

**UTVRĐIVANJE PRISUSTVA ANTITELA PROTIV GOVEĐEG
RESPIRATORNOG SINCICIJALNOG VIRUSA (BRSV), VIRUSA
PARAINFLUENCE 3 (PI3) I GOVEĐEG HERPESVIRUSA 1
(BHV 1) U KRVNOM SERUMU JUNADI PRIMENOM
INDIREKTNE IMUNOENZIMSKE PROBE***
*ESTABLISHING PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST BOVINE
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV), PARAINFLUENZA VIRUS 3
(PI3) AND BOVINE HERPESVIRUS 1 (BHV 1) IN BLOOD SERUM OF
CATTLE USING INDIRECT IMMUNOENZYME PROBE*

H. Šamanc, N. Milić, V. Stojić, D. Knežević, I. Vujanac, B. Dimitrijević,
J. Nišavić, Marina Radojičić**

Ukupno je ispitano 92 uzorka krvnog seruma junadi na prisustvo antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa primenom indirektno imunoenzimske probe – iELISA. Kod 46, odnosno 50% uzoraka krvnog seruma ustanovljena su specifična antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV). Ispitivanjem 92 uzorka krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv virusa parainfluence 3 (PI 3) ustanovljeno je njihovo prisustvo kod 77, odnosno 83,69% uzoraka, a prisustvo antitela protiv goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1) ustanovljeno je kod 19, odnosno 20,65% uzoraka.

Ključne reči: goveđi respiratorni sincicijalni virus, virus parainfluence 3, goveđi herpesvirus 1, iELISA

Uvod / Introduction

Goveđi herpesvirus 1 (BHV1), virus parainfluence 3 (PI3), goveđi respiratorni sincicijalni virus (BRSV) i virus goveđe virusne dijareje (BVDV) su

* Rad primljen za štampu 22. 12. 2008. godine

** Dr sci. med. vet. Horea Šamanc, red. profesor, dr sci. med. vet. Nenad Milić, red. profesor, dr sci. med. vet. Velibor Stojić, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Dejan Knežević, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd; mr sci. med. vet. Ivan Vujanac, asistent, Blagoje Dimitrijević, dr vet. med., dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, asistent; dr sci. med. vet. Marina Radojičić, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

najčešći uzročnici respiratornih infekcija goveda koje se komplikuju infekcijama bakterijske etiologije što dovodi do pojave opsežnih bronhopneumonija (Mihajlović, 1987). Enzootska bronhopneumonija, koja se prvenstveno javlja kod mlađih kategorija (teladi i junadi u tovu), prouzrokuje značajne ekonomske gubitke u ovoj grani stočarske proizvodnje (Nardelli, 1999).

Goveđi respiratorni sincicijalni virus (BRSV) pripada rodu *Pneumovirus*, podfamiliji *Paramyxovirinae* familije *Paramyxoviridae*. Navedeni virus poseduje molekul jednolančane RNK i ima nepravilan oblik viriona koji varira od skoro potpuno sferičnog do filamentoznog sa prečnikom od 150 do 300nm (Quinting, 2007). Infekcija izazvana goveđim respiratornim sincicijalnim virusom (BRSV) ustanovljena je kod svih starosnih kategorija goveda, ali se oboljenje najčešće pojavljuje kod junadi mlađe od 18 meseci i teladi u uzrastu od 10 dana do nekoliko meseci (Quinting, 2007). Goveđi respiratorni sincicijalni virus je, osim kod goveda, izolovan i kod ovaca i koza. U cilju dobijanja jasnije slike o značaju BRSV u etiopatogenezi respiratornog sindroma goveda, neophodno je da se za njegovu identifikaciju koriste i druge imunološke metode kao npr. metoda imunofluorescencije, pored drugih seroloških i imunocitohemijskih testova (Quinting, 2007).

Virus parainfluence 3 pripada rodu *Respirovirus*, podfamiliji *Paramyxovirinae* i familiji *Paramyxoviridae*. Virus poseduje molekul jednolančane RNK. Molekul nukleinske kiseline je smešten u nukleokapsidu ikosaedrične simetrije koga obavija spoljašnji omotač virusa – peplos. Virus parainfluence 3 izaziva respiratorne infekcije goveda, ovaca, konja i ljudi. Primarni izvor infekcije virusom parainfluence 3 (PI3) su obolele životinje koje putem sekreta iz respiratornog sistema prenose infekciju na zdrave, prijemčive jединke. Obolele životinje imaju povišenu telesnu temperaturu, dispneju, pojačano suzenje i serozni iscedak iz nosa. Pomenuti simptomi bolesti najčešće traju tri do četiri dana posle čega se infekcija završava prezdavljenjem i potpunim oporavkom obolele jединke. U nekim slučajevima dolazi do pojave komplikacija bakterijske etiologije koje se manifestuju u vidu teških bronhopneumonija sa letalnim ishodom. U cilju detekcije prisustva virusa PI3 u ispitivanom materijalu, u laboratorijskim uslovima, koriste se testovi hemaglutinacije, inhibicije hemaglutinacije, ELISA-test, test imunofluorescencije i drugi (Vainionpaa, 1994).

Goveđi herpesvirus 1 (BHV1) pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Virusi koji pripadaju familiji *Herpesviridae* su okruglastog oblika sa dvolančanim molekulom DNK koja se nalazi u kapsidu ikosaedrične simetrije sačinjenom od 162 kapsomere. Kapsomere su većinom građene u vidu izdužene heksagonalne prizme sa cilindričnom šupljinom u centralnom delu. Herpesvirusi imaju spoljašnji omotač (peplos). Infekcija goveda izazvana herpesvirusom 1 pojavljuje se u više kliničkih oblika kao što su infektivni bovini rinotraheitis, konjunktivitis i oboljenje genitalnih organa praćeno pojavom osipa i zapaljenjem sluznice vulve i vagine krava, odnosno balanopostitis kod bikova (Takiuchi, 2005). Posle preboljenja infektivnog rinotraheitisa i pustuloznog vulvovaginitisa goveda, herpesvirus se zadržava u organizmu i najčešće perzistira

u trigeminalnim ili sakralnim ganglijskim ćelijama, latentno prisutan, odnosno kao neproduktivna infekcija (Riegel, 1987).

Rezultati dobijeni u ispitivanjima prisustva infekcije goveda izazvane virusom BRSV na teritoriji Republike Srbije koji se odnose na izolaciju uzročnika iz respiratornog sistema goveda sa respiratornim sindromom i njegovu identifikaciju primenom metoda imunofluorescencije i virus-serum neutralizacije, kao i rezultati seroloških ispitivanja uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa BRSV, potvrđuju da pomenuti virus ima sve veći značaj u patogenezi respiratornih infekcija goveda u našoj zemlji. Iz navedenih razloga, vršena su ispitivanja uzoraka krvnog seruma goveda sa različitih lokacija na teritoriji Republike Srbije na prisustvo antitela kako protiv govedeg herpesvirusa 1 (BHV1) i virusa parainfluence 3 (PI3), tako i protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV). Ispitivanja su vršena primenom indirektnog imunoenzimskog testa – iELISA, kao veoma osetljive serološke metode radi brzog otkrivanja inficiranih jedinki, što je preduslov za uspešno sprovođenje mera imunoprofilakse navedenih virusnih infekcija goveda i drugih preventivnih mera vezanih za sprečavanje njihove pojave i širenja.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Materijal / *Materials*

Uzorci krvnog seruma goveda / Samples of bovine blood serum

Uzorci krvnog seruma nevakcinisanih junadi prikupljeni su iz devet to-vilišta na teritoriji Republike Srbije.

Dijagnostički komercijalni kitovi za izvođenje imunoenzimske probe – iELISA / Diagnostic commercial kits for performing immunoenzyme probe – iELISA

Za izvođenje imunoenzimske probe – iELISA, korišćena su tri komercijalna dijagnostička antigenska kita proizvođača SVANOVA Biotech AB, Uppsala, Švedska:

1. Za ispitivanje uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV) – Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV-Ab) SVANOVIR (Article number 10-2500-02);
2. Za ispitivanje uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv virusa parainfluence tip 3 (PI 3) – Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (PIV3-Ab) SVANOVIR (Article number 10-2600-02);
3. Za ispitivanje uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv govedeg herpesvirusa 1 (BHV 1) - Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR-Ab) SVANOVIR (Article number 10-2100-50);

Metode / *Methods*

Imunoenzimskom probom – iELISA, uz korišćenje tri dijagnostička komercijalna kita i po proceduri izvođenja propisanoj od strane proizvođača di-

jagnostičkih sredstava, vršeno je uporedno ispitivanje 92 uzorka krvnog seruma nevakcinisanih goveda (telad i junad) na prisustvo antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV), virusa parainfluence 3 (PI 3) i goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Rezultati dobijeni ispitivanjem 92 uzorka krvnog seruma goveda indirektnom imunoenzimskom probom – iELISA, potvrdili su prisustvo antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV) kod 46, odnosno 50% ispitivanih uzoraka (slika 1). Kod sedam, odnosno 15,21% uzoraka od navedenih 46 ispitivanih uzoraka krvnog seruma goveda, dokazano je prisustvo antitela samo protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV).



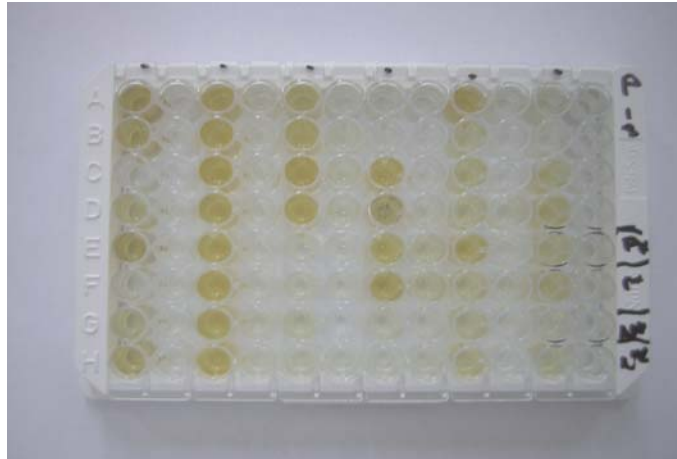
Slika 1. Uzorci krvnog seruma u kojima je ustanovljeno prisustvo antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV) /

Figure 1. Blood serum samples in which the presence of antibodies against the bovine respiratory syncytial virus (BRSV) were established

Rezultati ispitivanja 92 uzorka krvnog seruma goveda primenom indirektno – iELISA, potvrdili su prisustvo antitela protiv virusa parainfluence 3 (PI 3) kod 77, odnosno 83,69% uzoraka (slika 2). Kod 40 ispitivanih uzoraka krvnog seruma ustanovljeno je prisustvo antitela protiv virusa parainfluence 3 i goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa, dok su kod 37, odnosno 48,05% uzoraka utvrđena antitela samo protiv virusa parainfluence 3 (PI 3).

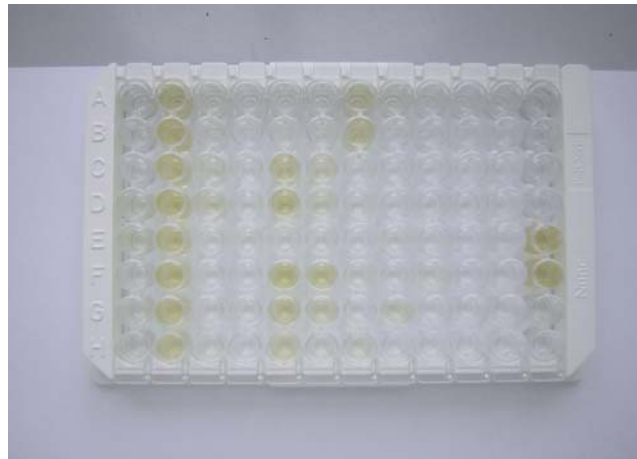
Ispitivanjem 92 uzorka krvnog seruma goveda napred navedenom metodom, ustanovljeno je prisustvo antitela protiv goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1) kod 19 to jest 20,65% uzoraka (slika 3). Od navedenog broja uzoraka, kod 17

uzoraka, odnosno 89,47% pored antitela protiv goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1) potvrđeno je i prisustvo antitela protiv virusa PI3 i BRSV-a. U jednom uzorku (5,2%) je ustanovljeno samo prisustvo specifičnih antitela protiv BHV 1, a u jednom prisustvo antitela protiv BHV 1 i PI3 virusa (5,2%).



Slika 2. Uzorci krvnog seruma u kojima je ustanovljeno prisustvo antitela protiv virusa parainfluence 3 (PI3) /

Figure 2. Blood serum samples in which the presence of antibodies against the parainfluenza virus 3 (PV 3) were established



Slika 3. Uzorci krvnog seruma u kojima je ustanovljeno prisustvo antitela protiv goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1) /

Figure 3. Blood serum samples in which the presence of antibodies against the bovine herpesvirus 1 (BHV 1) were established

Florent i saradnici (1986) su primenom imunoenzimske probe – ELISA, otkrili prisustvo antitela protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa, virusa parainfluence 3, govedeg herpesvirusa 1 i adenovirusa tip 3. Rezultati njihovih ispitivanja su pokazali da jednostavnost i brzina izvođenja imunoenzimske probe kao i njena osetljivost potvrđuju opravdanost njene šire primene za otkrivanje antitela protiv navedenih virusa u ispitivanim uzorcima krvnog seruma.

Graham i saradnici (1998) su korišćenjem komercijalnih dijagnostičkih kitova za izvođenje imunoenzimske probe – ELISA, ispitivali uzorke krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv virusa govede dijareje, govedeg respiratornog sincicijalnog virusa, virusa parainfluence 3 (PI 3) i govedeg herpesvirusa 1 (BHV 1). Rezultati navedenih ispitivanja izvršenih na ukupno 564 uzorka krvnog seruma goveda, potvrdili su prisustvo antitela protiv virusa BVD kod 8,0% uzoraka, protiv virusa BRSV kod 19,0% uzoraka, dok su antitela protiv virusa PI3 registrovali kod 13,7% uzoraka, a antitela za virus BHV1 kod 7,4% uzoraka.

Obando i saradnici (1999) su vršili serološka ispitivanja goveda poreklom iz pet područja u Venecueli na prisustvo virusa govede dijareje, govedeg respiratornog sincicijalnog virusa i govedeg herpesvirusa. Ukupno je ispitano 615 uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo antitela protiv navedenih uzročnika. Antitela protiv virusa BVD utvrđena su kod 36% uzoraka, a antitela protiv govedeg herpesvirusa 1 kod 67% uzoraka, dok su antitela protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa ustanovljena kod 85% uzoraka krvnog seruma ispitivanih goveda. Hazari i saradnici (2002) su takođe ispitivali seroprevalenciju infekcije goveda izazvane govedim respiratornim sincicijalnim virusom. Ispitivanja su vršili primenom imunoenzimske probe – ELISA, na 499 uzoraka krvnog seruma goveda. Utvrđena je seroprevalenca infekcije virusom BRSV koja je iznosila oko 46,09%. Sausker i saradnici (2002) su primenom indirektno imunoenzimske probe – iELISA, otkrili antitela protiv virusa govede dijareje, govedeg herpesvirusa 1 i govedeg respiratornog sincicijalnog virusa u uzorcima krvnog seruma bizona. Kod 125 (55,3%) uzoraka krvnog seruma od ukupno 226 ispitanih uzoraka, utvrdili su prisustvo antitela protiv virusa govede dijareje (BVDV), a kod 99 (43,8%) uzoraka protiv govedeg herpesvirusa 1 (BHV 1), dok su kod 208 (92%) uzoraka seruma dokazali postojanje antitela protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV).

Zaključak / Conclusion

Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da imunoenzimska proba – iELISA, može uspešno da se koristi kao brza, osetljiva i veoma specifična metoda za otkrivanje prisustva antitela u uzorcima krvnog seruma goveda protiv govedeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV), virusa parainfluence 3 (PI3) i govedeg herpesvirusa 1 (BHV1). To potvrđuje opravdanost njene šire primene u serološkoj dijagnostici navedenih virusnih infekcija goveda. Velika raširenost ovih

infekcija u ispitivanim zapahtima ukazuje na značaj sprovođenja svih profilaktičkih mera za suzbijanje navedenih oboljenja, koja nanose velike štete proizvodnji tokom uzgoja ovih životinja.

Literatura / References

1. Florent G, de Marneffe C. Enzyme linked-immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses. *Vet Microbiol* 1986; 11(4): 309-17.
2. Graham DA, McShane J, Mawhinney KA, McLaren IE, Adair BM, Merza M. Evaluation of a single dilution ELISA system for detection of seroconversion to bovine viral diarrhoea virus, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus: comparison with testing by virus neutralization and hemagglutination inhibition. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10(1): 43-8.
3. Hazari S, Panda HK, Kar BC, Das BR. Comparative evaluation of indirect and sandwich ELISA for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002; 25(1): 59-68.
4. Mihajlović B. Rikacije i virusi, 1987.
5. Nardelli S, Marangon S, Dalla-Pozza M, Ponzoni A, Viel L, Bricchese M. Bovine herpesvirus 1 (BHV 1) seroprevalence in the breeding cattle population of the Veneto region: Prospects for the implementation of a control programme, *J Vet Med* 1999; 46: 735-40.
6. Obando RC, Hidalgo M, Merze M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-Lopez J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med* 1999; 41(4): 271-8.
7. Riegel CA, Ayers VK, Collins JK. Rapid, sensitive, competitive serologic enzyme – linked immunosorbent assay for detecting serum antibodies to bovine herpesvirus type 1. *J Clin Microbiol* 1987; 24:18-21.
8. Sausker EA, Dyer NW. Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 2002; 14(1): 68-70.
9. Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by semi – nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res Vet Sci* 2005; 79: 85-8.
10. Vainionpää R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 1994; 265-75.
11. Quinting B, Robert B, Letellier C, Boxum M, Kerkhofs P, Schynts F, Collard A. Development of a 1-step enzyme – linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of bovine respiratory syncytial virus in postmortem specimens. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(3): 283-43.

ENGLISH

ESTABLISHING PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV), PARAINFLUENZA VIRUS 3 (PI3) AND BOVINE HERPESVIRUS 1 (BHV 1) IN BLOOD SERUM OF CATTLE USING INDIRECT IMMUNOENZYME PROBE

H. Šamanc, N. Milić, V. Stojić, D. Knežević, I. Vujanac, B. Dimitrijević, J. Nišavić, Marina Radojičić

A total of 92 samples of bovine blood serum were examined for the presence of antibodies against the bovine respiratory syncytial virus using indirect immunoenzyme probe – iELISA. Specific antibodies against the bovine respiratory syncytial virus (BRSV) were established in 46, or 50% blood serum samples. Investigations of the 92 blood serum samples of cattle for the presence of antibodies against the parainfluenza virus 3 (PI 3), revealed their presence in 77, or 83.69% of the samples, and the presence of antibodies against the bovine herpesvirus 1 (BHV 1) was established in 19, or 20.65% of the samples.

Key words: Bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza virus 3, bovine herpesvirus 1, iELISA.

РУССКИЙ

УТВЕРЖДЕНИЕ ПРИСУТСТВИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГОВЯЖЕГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИАЛЬНОГО ВИРУСА (ГРСВ), ВИРУСА ПАРАИНФЛЮЭНЦЫ 3 (ПИ 3) И ГОВЯЖЕГО ГЕРПЕСВИРУСА 1 (ГГВ 1) В КРОВЯНОМ СЕРУМЕ ТЕЛЯТ ПРИМЕНЕНИЕМ КОСВЕННОЙ ИММУНОЭНЗИМНОЙ ПРОБЫ

Х. Шаманц, Н. Милич, В. Стоич, Д. Кнежевич, И. Вуянац, Б. Димитриевич, Й. Нишавич, Марина Радоичич

Совокупно испытано 92 образчика кровяного серума телят на присутствии антител против говяжьего респираторного синциального вируса применением косвенной иммуоэнзимной пробы – iELISA. У 46, то есть 50% образчиков кровяного серума установлены специфические антитела против говяжьего респираторного синциального вируса (ГРСВ). Испытанием 92 образчика кровяного серума крупного рогатого скота на присутствие антител против вируса параинфлюэнцы 3 (ПИ 3) установлено их присутствие у 77, то есть 83,69% образчиков, а присутствие антител против говяжьего герпесвируса 1 (ГГВ 1) установлено у 19, то есть 20,65% образчиков.

Ключевые слова: говяжий респираторный синциальный вирус, вирус параинфлюэнцы 3, говяжий герпесвирус 1, iELISA