtórne zakażenia bakteryjne powodowane przez *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus* prowadzą do zagęszczenia tkanki płucnej w regionach płuc objętych procesem zapalnym i powstawania ognisk ropnych (12).

Diagnostyka zakażeń BRSV

W diagnostyce zakażeń BRSV kluczową rolę stanowi jakość próbek. Do badań wirusologicznych najczęściej wykorzystywanym materiałem jest tkanka płucna pobrana od padłych zwierząt. W przypadku gdy istnieje konieczność identyfikacji zakażenia u zwierząt żywych, do badania należy przesłać popłuczyny z tchawicy i płuc lub wymazy z nosa (14). Wymazy należy pobierać we wczesnej fazie choroby, najlepiej między 3.-5. dniem po zakażeniu. Ponieważ wirus jest bardzo wrażliwy na działanie czynników zewnętrznych, próbki należy zapakować do termotorby, obłożyć wkładami chłodzącymi i jak najszybciej przesłać do laboratorium. Przeciwciała anty BRSV można oznaczać w surowicy krwi lub w mleku.

Wykrywanie wirusa

Test izolacji wirusa. Podstawową metodą detekcji wirusa jest jego izolacja w hodowli komórkowej. BRSV namnaża się w komórkach następujących linii: EBTr (embryonic bovine trachea cells), BT (bovine turbinate cells), MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney cells), CER (chicken embryo related cells) (22). Test izolacji wirusa ma jednak pewne wady. Aby próba izolacji była skuteczna, zakażenie hodowli komórkowej należy przeprowadzić jak najszybciej po pobraniu próbki, ponieważ wirus BRSV jest niestabilny poza układem oddechowym gospodarza i łatwo traci zdolność do zakażenia. Ponadto zwierzę, od którego pobrano próbkę do izolacji wirusa, powinno być we wczesnej fazie choroby. Jeżeli czas, jaki upłynął od zakażenia był zbyt długi, wolne cząstki wirusowe mogły zostać zneutralizowane przez układ odpornościowy gospodarza (4). Inną wadą tej metody jest jej czasochłonność (14).

Metody immunologiczne wykrywania antygeny. W metodach tych antygen wirusowy wykrywany jest za pomocą znakowanych, specyficznych przeciwciał anty-BRSV. Zaletą większości z tych metod jest fakt, że wykrywają one wirusa nieaktywnego, co zmniejsza rygory dotyczące pobierania i transportu próbek.

Test immunofluorescencji. W metodzie tej wykorzystuje się specyficzne przeciwciała monoklonalne, które wiążą się z głównymi białkami strukturalnymi wirusa. Powstałe kompleksy są wykrywane za pomocą przeciwciał drugiego rzędu, znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Zaletami tej metody są: szybkość (wyniki dostępne w ciągu kilku godzin), czułość oraz specyficzność (4).

Test immunohistochemiczny. Diagnostyka z wykorzystaniem tego testu opiera się na jednoczesnej identyfikacji charakterystycznych zmian histopatologicznych w tkankach oraz identyfikacji wirusa za pomocą metod immunologicznych. Do identyfikacji wirusa wykorzystuje się specyficzne przeciwciała wiążące antygeny wirusowe w zakażonej tkance płucnej. Przed dodaniem przeciwciał tkanka jest utrwalana

w formalinie oraz zatapiana w parafinie. Taka procedura sprawia, że ewentualne zakażenie może być zdiagnozowane nawet po długim czasie od pobrania próbki. Czulość tej metody jest porównywalna, a nawet nieco wyższa niż czulość testu immunofluorescencji (4, 7). Jej wadą jest większa czasochłonność wynikająca z konieczności odpowiedniego przygotowania próbek.

Metoda PCR. Testy oparte na wykorzystaniu RT-PCR należą do najbardziej czułych metod diagnozowania zakażeń BRSV. Badania wykazały, że czulość ta jest wyższa niż w przypadku testu ELISA wykrywającego antygen. Aby uzyskać wiarygodną diagnozę istotny jest dobór odpowiedniego regionu genomu, który będzie poddawany powieleniu. W przypadku BRSV dobrym wyborem jest np. region kodujący glikoproteinę F, który charakteryzuje się wysokim stopniem konserwatywności, dzięki czemu umożliwia identyfikację BRSV pomimo możliwych różnic pomiędzy szczepami (14). Coraz częściej klasyczny RT-PCR jest zastępowany przez real time RT-PCR. Metoda ta pozwala na automatyzację procesu, znaczne skrócenie badania oraz czułą ocenę ilościową stopnia inwazji wirusa. W reakcji tej polimeryzacja oraz detekcja przebiegają w tej samej probówce i w tym samym czasie. Dzięki temu mniejsze jest ryzyko zanieczyszczenia próbki, a czas potrzebny do uzyskania wyników jest znacznie krótszy. Dodatkowo metoda ta może być nawet 100 razy czulsza od klasycznego PCR. Ponadto pozwala ona na ilościowe oznaczenie wirusa BRSV w badanej próbce (1). Przy zastosowaniu specyficznych sond hybrydujących podstawową wadą tej metody może być stosunkowo wysoki koszt badania.

Wykrywanie przeciwciał

Zakażenie BRSV można stwierdzić także pośrednio poprzez wykrycie przeciwciał anty-BRSV w surowicy (mleku u krów) badanych zwierząt. Potwierdzeniem przebytego zakażenia jest stwierdzenie serokonwersji. U zwierząt dorosłych, z wysokim poziomem przeciwciał specyficznych IgG nie zawsze dochodzi do istotnego wzrostu miana przeciwciał po ponownym zakażeniu BRSV. Stwierdza się jedynie przejściowy wzrost poziomu przeciwciał IgM. W testach wykrywających przeciwciała klasy IgG zaleca się badanie par surowic. Pierwszą próbkę należy pobrać w ciągu kilku dni od wystąpienia objawów klinicznych, a drugą około 3-4 tygodnie później. Natomiast aby oznaczyć przeciwciała klasy IgM, surowice powinny być pobrane w ciągu 1-2 tygodni od wystąpienia objawów klinicznych. Metodami najczęściej stosowanymi są test seroneutralizacji i ELISA.

W pierwszym z wymienionych testów dochodzi do neutralizacji wzorcowego szczepu wirusa przez specyficzne przeciwciała obecne w krwi zakażonego zwierzęcia, a efekt ten sprawdzany jest w hodowli komórek. Metoda ta pozwala na określenie miana surowicy. Pewnym mankamentem tej metody jest stosunkowo

długi okres (do 5 dni) potrzebny do wykonania testu oraz konieczność posiadania certyfikowanych materiałów potrzebnych do wykonania testu (4).

Test immunoenzymatyczny (ELISA). Obecnie istnieje wiele odmian testu ELISA stosowanych w rutynowej diagnostyce BRSV (3, 17). Różnią się one między sobą specyficznością i czułością. Generalnie testy ELISA charakteryzują się czułością porównywalną z testem seroneutralizacji, ale nieco niższą specyficznością (3). Dużą zaletą testu jest krótki czas badania.

Piśmiennictwo

1. *Boxus M., Letellier C., Kerkhofs P.*: Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods* 2005, 125, 125-130.
2. *Costa M., Garcia L., Yunus A. S., Rockemann D. D., Samal S. K., Cristina J.*: Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet. Res.* 2000, 31, 241-246.
3. *Dominguez H. G., Campalans J., Almeida R. S., Coswig L. T., Arns C. W.*: Dot-enzyme linked immunosorbent assay as an alternative technique for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antibodies. *Vet. Res.* 2002, 33, 397-404.
4. *Dubovi E. J.*: Diagnosing BRSV infection: A laboratory perspective. *Vet. Med.* 1993, 888-893.
5. *Easton A. J., Domachowski J. B., Rosenberg H. F.*: Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 390-412.
6. *Elazhary M. A. S. Y., Roy R. S., Champlin R., Higgins R., Marsolais G.*: Bovine Respiratory Syncytial Virus in Quebec: Antibody Prevalence and Disease Outbreak. *Can. J. Comp. Med.* 1980, 44, 299-303.
7. *Flores E. F., Weiblen R., Botton S. A., Medeiros M., Irigoyen L. F., Driemeier D., Schuch L. F., Moraes M. S.*: A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesq. Vet. Bras.* 2000, 20, 139-143.
8. *Gaffuri A., Giacometti M., Tranquillo V. M., Magnino S., Cordioli P., Lanfranchi P.*: Serosurvey of Roe Deer, Chamois and Domestic Sheep in the Central Italian Alps. *J. Wild. Dis.* 2006, 42, 685-690.
9. *Grell S. N., Riber U., Tjørnehoj K., Larsen L. E., Heegaard P. M.*: Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model. *Vaccine* 2005, 23, 3412-3423.
10. *Hagglund S., Svensson C., Emanuelson U., Valarcher J. F., Alenius S.*: Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet. J.* 2006, 172, 320-328.
11. *Härtel H., Nikunen S., Neuvonen E., Tanskanen R., Kivelä S. L., Aho P., Soveri T., Saloniemi H.*: Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. *Acta Vet. Scand.* 2004, 45, 193-200.
12. *Kimman T. G., Straver P. J., Zimmer G. M.*: Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: Morphologic and serologic findings. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50, 684-693.
13. *Kimman T. G., Zimmer G. M., Westenbrink F., Mars J., van Leeuwen E.*: Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet. Rec.* 1988, 123, 104-109.
14. *Larsen L. E.*: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet. Scand.* 2000, 41, 1-24.
15. *Pastey M. K., Samal S. K.*: Analysis of bovine respiratory syncytial virus envelope glycoproteins in cell fusion. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 1885-1889.
16. *Poel W. H. van der, Brand A., Kramps J. A., Van Oirschot J. T.*: Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J. Infect.* 1994, 29, 215-218.
17. *Rhodes M. B., Klucas C. A., Frey M. L., Anderson G. A.*: A blocking ELISA for the detection of specific antibodies to bovine respiratory syncytial virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1989, 1, 324-328.
18. *Rossi C. R., Kiesel G. K.*: Serological Evidence for the Association of Bovine Respiratory Syncytial Virus with Respiratory Tract Disease in Alabama Cattle. *Infect. Immunol.* 1974, 10, 293-298.
19. *Sausker E. A., Dyer N. W.*: Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002, 14, 68-70.
20. *Schlender J., Bossert B., Buchholz U., Conzelmann K. K.*: Bovine Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Cooperatively Antagonize Alpha/Beta Interferon-Induced Antiviral Response. *J. Virol.* 2000, 74, 8234-8242.
21. *Schreiber P., Matheise J. P., Dessy F., Heimann M., Letesson J. J., Coppe P., Collard A.*: High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J. Vet. Med. B* 2000, 47, 535-550.
22. *Spilki F. R., Almeida R. S., Campalans J., Arns C. W.*: Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods* 2006, 131, 130-133.
23. *Stott E. J., Thomas L. H., Collins A. P., Crouch S., Jebbett J., Smith G. S., Luther P. D., Caswell R.*: A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J. Hyg.* 1980, 85, 257-270.
24. *Tjørnehoj K., Uttenthal A., Viuff B., Larsen L. E., Rontved C., Ronsholt L.*: An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Res. Vet. Sci.* 2003, 74, 55-65.
25. *Valarcher J. F., Taylor G.*: Bovine Respiratory Syncytial Virus infection. *Vet. Res.* 2007, 38, 153-180.
26. *Woolums A. R., Anderson M. L., Gunther R. A., Schelegle E. S., LaRochele D. R., Singer R. S., Boyle G. A., Friebertshausen K. E., Gershwin L. J.*: Evaluation of severe disease induced by aerosol inoculation of calves with bovine respiratory syncytial virus. *Am. J. Vet. Res.* 1999, 60, 473-480.

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