

Przypadki nerwowej postaci nosówki u szczepionych psów – czy można mówić o nowym wariantcie wirusa?

Łukasz Adaszek, Jacek Kutrzuba, Marcin Kalinowski, Marcin Garbal, Stanisław Winiarczyk

z Katedry Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Nosówka psów (*febris catarrhalis infectiosa canum*) jest wysoce zaraźliwą, ogólnoustrojową, gorączkową chorobą wirusową, przebiegającą z objawami niezytu błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego, którym towarzyszą komplikacje neurologiczne i wtórne zakażenia układu oddechowego (1). Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus nosówki (canine distemper virus – CDV), należący do rodzaju *Morbilivirus* znajdującego się w obrębie rodziny *Paramyxoviridae*. Wykazuje on szerokie spektrum zakażeń dla wielu gatunków zwierząt mięsożernych i może przyczynić się do znacznej depopulacji niektórych z nich (2). Materiał genetyczny CDV stanowi pojedyncza nić RNA o wielkości

około 15,616 nukleotydów. W obrębie genomu zlokalizowanych jest sześć genów kodujących: białko osłonki (M), dwie glikoproteiny (hemaglutynina-H oraz białko fuzyjne F), dwa białka biorące udział w replikacji (fosfoproteina P i białko L) oraz białko nukleokapsydu-N (3). Porównując sekwencje poszczególnych genów kodujących białka CDV, wykazano, że najczęściej różnice pomiędzy referencyjnymi szczepami i izolatami wirusa nosówki wykazywane są w obrębie genów hemaglutyniny, białka fuzyjnego F oraz nukleoproteiny. Przypuszcza się, że mutacje powstające w obrębie tych genów mogą być przyczyną zmian w zjadliwości wirusa prowadzących do występowania nosówki, zwłaszcza u psów, mimo powszechnie

prowadzonego programu szczepień profilaktycznych tych zwierząt na świecie (4).

Nukleoproteina jest białkiem strukturalnym wirusa, które decyduje o jego trwałości. Reguluje ona i wpływa na tempo procesów transkrypcji i replikacji (5) oraz odgrywa ważną rolę w powstawaniu przewlekłych zakażeń ośrodkowego układu nerwowego. Zbudowana jest z dwóch domen: większej – wysoce konserwatywnej N-terminalnej oraz zmiennej, C-terminalnej (6). Ponieważ białko to usytuowane jest wewnątrz wirusa, tym samym jest ono w małym stopniu narażone na działanie zewnętrznych czynników mutagenicznych i jako względnie konserwatywne wykorzystywane jest najczęściej jako marker diagnostyczny zakażeń wirusem nosówki u zwierząt (7).

Hemaglutynina jest powierzchniową glikoproteiną wirusa nosówki o długości 8–12 nm i masie cząsteczkowej 76 kDa. Odpowiada ona za przyłączenie się wirusa do odpowiedniego receptora znajdującego się na powierzchni komórki, a także bierze udział w aglutynacji erytrocytów ssaków, nie posiada natomiast właściwości neuraminidazowych, jak u wirusów z rodzaju *Parainfluenza*. Indukuje natomiast powstawanie w organizmie zakażonych zwierząt przeciwciał anty CDV. Z racji swej

Cases of nervous distemper in vaccinated dogs – emerging new variant of distemper virus?

Adaszek Ł., Kutrzuba J., Kalinowski M., Garbal M., Winiarczyk S., Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The purpose of this paper was to present results of the study performed on canine distemper virus (CDV) isolates from cases of nervous form of disease, recognized in vaccinated dogs. The animals were presented to our clinic with neurological signs and attempts have been made to isolate CDV genetic material either from blood or from the brain during autopsy. We have focused on the analysis of nucleoprotein and hemagglutinin genes. Sequencing analysis has revealed essential homology between the own isolates of CDV, whereas considerably low similarity has been found between studied strains and CDV from gene bank. This may indicate that new variants of CDV have emerged and are responsible for the nervous distemper. It reveals therefore, that vaccines on the market do not cross-protect dogs against these new variants of CDV. Effective control of distemper in carnivores requires constant monitoring of the virus on the molecular level. Newly identified variants of CDV should be considered as candidates for updating the composition of vaccines.

Keywords: canine distemper virus, nervous form of distemper, NP-gene, H-gene sequencing.

lokalizacji białko to narażone jest w większym stopniu na działanie czynników mutagennych niż nukleoproteina, co z kolei wpływa na jego dużą zmienność, u podstawy której leżą zmiany w sekwencji nukleotydowej genu kodującego H (8).

Oba geny wykorzystywane są w badaniach nad zmiennością CDV. Zmiany w ich sekwencjach nukleotydowych lub zmiany w sekwencjach aminokwasowych, powstałych na ich matrycy białek, umożliwiają wykazanie nowych szczepów wirusa, które mogą różnić się od dotychczas stwierdzanych szczepów szczepionkowych, jak i terenowych CDV.

Obserwacje własne

W 2011 r. w Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie stwierdzono pięć przypadków nerwowej postaci nosówki u młodych psów w wieku 5 do 9 miesięcy. Wszystkie zwierzęta poddawane były pełnemu cyklowi szczepień przeciwko tej chorobie w 6, 9 i 12 tygodniu życia. Przed pierwszym szczepieniem wszystkie psy zostały przebadane w kierunku nosówki (RT-PCR); wynik był ujemny. W trzech przypadkach

choroba rozwinęła się po około 2 miesiącach po przeprowadzeniu ostatniego szczepienia, w jednym po 3, a także w jednym przypadku po upływie 6 miesięcy od ostatniej wakcynacji. W dwóch przypadkach objawy nerwowe poprzedzone były łagodnym niezłym górnych dróg oddechowych. W pozostałych trzech objawy nerwowe były jedynymi obserwowanymi nieprawidłowościami. Obejmowały one: trudności w poruszaniu się, porażenie kończyn miednicznych, sztywność karku, nierównomierne rozszerzenie źrenic, ślepotę, napady padaczkowe, wokalizację oraz przeculicę skóry. W wywiadzie ustalono, że żaden z psów nie został pokąsany (co było podstawą do wykluczenia wścieklizny), nie miał kontaktu z chemikaliami oraz substancjami trującymi, nie uległ też wypadkowi. Badaniem PCR wykluczono takie jednostki chorobowe, jak erlichioza, anaplazmoza, borelioza i toksoplazmoza, potwierdzono natomiast obecność we krwi chorych osobników materiału genetycznego CDV. W trzech przypadkach właściciele zdecydowali się na eutanazję zwierząt; pozostałe dwa psy są pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną, otrzymują leki przeciwdrgawkowe, pozwalające na w miarę prawidłowe funkcjonowanie tych zwierząt.

Od psów poddanych eutanazji pobrano wycinki mózgu do badań molekularnych, które potwierdziły obecność w tym materiale RNA CDV. Uzyskane w badaniach PCR fragmenty genów H i NP CDV z mózgu i krwi poddano sekwencjonowaniu, a uzyskane sekwencje porównano z odpowiadającymi im sekwencjami światowych izolatów wirusa nosówki dostępnymi w banku genów. Sekwencje własne genu nukleoproteiny porównywano z sekwencjami NP CDV umieszczonymi pod numerami: AF 164967 ze Szwajcarii, AJ 009656 z Niemiec, AY 443350 ze Stanów Zjednoczonych, DQ 435615 z Tajwanu oraz EF 375619 z Chin oraz z sekwencjami uzyskanymi z izolatów wirusa nosówki wykrytego we wcześniejszych badaniach własnych u lisów, norek i psów (9), natomiast sekwencje genu hemagglutyniny porównywano z sekwencjami fragmentu genu H uzyskanego ze szczepionek zawierających szczep Onderstepoort (Vanguard i Canivac) oraz z sekwencjami izolatów CDV umieszczonych w banku genów pochodzących z terenów Danii Z47761, Niemiec Z77673, Z77671, Turcji AY093674, Włoch DQ228166, Japonii AB040766, Tajwanu AY378091, USA AY466011 i Grenlandii Z47760 oraz z sekwencjami uzyskanymi z izolatów wirusa nosówki wykrytego we wcześniejszych badaniach własnych u lisów i psów (10).

Analiza sekwencji genu nukleoproteiny, jak i hemagglutyniny badanych izolatów

CDV pozwoliła na stwierdzenie ich 100% homologii z wykazanymi we wcześniejszych badaniach sekwencjami H i NP odmian polimorficznych nr 1 CDV izolowanego na terenie Polski (9,10).

Porównanie uzyskanych w badaniach własnych sekwencji fragmentu genu NP z sekwencjami izolatów ze Szwajcarii, z Niemiec, ze Stanów Zjednoczonych, z Tajwanu oraz Chin, wykazało podobieństwo pomiędzy badanymi izolatami na poziomie 96,6–97,6%. Podstawienia nukleotydów w określonych pozycjach genu NP porównywanych izolatów przedstawiono w **tabeli 1**.

Stwierdzono bliskie pokrewieństwo sekwencji NP izolatów własnych wirusa z sekwencją EF 375619 CDV izolowanego od psów z terenów Chin. Obecnie trudno określić, jaki ma to wpływ na patogenezę choroby i zjadliwość wirusa, niemniej jednak dane te mogą być istotne z punktu widzenia epidemiologii nosówki i wskazują na fakt pojawienia się w populacji psów w Polsce nowej odmiany wirusa, blisko spokrewnionej z linią azjatycką CDV.

W celu określenia stopnia podobieństwa molekularnego genu H CDV izolatów własnych z sekwencjami izolatów światowych porównywano komputerowo sekwencje omawianego genu, uzyskane w badaniach własnych, z sekwencjami fragmentu genu H uzyskanymi z banku genów. Wyniki tej analizy pozwalają stwierdzić niewielkie podobieństwo genu hemagglutyniny rodzimych szczepów wirusa nosówki ze szczepami światowymi i szczepionkowymi CDV, co przedstawiono w **tabeli 2**.

Omówienie

Zmiany w sekwencji nukleotydowej genów H i NP u przedstawicieli rodzimych szczepów CDV mogą wskazywać na pojawienie się nowych odmian wirusa nosówki na terenie Polski. Opisany dryft genetyczny może prowadzić w konsekwencji do zmian cech wirusa CDV i wpływać na epidemiologię zakażeń przez niego wywołanych.

Simon-Martinez i wsp. (4) dokonali analizy molekularnej genu NP wirusów CDV wyizolowanych od dwóch chorych psów w Meksyku. Zwierzęta, mimo że były poddawane szczepieniu przeciwko nosówce, uległy zakażeniu CDV. Rozpoznanie zakażenia potwierdzano za pomocą techniki RT-PCR. Amplifikacja fragmentu genu nukleoproteiny wirusa nosówki i następnie jego sekwencjonowanie pozwoliły wykazać w obu przypadkach zakażenie tym samym szczepem CDV (100% homologia sekwencji), który znacznie różnił się sekwencją nukleotydową od szczepu szczepionkowego i szczepów CDV dotychczas izolowanych na terenie Meksyku. Wykazywał on natomiast wysokie podobieństwo

Tabela 1. Różnice w sekwencji nukleotydowej genu nukleoproteiny wykazane pomiędzy izolatami światowymi CDV a izolatami wirusa uzyskanymi w badaniach własnych

Nazwa szczepu	Podstawienie	Pozycja
AF 164967 Szwajcaria	G→A	57
	T→C	78
	C→T	132
	G→A	143
	C→T	159
	G→A	237
	T→C	261
	C→T	288
AJ 009656 Niemcy	G→A	57
	T→C	78
	G→A	84
	C→T	132
	G→A	143
	C→T	159
	C→T	168
	G→A	237
AY 443350 USA	G→A	57
	T→C	78
	C→T	132
	G→A	143
	C→T	159
	G→A	237
	T→C	261
	C→T	288
DQ 435615 Tajwan	G→A	57
	T→C	78
	C→T	132
	C→T	159
	C→T	188
	Delecja G	263
	C→G	264
	EF 375619 Chiny	G→A
A→G		9
C→T		21
A→G		172
G→T		230
G→A		243
A→G		275
Izolaty własne CDV		-

ze szczepami izolowanymi na terenach Stanów Zjednoczonych i Niemiec. Całość obserwacji, podobnie jak w badaniach własnych, wskazuje na fakt pojawienia się nowej linii wirusa CDV na terenie Meksyku.

Podobnie, opierając się jedynie o sekwencję genu nukleoproteiny CDV, Yoshida i wsp. (12) wykazali nową terenową odmianę wirusa nosówki na obszarze Japonii, która w stosunku do szczepu laboratoryjnego Onderstepoort wykazywała podobieństwo rzędu zaledwie 93,2%.

Z kolei polimorfizm genu hemaglutyniny badali Haas i wsp. (8, 12). Autorzy przeprowadzali doświadczenia na 3 szczepach wirusa wyizolowanych od psów z okolic Berlina i Hamburga. Posługując się metodą RT – PCR, wyizolowali oni cały gen H, który analizowano i porównywano z genem

Tabela 2. Różnice w sekwencji nukleotydowej genu hemaglutyniny wykazane pomiędzy izolatami światowymi CDV a izolatami wirusa uzyskanymi w badaniach własnych

Nazwa szczepu	Podstawienie	Pozycja	Nazwa szczepu	Podstawienie	Pozycja	
Szczep szczepionkowy (Vanguard)	C→T	107	DQ 228166 Włochy cd.	A→T	109	
	T→A	135		A→G	129	
Szczep szczepionkowy (Canivac)	T→C	35		T→A	134	
	T→C	53		C→A	147	
	G→A	86		C→T	182	
	A→T	89		T→C	184	
	delecja C	107		AB 040766 Japonia	A→G	47
	insercja T	109			G→A	86
	C→T	115	T→C		110	
	C→T	133	T→A		134	
T→C	134	A→G	165			
insercja A	136	A→T	170			
G→C	177	C→A	174			
A→G	181	A→G	185			
Z 47761 Dania	A→C	47	A→G	188		
	C→A	147	AY 378091Tajwan	C→A	95	
	G→A	150		T→A	134	
G→A	150	G→A		138		
Z 77673 Niemcy	G→A	98	AY 466011 USA	A→G	14	
	C→A	147		T→C	53	
	G→A	150		T→C	67	
Z 77671 Niemcy	T→C	69		T→C	72	
	G→A	98		A→T	89	
	T→C	139		C→T	114	
	C→A	147		T→A	134	
	G→A	150		C→T	135	
	G→A	150	G→T	159		
AY 093674 Turcja	G→C	84	G→A	171		
	A→G	85	C→A	183		
	G→A	86	Z 47760 Grenlandia	C→T	17	
	A→G	88		A→C	47	
	G→C	90		C→T	58	
C→A	147	A→G		80		
G→C	150	T→A		134		
DQ 228166 Włochy	G→A	38		Izolaty własne CDV	-	-
	T→C	53				
	C→T	95				
	G→A	98				

H szczepu Synder Hill. Translacja uzyskanej sekwencji nukleotydowej na białko pozwoliła uzyskać 607-aminokwasową sekwencję. Jej porównanie z analogicznymi sekwencjami zawartymi w GenBank pokazało, że o ile sekwencje izolatów własnych, uzyskanych od psów niemieckich, wykazywały wysoki stopień wzajemnej homologii (>99%), o tyle ich zgodność z sekwencjami szczepów szczepionkowych wynosiła zaledwie 90–91%. Autorzy ci wykazali ponadto 4 dodatkowe miejsca glikozylacji w sekwencjach izolatów niemieckich w porównaniu ze szczepem Onderstepoort i 1 w porównaniu ze szczepem Canvac. Zestawienie badanych sekwencji umożliwiło stworzenie drzewa filogenetycznego. Analiza drzewa pozwoliła na wyraźne rozgraniczenie światowych linii wirusa (europejska, amerykańska oraz arktyczna) od szczepów szczepionkowych.

Badania polimorfizmu genu *H* CDV w populacji psów we Włoszech wykazały wysokiego stopnia homologię (99%) pomiędzy terenowymi izolatami wirusa a innymi izolatami europejskimi (13). Jednak

wśród przebadanych szczepów CDV wykazano także izolaty należące do linii arktycznej, a ponadto stwierdzono, że w niektórych przypadkach nosówka wywołana jest przez szczepy wirusa uznane za niewystępujące już w przyrodzie, takie jak np. szczepy szczepionkowe Onderstepoort, co może wskazywać na ich ponowne uzjadliwienie się.

Z kolei Demeter i wsp. (14) wyróżnili na Węgrzech dwie linie wirusa: arktyczną i europejską. Kryterium zaszeregowania wirusów do każdej z tych linii były różnice struktury genu hemaglutyniny. Coraz częstsze występowanie różnych genotypów wirusa na tak małym terytorium tłumaczone jest niekontrolowanymi ruchami dzikich zwierząt, brakiem barier geograficznych, a także importem psów z różnych regionów świata.

Calderon i wsp. (15) prowadzili badania nad polimorfizmem genu *H* CDV na terenie Argentyny. Przeprowadzona przez nich analiza wykazała istnienie w Argentynie oddzielnej linii wirusa nosówki, różniącej się od obecnie znanych, a także istnienie

w jej obrębie 2 genotypów według twierdzenia Mochizuki i wsp. (16), że jeśli podobieństwo sekwencji aminokwasów jest mniejsze niż 95%, to mamy do czynienia z oddzielnym genotypem.

Reasumując, należy stwierdzić, że wszystkie przeprowadzone do tej pory badania nadal nie dały jasnej odpowiedzi, czy występowanie nosówki u psów wcześniej zaszczepionych spowodowane jest zmianami zachodzącymi w genach NP i H, czy może innym czynnikiem. Niewątpliwie, pojawiające się nowe szczepy wirusów nosówki charakteryzują się nieco odmienną budową antygenową od szczepów szczepionkowych. Brak aktualizacji składu immunopreparatów w nowe warianty wirusa nie pozostaje bez wpływu na ich skuteczność. Kontrola występowania nosówki u zwierząt mięsożernych wymaga stałego monitoringu molekularnego CDV, który pozwala wykrywać i identyfikować nowe terenowe odmiany patogena i aktualizować skład szczepionek.

Piśmiennictwo

- Appel M.J.G.: Canine distemper virus. W: *Virus Infections of Carnivores*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1987, 133-159.
- Myers D.L., Zurbriggen A., Lutz M., Pospischil A.: Distemper: not a new disease in lions and tigers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997, **4**, 180-184.
- Sidhu M.S., Husar W., Cook S.D., Dowling P.C., Udem S.A.: Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology* 1993, **193**, 66-72.
- Simon-Martinez J., Ulloa-Arvizu R., Soriano V.E., Fajardo R.: Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet. J.* 2008, **175**, 423-426.
- Scagliarini A., Battilani M., Ciulli S., Prosperi S., Morganti L.: Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. *Vet. Res. Commun.* 2003, **27**, 355-357.
- Rzeżutka A., Mizak B.: Występowanie wirusa nosówki w limfocytach i tkankach psów zakażonych doświadczalnie. *Medycyna Wet.* 2004, **60**, 1287-1290.
- Winiarczyk S., Adaszek Ł., Dziduszko A., Grądzki Z., Madany J., Skrzypczak M.: Zastosowanie reakcji PCR w diagnostyce nosówki psów. *Medycyna Wet.* 2006, **62**, 840-842.
- Haas L.: Molecular epidemiology of animal virus diseases. *J. Vet. Med.* 1997, **44**, 257-272.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., Maj J., Jankowski Ł., Ziętek-Barsz A., Skrzypczak M.: Molecular analysis of the nucleoprotein gene of canine distemper virus isolated from clinical cases of the disease in foxes, minks and dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, **12**, 433-437.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., Jankowski Ł., Maj J., Ziętek J.: Analiza molekularna genu hemaglutyniny wirusa nosówki izolowanego z klinicznych przypadków choroby od lisów i psów. *Medycyna Wet.* 2009, **65**, 475-479.
- Yoshida E., Iwatsuki K., Miyashita N., Gemma T., Kai C., Mikami T.: Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Vet. Microbiol.* 1998, **59**, 237-244.
- Haas L., Martens W., Greiser – Wilke I., Mamaev L., Butina T., Maack D., Barret T.: Analysis of the hemagglutinin gene of current wild – type canine distemper virus isolates from Germany. *Vir. Res.* 1997, **48**, 165-171.
- Martella V., Cirone F., Elia G., Lorusso E., Decaro N., Campolo M., Desario C., Lucente M.S., Bellacicco A.L., Blixenkronne – Moller M., Carmichael L.E., Buonavoglia C.: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 2006, **116**, 301-309.
- Demeter Z., Lakatos B., Palade E.A., Kozma T., Forgách P., Rusvai M.: Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 2007, **122**, 258-269.
- Calderon M.G., Remorini P., Periolo O., Iglesias M., Mattion N., La Torre J.: Detection by RT – PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non – vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 2007, **125**, 341-349.
- Mochizuki M., Hashimoto M., Hagiwara S., Yoshida Y., Ishiguro S.: Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 2936-2942.

Dr Łukasz Adaszek, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin,
e-mail: ukaszek0@wp.pl