

BOLEZEN MODRIKASTEGA JEZIKA V SLOVENIJI

Aleksandra Grilc Fajfar, Tadej Malovrh*

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

tadej.malovrh@vf.uni-lj.si

Bolezen modrikastega jezika (BT) je bolezen domačih in prosto živečih prežvekovalcev. Je nenalezljiva virusna bolezen, ki jo povzroča *Orbivirus* in se prenaša preko vektorjev, krvosesnih mušic iz rodu *Culicoides*. Poznani so številni načini prenosa bolezni, vključno preko okuženih kulikoid, s pasivnim prenosom okuženih kulikoid z vetrom, okužba se lahko širi tudi z uporabo okuženih injekcijskih igel, kljub temu pa pri nekaterih izbruhih bolezni še vedno nimamo ustrezne razlage glede širjenja določenega serotipa BTV. Diagnostika bolezni BT temelji na encimsko imunskih testih (ELISA) in molekularni diagnostiki. Z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času po že objavljenem protokolu v testu z ustrezno izbranimi začetnimi oligonukleotidi in s fluorofori označeno Taqman sondo specifično dokazujemo segment 1 genoma pri različnih serotipih virusa BT.

Prispevek opisuje prvi primer bolezni BT v Sloveniji pri govedu, pri katerem smo dokazali okužbo s serotipom BTV-4. V začetku novembra 2015 smo s serološkimi metodami pri živali dokazali prisotnost protiteles proti virusu BT, v sredini novembra pa smo z molekularnimi metodami dokazali in potrdili prvi primer bolezni modrikastega jezika v Sloveniji.

Ključne besede: bolezen modrikastega jezika; laboratorijska diagnostika; prvi pojav bolezni

Uvod

Bolezen modrikastega jezika (BT) je virusna bolezen predvsem ovac in goveda in tudi drugih domačih ter divjih parkljarjev, lahko pa zbolijo tudi domači in divji mesojedi. Je kužna nenalezljiva bolezen, ki se ne prenaša z direktnim stikom iz ene bolne živali na drugo. Bolezen povzroča virus RNA iz družine *Reoviridae*, rod *Orbivirus*. V vrsti virusa BT danes razlikujemo 27 genetsko različnih serotipov, med katerimi se v našem delu Evrope pojavljajo predvsem tipi 1, 4, 8 in 16. Med dovzetnimi živalmi se virus prenaša z biološkimi vektorji iz skupine krvosesnih žuželk iz rodu *Culicoides*, ko med sesanjem v ranico vnesejo nekaj okužene slin. Ko okuženi rod mušic na okuženem območju zaradi vremenskih razmer propade (zima in nizke temperature, huda suša in visoke temperature), se na tem področju bolezen ne širi več. Za naslednjo generacijo mušic, ki še ni nosilec virusa, bodo izvor virusa latentno okužene živali določenega področja. Bolezen se lahko razširi med dovzetnimi živalmi tudi z okuženo spermo in z embriotransferjem, mesojedi pa se lahko okužijo s prehranjevanjem z ostanki okuženih živali. Imunski sistem dovzetnega gostitelja se odzove na virusne proteine ali na antigene iz cepiva s proizvodnjo protiteles, ki so za vsakega izmed 27 tipov specifična, kar je temelj laboratorijske serološke diagnostike bolezni. Bolezen modrikastega jezika je bila prvič bolj strokovno opisana leta 1902 v Južni Afriki, znanstveni pristop k opisu bolezni pa sega v leto 1952. Bolezen je danes razširjena po večjem delu sveta, novembra leta 2015 pa je bila prvič laboratorijsko diagnosticirana tudi v Sloveniji.

Material in metode

Monitoring BT v Sloveniji se od leta 2006 izvaja skladno s programom, ki ga vsako leto pripravi UVHVVR. Na terenu veterinarji odvzamejo vzorce krvi za serološke ali molekularne preiskave in jih dostavijo na VF/NVI, ki opravi laboratorijsko testiranje in o rezultatih poroča UVHVVR. Serološka diagnostika boleznimodrikastega jezika temelji na dveh ELISA, presejalnem (Ingenasa, Ingezim BTV DR (1.2. BTV. K0) in potrditvenem testu (IDEXX, Bluetongue Virus (BTV) VP7 Antibody Test Kit). Oba testa se izvajata v virološkem laboratoriju VF/NVI. Skladno s predpisi proizvajalcev testov se opravi zaporedje postopkov ter interpretacija rezultata.

V primeru pozitivnega rezultata potrditvene ELISA pa je v skladu z navodili Odredbe potrebno živalim odvzeti še kri za preiskavo na prisotnost virusnega povzročitelja boleznimodrikastega jezika (kri z antikoagulantom EDTA).

Rezultati

V letu 2015 smo v virološkem laboratoriju testirali 9183 serumskih vzorcev goveda in drobnice. 202 vzorca sta bila v testih ELISA pozitivna, zato smo opravili še molekularno testiranje na prisotnost virusnega genoma. Novembra 2015 smo v okviru rednega letnega monitoringa iz reje govedi v občini Murska Sobota v preiskavo prejeli 42 serumskih vzorcev govedi. V 3 vzorcih smo s presejalnim in potrditvenim ELISA dokazali prisotnost protiteles proti virusu BT. V skladu s programom in z navodili Odredbe 2015 je bila živalim naknadno odvzeta še kri z antikoagulantom, v kateri smo samo pri dveh živalih 18.11.2015 dokazali genom virusa boleznimodrikastega jezika. Naš rezultat je 25.11.2015 potrdil tudi Evropski referenčni laboratorij iz Pirbrighta, Velika Britanija. Ugotovljen virus je pripadal serotipu 4. Konec avgusta leta 2016 pa se je na področju Ilirske Bistrice prvič v Sloveniji pojavil klinični sum boleznimodrikastega jezika pri dveh ovcah, kar je bilo potrjeno tudi z laboratorijskimi metodami. Kasneje je bilo v laboratoriju potrjenih še več primerov BT na podlagi kliničnih sumov.

Razprava

Slovenija je do jeseni 2015 veljala za »oazo«, kjer bolezen modrikastega jezika še ni bila dokazana tako klinično, kot tudi ne v laboratoriju. Do novembra 2015 so prav vse sosednje države že obravnavale posamezne izbruhe BT. Vzroke, da se je Slovenija znašla v tako ugodni situaciji lahko pripišemo specifični legi Slovenije, saj se zaradi geografsko južnejših vstopnih točk virusa v sosednje države in posledično zaradi izvajanja ukrepov, širjenje virusa proti severu, v smeri proti Sloveniji, močno omeji. V precej nepojasnjenih okoliščinah se je v oktobra leta 2014 pojavil izbruh BT serotipa 4 v sosednji Madžarski, razmeroma blizu slovenske meje, kar je predstavljalo povečano verjetnost za pojav boleznimodrikastega jezika v Sloveniji. UVHVVR je na ogroženih območjih predpisala intenzivnejši monitoring. Bolezen na podlagi laboratorijskih testov ni bila dokazana vse do konca sezone prenašalcev v letu 2014, kot tudi ne preko večine leta 2015. Ugodni vremenski pogoji (zelo topla in vlažna jesen s konstantnim SZ vetrom) so omogočili razvoj kulikoid kakor tudi njihovo širjenje iz Madžarske proti Sloveniji in Avstriji. Časovno pravilno načrtovan monitoring je obrodil sadove, saj smo po predhodno pozitivnih rezultatih seroloških preiskav prvič z molekularnimi metodami dokazali virusni genom. Naj omenimo še zanimivost, da so na področju tromeje med Avstrijo, Madžarsko in Slovenijo, v krogu 25 kilometrov v razmaku nekaj ur pred nami dokazali izbruh boleznimodrikastega jezika tudi v Avstriji. Praktično sočasen dokaz izbruha boleznimodrikastega jezika potrjuje pravilno zastavljen program

monitoringa. Avgusta 2016 se je v Sloveniji pojavil prvi klinični primer BT, ki so mu sledili še drugi v mesecu septembru. Pojav bolezni na področju Ilirske Bistrice bi težko neposredno povezovali s pojavom bolezni 2015, vendar ne gre izključiti možnosti prenosa bolezni iz jugo vzhodne smeri, iz Bosne preko precepljene Hrvaške.

Vsekakor pa je izbruh BT v letu 2015 izzval resnejša vprašanja o potrebi po zaščitnem cepljenju proti BTV-4. Cepljenje je eden od zelo učinkovitih načinov preprečevanja bolezni, vendar pa cepiva proti vsem do danes poznanim serotipom niso na voljo. Na podlagi analize epidemiološke situacije leta 2015 in po strokovni oceni smo na VF/NVI podali mnenje, da cepljenje vseh dovzetnih živalih ni primerno zaradi nezmožnosti ločevanja protiteles, ki bi nastala zaradi okužbe z »divjim sevom« virusa in tistimi, ki so posledica cepljenja. Groba analiza je namreč pokazala majhno verjetnost pojava bolezni in majhne škode ob pojavu bolezni. Predlagali smo individualni pristop rejcev k cepljenju tistih živali, ki so namenjene prodaji, za nadaljnjo rejo v drugih področjih države ali za izvoz. Epidemiološka situacija v letu 2016 je sicer nekoliko spremenila pogled na obvezno cepljenje vseh dovzetnih živali, vendar imamo glede na zaznano umrljivost in obolevnost pri pojavi bolezni v 2016 na VF/NVI še vedno pomisleke glede ekonomske upravičenosti t.i. masovnega cepljenja proti BT v Sloveniji.

Reference

1. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res*, 39(5):46.
2. OIE (2014). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: Office International des Epizootics, 1-18.
3. Maan NS, Maan S, Belaganahalli MN, Ostlund EN, Johnson DJ, Nomikou K, Mertens PPC (2012). Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT-PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *PLoS One*, 7(2):e32601.
4. Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future (2009). *Phil Trans R Soc B*, 364: 2669-2681.
5. Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, Guercio A, Alimena G, Vitale M, Bankowska K, Carpenter S, Jones H, Oura CAL, King DP, Elliott H, Mellor PS, Mertens PPC (2007). Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J Virol Methods* 145:115-126.

Bluetongue in Slovenia

Bluetongue (BT) is a disease of domestic, captive and free-ranging ruminants caused by bluetongue virus (BTV), a non-contagious vectorborne *Orbivirus*. BTV is transmitted between its ruminant hosts by hematophagous midges of the genus *Culicoides*.

A number of different mechanisms have been involved in the introduction process, among them the movement of infected livestock, the passive movement of infected *Culicoides* on the wind, transmission by needle sharing during subcutaneous inoculation, although some outbreaks may reflect lack of knowledge about the distribution of the BTV serotypes.

Current diagnosis of BTV infection relies upon enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of nucleic acid by a real-time RT-PCR assay based on a TaqMan fluorescence probe and a set of primers was used to detect the BTV genome segment 1 of different BTV serotypes, according to published protocol from Shaw et alia.

This study described the very first report of BTV-4 in Slovenia. Serological evidence occurred in cattle in the beginning of November and in the middle of November molecular identification of the first BTV case in Slovenia was confirmed.

Key words: bluetongue; laboratory diagnostics; first evidence of disease