

hyopneumoniae bacterins. *J. Swine Health Prod.* 1998, **6**, 107-112.

17. Meyns T., Dewulf J., de Kruif A., Calus D., Haesebrouck F., Maes D.: Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 2006, **24**, 7081-7086.

18. Sibila M., Nofrarias M., López-Soria S., Segalés J., Valero O., Espinalm A., Calsamiglia M.: Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 2007, **122**, 97-107.

19. Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A.: Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 2004, **100**, 255-268.

20. Maes D., Verbeke W., Vicca J., Verdonck M., de Kruif A.: Benefits to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgium market conditions from 1996 to 2000. *Livest. Prod. Sci.* 2003, **83**, 85-93.

21. Vicca J., Maes D., Joker L., de Kruif A., Haesebrouck F.: The efficacy of tylosin premix for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Vet. Rec.* 2005, **156**, 606-610.

22. Sibila M., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Segales J., Riera P., Llopart D., Calsamiglia M.: Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet. Microbiol.* 2007, **121**, 352-356.

23. Jensen D., Ersboll A., Nielsen J.: A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Prev. Vet. Med.* 2002, **54**, 265-278.

24. Baccaro M., Hirose F., Umehara O., Gonçalves L., Doto D., Paixão R., Shinya L., Moreno A.: Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *Vet. J.* 2006, **172**, 526-531.

25. Opriessnig T., Yu S., Gallup J., Evans R., Fenaux M., Palares F., Thacker E., Brockus C., Eckermann M., Thomas P., Meng X., Halbur P.: Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet. Pathol.* 2003, **41**, 624-640.

26. Haruna J., Hanna P., Hurnik D., Ikede B., Miller L., Yason C.: The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can. J. Vet. Res.* 2006, **70**, 269-276.

27. Opriessnig T., Halbur P., Yu S., Thacker E., Fenaux M., Meng X.: Effects of the timing of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet. Rec.* 2006, **158**, 149-154.

28. Sibila M., Calsamiglia M., Nofrarias M., López-Soria S., Espinal A., Segalés J., Riera P., Llopart D., Artigas C.: Longitudinal study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in naturally infected pigs. W: *Proceedings of the 18th IPVS Congress*, Hamburg, Germany 2004, 169.

29. Sibila M., Bernal R., Torrent D., March R., Llopart D., Riera P., Calsamiglia M.: Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on colonization, seroconversion and presence of enzootic pneumonia compatible lung lesions. W: *Proceedings of the 19 IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006, 103.

30. Thacker B., Thacker E., Halbur P., Minion C., Young T., Ericsson B., Thanawonguwech T.: The influence of maternally-derived antibodies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. W: *Proceedings of the 16th IPVS Congress*, Melbourne, Australia, 2000, 454.

31. Villarreal I., Meyns T., Dewulf J., Vranckx K., Calus D., Pasmans F., Haesebrouck F., Maes D.: The effect of vaccination of the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet. J.* 2011, **188**, 48-52.

32. Zimmerman W., Odermatt W., Tschudi P.: Enzootische Pneumoniae (EP): die Teilsanierung EP-reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalsanierung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1989, **131**, 179-191.

Prof. dr hab. Marian Trusczyński, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: mtrusczz@piwet.pulawy.pl

The bovine viral diarrhoea virus – BVDV

Oprządek J.¹, Chromik A., Urtnowski P.¹, G. Sender¹, Kubasik D.², Kaba J.³, Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec¹, Breeding Center, Garzyn², Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW³

This article aimed at the presentation of bovine viral diarrhoea virus, important cattle pathogen. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a pestivirus of ruminants throughout the world. BVDV infection leads to reduction in productive and reproductive traits and may result in mucosal disease (BVD-MD) with high mortality up to 100%. Persistent infection (PI), caused by non-cytopathogenic biotype of the virus (NCP BVDV), plays a very important role in epidemiology of the disease. Molecular methods are more specific and sensitive than ELISA in diagnosing BVDV infection. Testing PI calves for viral load with RT-PCR (RT, reverse transcription) is especially important. Real-Time PCR with application of specifically labeled primers – TaqMan, allows differentiate viral load and different biotypes. RT-PCR and Real-Time PCR are the two methods essential for establishing effective BVD-MD eradication programs.

Keywords: bovine viral diarrhoea virus, BVDV.

Wirusowa biegunka bydła (bovine viral diarrhoea – BVD) jest chorobą, która w znacznym stopniu wpływa na opłacalność chowu i hodowli bydła na całym świecie (1). Straty powodowane są zarówno

Wirus wirusowej biegunki bydła – BVDV

Jolanta Oprządek¹, Aleksander Chromik, Piotr Urtnowski¹, Grażyna Sender¹, Dariusz Kubasik², Jarosław Kaba³

z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu¹, Ośrodka Hodowli Zarodowej Garzyn² oraz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie³

zaburzeniami rozrodo, problemami w odchowie cieląt, spadkiem wydajności mlecznej, zmniejszonymi przyrostami, wzrostem brakowania, jak i kosztami leczenia zwierząt. Oceniono, że nakłady związane z występowaniem choroby wahają się od 10 do 40 mln dolarów na milion wycieleń (2).

Chorobę wywołuje wirus wirusowej biegunki bydła (BVDV), należący do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Pestivirus* (3). Do tej samej rodziny zaliczany jest wirus żółtej gorączki, wirus choroby dengi (dengue virus – DV) z rodzaju *Flavivirus* oraz wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus – HCV), należący do rodzaju *Hepatitisvirus* i wywołujący zapalenie wątroby u człowieka. Do rodzaju *Pestivirus* należą również: wirus pomoru klasycznego świń (classical swine fever virus – CSFV) oraz wirus choroby granicznej (border disease virus – BDV) (19). Homologia w sekwencji nukleotydów pomiędzy BVDV a CSFV wynosi około 70% genomu (5).

W 1946 r. grupa naukowców z Olafsonem na czele (6) opisała występujące w stadach krów mlecznych zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego przebiegające

z ostrą biegunką. U kilku zwierząt zaobserwowano zmiany martwicze lub nadżerki na błonie śluzowej jam nosowej i ustnej. Stwierdzono również częste przypadki ronień. Pomimo wysokiej zachorowalności, śmiertelność była niska. W próbkach krwi i innych tkankach nie wykazano obecności bakterii, które wywołują podobne objawy kliniczne. Nową chorobę nazwano wirusową biegunką bydła (bovine viral diarrhoea – BVD). Siedem lat później Ramsey i Chivers po raz pierwszy opisali chorobę błon śluzowych (mucosal disease – MD) u bydła opasowego i mlecznego na terenie stanu Iowa i w sąsiadujących stanach. Podobnie jak w przypadku BVD zaobserwowano biegunkę oraz zmiany martwicze na błonach śluzowych. Tym razem choroba przebiegała z wysoką śmiertelnością. W tym przypadku również nie zidentyfikowano czynnika bakteryjnego i uznano, że jest to oddzielna jednostka chorobowa. Badania przeprowadzone w następnych latach potwierdziły, iż wirusową biegunkę bydła i chorobę błon śluzowych wywołuje ten sam czynnik etiotyczny (6).

Zakażenie wirusem BVD przebiega bardzo różnie. Może mieć charakter

subkliniczny, bez ewidentnie zauważalnych objawów chorobowych (7). Klinicznie jawna postać choroby również może mieć różne nasilenie, od lekkiej, poprzez ciężką z wysokim prawdopodobieństwem wyleczenia, aż do bardzo ciężkiej ze śmiertelnością zbliżoną do 100% (4).

W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku dowiedziono, że wirus BVD w budowie wykazuje wysoką homologię z wirusem klasycznego pomoru świń (classical swine fever virus – CSFV) i wirusem choroby granicznej (border disease virus – BDV). Zakażenia BVDV i BDV obserwowane są głównie u przeżuwaczy (8, 9), ale także u świń (10), natomiast CSFV może zakażać również bydło (11). Wirus BVD atakuje także dzikie przeżuwacze, które mogą być naturalnym rezerwuarem zarazka (12).

Nośnikiem informacji genetycznej BVDV jest kwas rybonukleinowy (RNA). RNA jest znacznie mniej stabilny i bardziej narażony na degradację zarówno w środowisku pozakomórkowym, jak i w komórce niż kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Pomimo tego wirusów z genomem RNA jest 3 razy więcej niż wirusów z genomem DNA. Przewagę tę można tłumaczyć wysoką częstością mutacji na każdej rundzie replikacyjną, przez co wirusy z genomem RNA mogły szybciej ewoluować dzięki dużej heterogenności. Wspólną cechą wirusów mających jako genom RNA o dodatniej polarności – (+)RNA jest to, że zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* służą jako matryca w procesie translacji. Genom tych wirusów spełnia podwójną rolę – nośnika informacji genetycznej i matrycy do jej ekspresji. Wirusy (+)RNA są najbardziej rozpowszechnionym typem wirusów i atakują wszystkie grupy organizmów. Monocistronowy genom wirusa koduje jedną poliproteinę, z której w wyniku rozszczepień proteolitycznych powstaje kilka białek. W wyniku ekspresji otwartej ramki odczytu (open reading frame – ORF), poprzez translację powstaje prekursorowa poliproteina (około 4000 aminokwasów), z której w wyniku proteolitycznych rozszczepień oraz procesów potranslacyjnych powstają wszystkie końcowe białka wirusowe. W procesach proteolitycznych biorą udział komórkowe i wirusowe proteazy (13). Na końcach nici RNA z jednym ORF występują rejony niekodujące (non translated region – NTR). W NTR znajduje się większość sygnałów dla rozpoczęcia procesu i regulacji translacji oraz zapoczątkowania replikacji RNA. Charakterystyczną sekwencją wirusów z rodzaju *Pestivirus* jest wewnętrzne miejsce wejścia rybosomu (internal ribosomal entry site – IRES). Długość RNA wirusa BVD wynosi około 12,3 kbp (14). Pewne szczepy tego wirusa posiadają znacznie dłuższe łańcuchy RNA

do około 16,5 kbp (18), jeszcze inne są krótsze i zawierają około 8 kbp (15). Pierwszym białkiem kodowanym na ORF jest autoproteaza N^{pro}. To niestrukturalne białko w wyniku autoproteolizy poliproteiny powoduje powstanie jego własnego C końca. N^{pro} w poliproteinie poprzedza białko kapsydu (C), glikoproteiny wirusowe (E0, E1, E2) oraz białka niestrukturalne (16).

Z jednej poliproteiny powstaje 12 dojrzałych białek. W przetworzeniu niestrukturalnej proteiny w białka NS2 i NS3 pośredniczy cysteinowa autoproteaza umiejscowiona w NS2. Ten enzym jest ewolucyjnie związany z HCV NS2-3 – proteazą, która tworzy analogiczne rozszczepienie w poliproteinie HCV. NS4-zależna chymotrypsynospetyczna proteaza serynowa w NS3 katalizuje cztery kolejne przetwarzania wirusowej poliproteiny. NS3 wykazuje helikazową i NTPazową aktywność oraz przyczynia się do powstania kompleksu replikacyjnego (replikazy) zbudowanego z pięciu niestrukturalnych białek. Kluczową proteiną replikazy jest RNA zależna polimeraza RNA (NS5B). Rozszczepienie NS2-3 jest katalizowane przez białko NS2. Produkt rozszczepienia NS3 nie może być funkcjonalnie zastąpiony przez NS2-3 w wirusowej replikacji. Nierozszczepiony NS2-3 odgrywa kluczową, ale jak dotąd niezdefiniowaną rolę w powstawaniu potomnych wirusów (17). Głównym białkiem otoczki pestiwirusa jest glikoproteina gp53. Białko E^{ns} jest strukturalną glikoproteiną pestiwirusów i pełni funkcję białka membrano-wiążącego (18).

BVDV jest otoczkowym, (+) jednociowym RNA wirusem o średnicy wirionu 40–60 nm. niewiele publikacji opisuje komórkowy mechanizm wnikania wirusa. Wiadomo, że wnika do komórki gospodarza przez endocytozę klatrynozęależną. Niskie pH utrudnia połączenie z błoną endosomalną (19). Wiadomo jednak, że BVDV jest odporny na niskie pH. Cecha ta często obserwowana jest u wirusów z wnikaniem niezależnym od pH (20). Receptorami BVDV są cząsteczki CD46 i receptor lipoproteinowy niskiej gęstości. Uważa się, iż pestiwirusy przedostają się do docelowych komórek poprzez endocytozę receptorową i kwasowo-indukowaną fuzję otoczki z błoną endosomalną.

Na podstawie zmian cytopatycznych w zakażonych komórkach wyróżniono dwa biotypy wirusa BVD: wirus, który wywołuje zmiany cytopatyczne, oznaczony jako CP BVDV, oraz wirus, który takich zmian nie wywołuje, oznaczony jako NCP BVDV (8). Molekularnym markerem cechy cytopatogenności jest ekspresja genu NS3, w wyniku której powstaje białko p80 o masie 80-kDa. Białko to jest wspólne do dwóch trzecich C-końca białka p125 i jest białkiem niestrukturalnym.

Zidentyfikowano je tylko w komórkach zakażonych wirusami CP, podczas gdy oba biotypy CP i NCP wytwarzają białko NS2-3 (15). Ekspresja białka NS3 jest wynikiem zmian genetycznych obserwowanych w biotypie CP BVDV. Do wytworzenia p80 u niektórych szczepów CP BVDV dochodzi w wyniku proteolitycznego rozszczepienia proteiny p125. We wszystkich tych przypadkach proteolityczne uwolnienie p80 jest związane ze zmianami spowodowanymi w wirusowych genomach przez proces rekombinacyjny, np. poprzez wychwyty sekwencji kodujących komórkową ubikwitynę. W przypadku rodu BVDV CP9 białko p80 transkrybowane jest z cząsteczki DI9. Wirus pomocniczy CP9 nie jest cytopatogeny, jedynie w obecności cząsteczki DI9 dochodzi do zmian cytopatycznych (16). Zamiana szczepu NCP BVDV na CP BVDV w organizmie zwierzęcia trwale zakażonego (persistently infected – PI), lub nadkażenie zwierzęcia PI heterologicznym szczepem CP BVDV powoduje chorobę błon śluzowych.

Zakażenie płodu w pierwszym trymestrze ciąży może przyczynić się do wystąpienia trwałego zakażenia w dalszym okresie życia. Zwierzę trwale zakażone charakteryzuje się obecnością wirusa we krwi, przy braku przeciwciał przeciwko danemu szczepowi NCP BVDV. Po mutacji biotypu NCP na homologiczny CP rozwija się choroba błon śluzowych. Podany wyżej przykład BVDV CP9 jest jednym z wielu sposobów zamiany wirusa NCP na CP. Inną drogą prowadzącą do powstania cytopatogenego wirusa CP z niecytopatogenego wirusa NCP może być duplikacja określonego fragmentu genu. Region kodujący białko NS2 posiada duplikację 27 nukleotydów w genie wirusa CP7, podczas gdy stwierdzono brak tej duplikacji w genie NCP7 (4).

Zakażenie spowodowane wysoce zjadliwym szczepem BVDV jest związane z wyraźnym spadkiem liczby leukocytów, a wzrostem liczby leukocytów apoptycznych i martwych. Zakażenie słabo zjadliwymi BVDV nie powoduje znaczącego wzrostu liczby leukocytów. Na podstawie aktywności szczepów BVDV w hodowlach komórek limfatycznych można rozróżnić trzy biotypy:

- 1) niecytopatogeny (wirusy nie wpływają na zdolność do życia ani komórek w hodowlach nabłonkowych, ani w hodowlach limfatycznych),
- 2) cytopatogeny (cytopatyczny efekt i śmierć komórek w obu hodowlach komórek nabłonkowych i limfatycznych),
- 3) limfocytopatogeny (nie wpływa na komórki w hodowlach nabłonkowych, śmierć komórek w hodowlach limfatycznych jest obserwowana w ciągu 5 dni od zakażenia).

Limfocytopatogeny biotyp jest związany z wysoką zjadliwością w trakcie zakażeń *in vivo*. Śmierć komórek spowodowana przez limfocytopatogeny biotyp nie jest związana z typowymi zmianami widocznymi w hodowlach komórek nabłonkowych po zakażeniu ich szczepem cytopatogenym (21).

Na podstawie różnic w genomie BVDV i różnic antygenowych wyróżniono dwa typy tego wirusa: BVDV1 i BVDV2. Na poziomie molekularnym różnice te są widoczne w regionie 5' nietranslacyjnym (5'UTR) i w regionie p125 kodowanego polipeptydu. Filogenetyczne analizy wskazały, iż BVDV1 różni się od BVDV2 w takim samym stopniu jak szczepy referencyjne BVDV (BVDV-NADL, BVDV-SD-1, BVDV-Osloss) różnią się od wirusa pomoru klasycznego świń. Wśród BVDV1 są wirusy powszechnie używane do produkcji szczepionek, w testach diagnostycznych i w badaniach naukowych. BVDV2 izoluje się przeważnie z bydłowej surowicy płodowej, pochodzącej od trwale zakażonych cieląt, urodzonych przez matki szczepione przeciwko BVDV i od bydła, które padło z powodu ostrej postaci BVD nazywanej zespołem krwotocznym (22). Pośród typu BVDV1 można wyróżnić podtypy: 1d, 1f, 1b, 1g (23), natomiast pośród typu BVDV2 wyróżnia się podtypy: 2a, 2b, 2c, 2d. (24). U bydła opisano marker zjadliwości BVDV2. Występująca w regionie 5'UTR zasada – uracyl lub cytozyna jest skorelowana z odpowiednio niską lub wysoką wirulencją (11).

Namnażanie genomu BVDV rozpoczyna się syntezą na matrycy (+)RNA komplementarnej nici (-)RNA, która to staje się matrycą (-)RNA dla syntezy potomnej nici (+)RNA. Te dwie syntezy określa się terminem replikacji RNA i jest to proces wytworzenia potomnych cząsteczek RNA o takiej samej polarności. Po wnikięciu wirusa do komórki gospodarza jedna nić

matrycy RNA (mRNA) jest matrycą podczas translacji i ta sama nić mRNA jest matrycą w późniejszej replikacji. Dlatego kluczowym procesem, wpływającym na skuteczność zakażenia, jest etap pozbycia się kompleksu translacyjnego z mRNA, tak aby nić mRNA mogła podjąć rolę matrycy w replikacji. Przejście od stanu translacji do replikacji jest istotne w początkowym okresie zakażenia, gdyż w późniejszym okresie syntetyzowane w ogromnych ilościach, cząsteczki (+)RNA mogą albo zostać cząsteczkami mRNA, albo służyć jako matryca do syntezy nici RNA o ujemnej polarności lub mogą być włączone w strukturę nowo powstającego kapsydu.

RNA-zależna polimeraza RNA (RdRp) jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w procesie replikacji RNA u wirusów (+)RNA. Aktywność i struktura RdRp jest coraz lepiej poznawana, jednak mechanizm działania RdRp pozostaje niejasny. Zaproponowano dwuetapowy mechanizm procesu replikacji RNA. Pierwszy etap, inicjacji, rozpoczyna się syntezą RNA w/lub blisko 3' końca matrycy (+)RNA w sposób mechanicznie (*de novo*) starterowo niezależny. *De novo* inicjacja polega na dodaniu nukleotydtrifosforanu (NTP) do 3'-OH pierwszego inicjacyjnego NTP. Następnie, w trakcie tzw. fazy elongacji, reakcja przenoszenia nukleotydu jest powtarzana z kolejnymi NTP, tworząc komplementarny produkt RNA. Określono strukturę RdRp HCV (NS5B; 25).

Kontrola przetwarzania polipeptyny jest zasadniczym etapem w cyklu życiowym wirusów (+)RNA. Niezbędną autoproteazę wytwarzającą podstawowy czynnik wirusowej replikacji zidentyfikowano w BVDV. Ta proteaza umiejscowiona jest w niestrukturalnym białku 2 (NS2) i nieoczekiwanie jej aktywność maleje wcześniej po zakażeniu, ograniczając wirusową replikację RNA.

Ilość komórkowego białka kontroluje pestiwirusową replikację poprzez ograniczenie wytwarzania aktywnych cząsteczek wirusowej proteazy i kompleksów replikacyjnych. Ten unikatowy mechanizm kontroli replikacji jest podstawą do utrzymania niecytopatogenego fenotypu tego wirusa i w ten sposób zdolności wirusa do ustanowienia trwałego zakażenia (17).

Badania wykazały, że ciężarne krowy zakażone szczepem NCP BVDV mogą urodzić trwale zakażone cielęta, które są immunotolerancyjne w odniesieniu do tego szczególnego szczepu. Szczep CP BVDV, oprócz szczepu trwale zakażającego, może być izolowany od zwierząt, u których rozwinęła się choroba błon śluzowych (MD). Oba wirusy izolowane od jednego zwierzęcia chorego na MD są antygenowo prawie identyczne i nazywane są parą wirusów. MD może być wywołana eksperymentalnie przez nadkażenie zwierząt PI

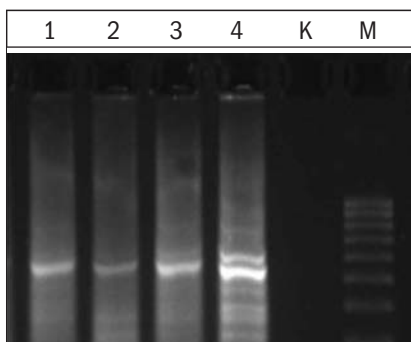
szczepem CP BVDV. Tylko nadkażenie szczepem CP BVDV, którego antygenowy wzór pasuje do szczepu trwale zakażającego NCP BVDV, powoduje rozwój MD. Wirusy izolowane z terenowych przypadków MD scharakteryzowano na poziomie molekularnym. Badania te wykazały, iż każdy z analizowanych CP BVDV szczepów rozwinął się z odpowiedniego, trwale zakażającego NCP BVDV wirusa przez proces rekombinacji RNA (16).

Obserwowano, jaki wpływ ma zakażenie wirusem BVD na płodność jałówek ras mlecznych. Okazało się, iż wysokie miana przeciwciał przeciwko BVDV typu 2 u 10-miesięcznych jałówek powodowało wydłużenie o 32 dni okresu zacielenia, w porównaniu z niskim mianem (1:128). Odwrotnie, zakażenie BVDV u 5–6-miesięcznych zwierząt i wysokie miana przeciwciał przeciwko BVDV typu 2, przyczyniło się do wcześniejszego zacielenia o miesiąc (26).

Zakażenie *in vitro* różnych komórek bydłowych szczepem CP BVDV prowadzi do koprodukcji alfa/beta interferonu (IFN- α/β), podczas gdy NCP BVDV nie indukują *in vitro* IFN- α/β . Podobnie CP BVDV indukują IFN- α/β u wczesnego płodu bydłowego, a NCP BVDV nie indukują. Jednak ostre zakażenie wrażliwego bydła szczepem NCP BVDV daje w wyniku produkcję IFN- α/β (27).

Metody diagnostyczne prowadzące do wykrycia zakażenia BVDV mogą opierać się na wykryciu wirusa lub antygenów wirusa w tkankach i wydzielinach organizmu lub na wykryciu przeciwciał przeciwko BVDV w surowicy zakażonych zwierząt. Do rozwoju choroby dochodzi w 2–14 dni po przedostaniu się wirusa do organizmu. Choroba przebiega w stadzie epidemicznie, zwykle trwa to tygodniami. Przebieg choroby jest wypadkową wirulencji szczepu, otrzymanej dawki wirusa, wieku zwierzęcia oraz stanu jego odporności. Przeciwciała są wykrywalne po 10 dniach od zakażenia, jednak u części zwierząt pojawiają się znacznie później, prawdopodobnie wskutek właściwości immunosupresyjnych wirusa. Narastanie poziomu przeciwciał obserwuje się do około 3 miesięcy po zakażeniu.

Obecnie stosowane metody, pozwalające wykryć trwale zakażone zwierzęta w stadzie, oparte są o identyfikację antygenów BVDV we krwi lub innych tkankach. Wykazano, iż RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction), razem z analizami na żelu agarozowym produktów amplifikacji, jest swoistą i bardziej czułą techniką niż test ELISA (ryc. 1), ale duża liczba czynności laboratoryjnych zwiększa prawdopodobieństwo zanieczyszczenia. Prawdopodobieństwo to można zmniejszyć, stosując real-time PCR i z użyciem



Ryc. 1. Wynik amplifikacji szczepów wirusa BVDV (badania własne)

M – marker wielkości DNA

K – kontrola negatywna

1–4 – wynik amplifikacji w reakcji RT PCR – poziom fluorescencji wskazuje na zróżnicowaną zawartość syntetyzowanego cDNA

metody 5' nukleazy, poprzez włączenie sond znaczonej fluorochromami: 5'reporter i 3'quencher. Sondy różnią się pomiędzy sobą, pozwalając rozróżnić badany materiał na genotypy. Opracowano system TaqMan, wykorzystujący próbki pulowane krwi (krew od kilku osobników), który pozwala jednocześnie określić genotyp i liczbę genomów wirusa w badanej próbce. Takie postępowanie jest mniej pracochłonne, zmniejsza koszty i pozwala w krótkim czasie zbadać dużą liczbę zwierząt na obecność patogenu. W przypadku wyniku dodatniego dla badanej grupy zwierząt przeprowadza się badania poszczególnych zwierząt (28).

Wiele zespołów naukowych prowadzi badania, których celem jest obniżenie strat związanych z BVD. Opracowane są nowe szczepionki, nowe programy zwalczania, jak również prowadzone są intensywne prace hodowlane. Polegają one na poszukiwaniu markerów genetycznych odpowiedzialnych za różną reakcję organizmu zwierzęcia na patogen. Uważa się, że badania związku pomiędzy głównym układem zgodności tkankowej (major histocompatibility complex – MHC), w tym bydlęcymi antygenami limfocytarnymi BoLA-DR/DQ (bovine lymphocyte antigen – BoLA), a podatnością bydła mlecznego na wirusową biegunkę bydła mogą dostarczyć ciekawych wyników.

Piśmiennictwo

1. Bolin, S.R., J.F. Ridpath: Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 1990, **51**, 703-707.

2. Houe H.: Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003, **31**, 137-143.
3. Wengler G.: Family Flaviviridae, W. R. I. B. Francki, C. M. Fauquet, D. L. Knudson, F. Brown (edit.): *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, Berlin 1991. s. 223-233.
4. Meyers G., Tautz N., Stark R., Brownlie J., Dubovi E. J., Collet M.S., Thiel H.-J.: Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 1992, **191**, 368-386.
5. Meyers G., Rümenapf T., Thiel H.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 1989, **171**, 555-567.
6. Olafson P., Maccallum A. D., Fox F. H.: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 1946, **36**, 205-213.
7. Thiel H.-J., Plegemann G.W., Moennig V.: Pestiviruses. W: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (edit.): *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996. s. 1059-1073.
8. Baker J. C.: Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, **190**, 1449-1457.
9. Barlow R.M.: Border disease virus. W: Dinter Z., Morein B. (edit.): *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier, Amsterdam 1990. s. 267-279.
10. Terpstra C., Wensvoort G.: Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.* 1998, **45**, 137-142.
11. Dahle J., Liess B., Frey H.R.: Interspecies transmission of pestiviruses: experimental infections with bovine viral diarrhoea virus in pigs and hog cholera virus in cattle, Commission of the European Communities Publication EUR10238EN. Commission of the European Communities, Luxembourg 1987. s. 195-211.
12. Doyle L.G., Heuschele W.P.: Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983, **183**, 1257-1259.
13. Rümenapf T., Unger G., Strauss J.H., Thiel H.-J.: Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 1993, **67**, 3288-3294.
14. Deng, R., Brock K.V.: Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 1992, **191**, 867-879.
15. Meyers G., Tautz N., Becher P., Thiel H.-J., Kümmerer B.M.: Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 1986, **70**, 8606-8613.
16. Tautz N., Thiel H.-J., Dubovi E.J., Meyers G.: Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 1994, **68**, 3289-3297.
17. Lackner T., Müller A., König M., Thiel H.-J., Tautz N.: Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J. Virol.* 2005, **79**, 9746-9755.
18. Fetzer C., Tews B.A., Meyers G.: The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J. Virol.* 2005, **79**, 11901-11913.
19. Krey T., Thiel H. J., Rümenapf T.: Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J. Virol.* 2005, **79**, 4191-4200.
20. Lecot S., Belouzard S., Dubuisson J., Rouillé M.: Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 2005, **79**, 10826-10829.
21. Ridpath J.F., Bendfeldt S., Neill J.D., Liebler-Tenorio E.: Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res.* 2006, **118**, 62-69.
22. Ridpath, J. E., Bolin S.R., Dubovi E.J.: Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 1994, **205**, 66-74.
23. Fulton R.W., Ridpath J.F., Saliki J.T., Briggs R.E., Confer A.W., Burchell J., Purdy C.W., Loan R.W., Duff G.C., Payton M.E.: Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* 2002, **66**, 181-190.
24. Giangaspro M., Harasawa R.: Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated from sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 2004, **66**, 323-326.
25. Ferron E., Bussetta C., Dutartre H., Canard B.: The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C Virus suggests a role for motif E in *Flaviviridae* RNA polymerases. *BMC Bioinformatics* 2005, **6**, 255.
26. Munoz-Zanzi C. A., Thurmond M.C., Hietala S.K.: Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology* 2004, **61**, 1085-1099.
27. Brackenbury L.S., Carr B.V., Stamataki Z., Prentice H., Lefevre E.A., Howard C.J., Charleston B.: Identification of a cell population that produces alpha/beta interferon in vitro and in vivo in response to noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 2005, **79**, 7738-44.
28. Letellier C., Kerkhofs P.: Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* 2003, **114**, 21-27.

Dr hab. Jolanta Oprządek, prof. nadzw., Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębku, e-mail: j.oprzadek@ighz.pl

Mykobakteriozy u psów i kotów

Rafał Sapieryński¹, Dariusz Jagielski²

z Zakładu Patomorfologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie¹ oraz Przychodni Weterynaryjnej „Białobrzaska” w Warszawie²

Zapalenie ziarniniakowe (*inflammatio granulomatosa*) jest specyficznym rodzajem zapalenia o charakterze rozplemowo-wytwórczym, w przebiegu którego ma miejsce gromadzenie się komórek pochodzenia histiocytarnego, w tym makrofagów, komórek nabłonkowych i komórek olbrzymich. Nazwa zapalenie ziarniniakowe wzięła się stąd, że nagromadzone komórki zapalne (makrofagi i ich pochodne), a także otaczające je limfocyty wytwarzają małe (średnicy 0,5–2 mm) guzkowate twory (ziarna). U psów i kotów zapalenie o charakterze

ziarniniakowym lub ropno-ziarniniakowym często przebiega z tworzeniem zmian o charakterze guzkowatym, guzowatym; niekiedy przybierają one postać płytek, wrzodów lub śączących przetok. Ogólnie zapalenia ziarniniakowe lub ropno-ziarniniakowe można podzielić na zapalenia tła zakaźnego (powodowane przez bakterie, grzyby, pasożyty) oraz niezakaźne, czyli jałowe, gdzie udziału drobnoustrojów nie udało się wykazać (1). Dodatkowo, ze względu na praktyczność, wszystkie zapalenia ziarniniakowe można ponadto podzielić na:

- zapalenia zakaźne, w których czynnik etiologiczny można wykazać badaniem histopatologicznym,
 - zapalenia zakaźne, w których czynnik etiologiczny nie jest widoczny w badaniu histopatologicznym,
 - zapalenia jałowe ze znaną przyczyną (np. ciała obce),
 - zapalenia jałowe o nieznaną przyczynę lub wynikające z mechanizmów immunologicznych (np. jałowe idiopatyczne zapalenie ziarniniakowe).
- Do pierwszej i drugiej grupy można zaliczyć zapalenia ziarniniakowe wynikające z zakażenia prątkami z rodzaju *Mycobacterium*, w wielu przypadkach bowiem drobnoustroje można wykazać bez problemu w preparatach histologicznych barwionych metodami barwienia, w innych przypadkach zastosowanie bardziej czułych metod badania (barwienie immunohistochemiczne, hodowla bakteryjna, analizy molekularne)