

DOKAZ PRIMEROV OBOLELIH ŽIVALI Z MUKOZNO BOLEZNIJO V SLOVENIJI

Vasilij Cociancich*, Tomislav Paller, Ivan Toplak

Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbčeva 60, Ljubljana, Slovenija

vasilij.cociancich@vf.uni-lj.si

Bovina virusna diareja (BVD) je zelo nalezljiva virusna bolezen goveda, ki se v pozitivni reji kaže s spektrom zelo različnih kliničnih znakov. V okuženi reji lahko le perzistentni izločevalci virusa BVD klinično zbolijo za mukozno boleznijo in potem vsi poginejo. Ugotovitev mukozne bolezni v reji je veterinarju pomemben signal, da je reja okužena. V študijo smo vključili 10 vzorcev živali, pri katerih smo, na podlagi značilnih kliničnih znakov, postavili sum na mukozno bolezen. Z metodo RT-PCR smo prisotnost nukleinske kisline virusa BVD dokazali v vseh 10 vzorcih. V nadaljevanju smo na celični kulturi iz 8 vzorcev izolirali necitopatogeni (NCPE) sev in iz 5 vzorcev NCPE in citopatogeni (CPE) par seva virusa BVD. Izolacija petih CPE sevov virusa BVD je pomembna tudi za stroko, zaradi dopolnitve nacionalne zbirke izolatov s CPE sevi in zaradi možnosti uporabe teh sevov v virus - nevtralizacijskem testu.

Ključne besede: virus bovine virusne diareje; mukozna bolezen; patologija; diagnostika; citopatski efekt

Uvod

Bovina virusna diareja (BVD) je zelo nalezljiva virusna bolezen parklarjev. Okužba z virusom BVD je v govedjih čredah pogosto prisotna, vendar je klinično zaznanih primerov malo. V naravi se pojavljata dva biotipa virusa BVD (BVDV), *citopatogeni* (CPE) in *necitopatogeni* (NCPE). NCPE sevi BVD povzročijo večino okužb živali in jih pogosto izoliramo iz različnih organov, medtem ko CPE seve BVD le redko ugotovimo, izoliramo pa jih le pri obolelih živalih s t.i. mukozno boleznijo. Pri takšni živali je skupaj z NCPE sevom izoliran še CPE sev, govorimo o t.i. paru NCPE/CPE sevov BVD pri mukozni bolezni (1).

Okužba goveda z virusom BVD povzroča tri oblike bolezni, ki imajo zelo širok spekter kliničnih znakov, od zelo blagih, neznanih, pa do zelo težkih oblik bolezni, ki se končajo s smrtjo obolele živali.

Kongenitalna oblika je posledica okužbe ploda z NCPE sevom virusa BVD v prvi tretjini brejosti, ko plod še nima razvitega imunskega sistema. Teleta, ki preživijo to okužbo, se rodijo kot perzistentni izločevalci (PI) virusa BVD. Takšna teleta so navidezno zdrava ali pa zaostajajo v rasti za vrstniki. Največkrat poginejo v prvih tednih po porodu in redko dosežejo spolno zrelost. PI so do smrti stalni izločevalci virusa BVD in glavni vir okužbe za neokužene živali.

Akutna oblika BVD je posledica okužbe dovzetne živali kdajkoli po rojstvu z NCPE ali CPE sevom BVD. Viremija traja od 3 do 10 dni, potem pa žival pridobi specifična protitelesa in virusa pri oboleli živali več ne ugotovimo. Klinično se v okuženi reji kaže z enterično in respiratorno obliko največkrat pri teletih, ob prvem vnosu virusa v rejo

pa zbolijo vse starostne skupine. Pri brejih živalih so zaznavne reprodukcijske motnje in različne anomalije v razvoju plodu. Mukozna bolezen je posledica okužbe PI živali z CPE sevom BVD. Ta v večini primerov nastane v PI z delecijo, insercijo ali točkovno mutacijo v delu genoma NCPE virusa, kar povzroči nastanek še CPE seva. Klinično obolela žival z mukozno boleznijo ima v krvi CPE in NCPE par virusa BVD (2). V okuženi reji le PI zbolijo za mukozno boleznijo in vsi poginejo. Vsekakor je klinični pojav mukozne bolezni izkušenemu veterinarju pomemben signal, da je reja okužena z virusom BVD. Prisotnost mukozne bolezni pri oboleli živali laboratorijsko zanesljivo potrdimo z izolacijo CPE virusa BVD na celični kulturi. Laboratorijska potrditev, da je žival poginila za mukozno boleznijo za rejca ali veterinarja nima velikega praktičnega pomena, zato se diagnostika običajno konča že z dokazom prisotnosti virusa BVD. Izolacija CPE sevov BVD je zahtevna in draga, s stališča laboratorija pa so CPE sevi zanimivi zaradi ugotavljanja genetske osnove, ki določa nastanek citopatogenosti, pa tudi za potrebe virus - nevtralizacijskega testa v primeru študij ugotavljanja protiteles, saj so titri specifičnih protiteles ugotovljeni s homolognimi sevi BVD višji.

Materiali in metode

Med leti 2006 in 2016 smo na podlagi opisa klinične slike 10 obolelih živali s sumom na mukozno bolezen s strani veterinarja ali patologa, zbrali vzorce serumov (5 živali) in vzorce organov (5 živali). Pri raztelesbi 5 poginjenih živalih smo natančno zabeležili patoanatomske spremembe in odvzeli vzorce (vranica, bezgavke) za virološke preiskave.

Za dokaz prisotnosti virusa BVD smo iz vzorcev organov najprej pripravili 10% suspenzijo v RPMI 1640 (Gibco). Nukleinsko kislino smo iz 10 vzorcev izolirali s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca in prisotnost nukleinske kisline virusa BVD dokazovali z metodo RT-PCR (3).

Izolacijo virusa BVD smo izvajali na primarni celični kulturi turbinalnih celic (TB) po standardnem postopku izolacije. Na kratko: Izolacijo smo izvajali v mikroploščah s 96 jamicami. Na dan star sloj celic TB smo nanесли po 100 µl preiskovanega vzorca (serum ali suspenzijo organov) v dve jamici/vzorec in naredili dvakratne razredčitve do konca jamic po mikroplošči. Za pozitivno kontrolo smo uporabili CPE sev NADL, za negativno kontrolo nam je služil sloj neinokuliranih celic TB. Mikroplošče smo inkubirali smo 5 – 7 dni v inkubatorju pri 37 °C in 5% CO₂ ter dnevno pod mikroskopom spremljali stanje celic in pojav CPE v jamicah. Opravili smo dve pasaži in nato mikroplošče fiksirali s 85% acetonom (4). Pomnoževanje virusov BVD smo dokazovali s peroksidaznim testom, z uporabo monoklonskih protiteles WB 103/105 (APHA, Weybridge, Velika Britanija) in konjugiranih anti-mišjih protiteles P260 (Dako).

Rezultati

Starost oboleli živali s sumom na mukozno bolezen je bila od 4 do 29 mesecev. Pri raztelesbi smo ugotovili patološke spremembe, ki so značilne za mukozno bolezen: močna polnokrvnost, krvavitve in erozije v ustni votlini in na smrčku, diseminiran erozivni gastroenteritis, pikčaste krvavitve in sufuzije pod serozami, črevesna vsebina je bila redka, krvava, sluzasta in izrazito neprijetnega vonja.

Z metodo RT-PCR smo v vzorcih vseh 10 živali dokazali produkt velikosti 300 baznih parov, kar potrjuje prisotnost nukleinske kisline virusa BVD v vzorcih vseh 10 obolelih živali.

V izolaciji virusa na celični kulturi TB smo pri 8 živalih izolirali NCPE virus in v 5 vzorcih

par CPE/NCPE virusa BVD. Pri NCPE virusih smo v peroksidaznem testu dobili jasno rdeče obarvano citoplazmo, jedra pa so bila svetla. Vse CPE viruse BVD smo zaznali že v prvi ali drugi pasaži, po 48 do 120 urah po inokulaciji, v jamicah prvih 4 razredčitev pa je sloj celic kazal 100% CPE. Pri naslednji pasaži smo ugotovili CPE v večini inokuliranih jamic. Ostanki celic po nastalem CPE so se v peroksidaznem testu obarvali rdeče.

Razprava

Mukozna bolezen je redko laboratorijsko potrjena klinična slika na terenu, ki pa jo veterinarji praktiki v povezavi z BVD okužbami govejih čred pri nas že dobro prepoznajo. Dokaz prisotnosti virusa z metodo RT-PCR je gotovo dovolj, da po postavitvi suma na mukozno bolezen potrdimo vzrok obolenja. Redko pa gremo v laboratoriju z diagnostiko še naprej in poskušamo z izolacijo CPE virusa BVD, ki je neposreden dokaz, da je žival zbolela z mukozno boleznijo. CPE seve BVD namreč ugotovimo samo pri živalih, ki so klinično obbolele z znaki mukozne bolezni. Izolacija virusa je v primerjavi z molekularno metodo RT-PCR manj občutljiva, saj pri izolaciji dokazujemo infektivnost virusa, ki pa je lahko prizadeta zaradi starosti trupla in časa, ki poteče od pogina do prinosa vzorca v laboratorij. Zato je izolacija virusa BVD iz 8 od 10 preiskovanih vzorcev pričakovan rezultat, ki potrjuje višjo občutljivost metode RT-PCR. Uspešna izolacija CPE seva pri 5 od 10 vzorcev s sumom na mukozno bolezen pa je prav tako dober rezultat, ki potrjuje predhodne ugotovitve avtorjev (1, 2). Izolacija CPE sevov je zanimiva tudi za stroko zaradi dopolnitve naše nacionalne zbirke izolatov BVD, s stališča znanosti pa zaradi genetske podlage, ki je odgovorna za spremembo seva iz NCPE v CPE sev virusa BVD. Tega v izvedeni študiji nismo ugotavljali, z metodo naslednje generacije sekvenciranja (NGS) pa bi lahko s primerjavo NCPE in CPE sevov ugotovili tudi spremembo v genomu, ki je odgovorna za nastanek naših CPE sevov. Izolirani CPE sevi BVD bodo lahko v prihodnje uporabljeni tudi v laboratorijski diagnostiki pri izvedbi virus-nevtralizacijskih testov kot terenski sevi za dokazovanje protiteles proti virusu BVD.

Reference

1. Brownlie J Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 1984; 114: 535-6.
2. Brownlie J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *J Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1990; 9: 43-59.
3. Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Mrkun J. The usefulness of two molecular methods for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhea using oral swab samples. *Slov Vet Res* 2015; 52: 23-30.
4. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi: doktorska disertacija. 2004.

Detection of animals with mucosal disease in Slovenia

Bovine viral diarrhoea (BVD) is a highly contagious viral disease of cattle that shows a very different spectrum of clinical signs in positive herds. In the infected herd only persistently infected animals can present clinical signs of mucosal disease and then all die. Finding of animal with mucosal disease in a herd is an important sign for vet that

herd is infected with BVD. In this study we have included 10 samples of animals which were selected with typical clinical signs, suspicious for mucosal disease. The presence of nucleic acid of BVD virus was demonstrated by RT-PCR in all 10 samples. Below we have isolated noncytopathic strain (NCPE) on cell culture from 8 samples and from 5 samples NCPE and cytopathic (CPE) BVD virus pair. Isolation of five CPE strains of BVD virus is also important for the profession, in order to supplement the national collection of isolates with CPE strains and for the possible use of these strains in the virus - neutralization test.

Key words: bovine viral diarrhea virus; mucosal disease; pathology; diagnosis; cytopathic effect