

Izolacja i identyfikacja herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2)*)

ALEKSANDRA RUSZCZYK, ANNA CHMIELEWSKA,
ANNA TUCHOLSKA, MARCIN W. BAŃBURA

Katedra Chorób Zakaźnych, Mikrobiologii i Parazytologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.
Isolation and identification of equine herpes virus type 2 (EHV-2)

Summary

A nested PCR was used to detect EHV-2 genomic DNA in equine peripheral blood leukocytes. Blood samples came from clinically healthy horses as well as from animals with upper respiratory tract disorders and from foals suffering from bronchopneumonia. Primers were specific for the sequence located upstream from the sequence homologous to the human IL-10-like gene. Concurrently, the virus was isolated by leukocytes cocultivation in equine dermal cell culture. Viral DNA was detected in 22 out of 29 samples which came from healthy horses as well as from animals with upper respiratory tract disorders and from foals with bronchopneumonia. A virus-specific product of 621 bp in length was observed only after the second round of amplification. The virus was isolated from 6 PCR-positive and 2 PCR negative leukocyte samples. CPE in ED cell cultures usually appeared within 48 hours after infection in the form of syncytia and intranuclear inclusion bodies. Additionally, the PCR technique with primers specific for the gB gene of EHV-2 was used to identify 9 virus strains isolated in 1996-1999. Eight strains were identified as EHV-2 – 6 from clinically healthy horses, 1 from a case of miscarriage and 1 from a horse with a neurological disorder.

Keywords: EHV-2, equine cytomegalovirus, isolation, identification

Koń jest naturalnym gospodarzem przynajmniej pięciu wirusów z rodziny *Herpesviridae*. Trzy z nich – EHV-1, EHV-3 i EHV-4 – należą do podrodziny α -herpesvirinae, dwa pozostałe natomiast – EHV-2 i EHV-5 – zaliczono ostatnio do podrodziny γ -herpesvirinae (20). Z ekonomicznego punktu widzenia największe znaczenie mają zakażenia wirusem zakaźnego ronienia klaczy (EHV-1), powodującym objawy ze strony górnych dróg oddechowych, zaburzenia neurologiczne i poronienia u ciężarnych klaczy (cyt. 1). Typ 4 wirusa odpowiedzialny jest głównie za infekcje górnych dróg oddechowych (cyt. 9). O ile rola EHV-1 i EHV-4 w patogenezie zakaźnego ronienia klaczy i *rhinopneumonitis* jest wyraźnie określona, znaczenie dwóch opisanych dotąd γ -herpesvirusów – EHV-2 i EHV-5 – jest słabo poznane.

Jak dotąd, najwięcej uwagi poświęcono EHV-2. Przyjmuje się, że wywołuje on immunosupresję, objawy zapalenia płuc lub górnych dróg oddechowych, zapalenie spojówek i ogólne pogorszenie kondycji zwierzęcia (4, 5, 15, 21). Jednak zdolność EHV-2, jako czynnika pierwotnego, do wywoływania objawów chorobowych pozostaje nie wyjaśniona, izoluje się go

bowiem również od koni nie wykazujących objawów klinicznych (11, 22). W przebiegu zakażenia doświadczalnego dochodzi wprawdzie u źrebiąt do zapalenia gardła, jednak u dorosłych koni wirus nie wywołuje widocznych objawów (18). Wskazywałoby to, iż EHV-2 jest czynnikiem słabo patogennym, „promującym” raczej zakażenia wtórne, np. *Rhodococcus equi* (4, 13, 15), niż bezpośrednio odpowiedzialnym za konkretną jednostkę chorobową.

W badaniach nad latentnymi zakażeniami EHV-1 i EHV-4 zaobserwowano również, że reaktywacji testowych szczepów α -herpesvirusów towarzyszyła zwykle izolacja EHV-2, sugerująca jego udział w reaktywacji tych typów α -herpesvirusów (23).

Występowanie EHV-1 w Polsce stwierdzano wielokrotnie (2, 8, 18). Wykazano również, że dość znaczny odsetek klinicznie zdrowych koni jest bezobjawowymi, latentnie zakażonymi, nosicielami wirusa (3). Dotychczasowe badania nie obejmowały jednak innych typów herpesvirusów – EHV-4, EHV-2 i EHV-5 – i trudno jest ocenić ich udział w patogenezie zakażeń górnych dróg oddechowych u koni.

Celem przeprowadzonych badań było:

- określenie występowania EHV-2 w Polsce,
- izolacja krajowych szczepów EHV-2 w hodowlach komórkowych,

*) Praca finansowana częściowo w ramach grantu KBN Nr 5P06K 038 09.

– identyfikacja izolowanych wcześniej od koni szczepów herpeswirusów.

Material i metody

Badaniem objęto próbki krwi obwodowej pochodzące od koni podzielonych na trzy grupy: 1 – należące do właścicieli indywidualnych z terenu województwa mazowieckiego, 2 – wyścigowe oraz 3 – źrebięta i konie ze stadniny S. U 17 zwierząt w grupie 1 nie obserwowano żadnych objawów klinicznych. Spośród 6 koni w grupie 2, w chwili pobierania próbek u 5 występowały objawy w postaci kaszlu, natomiast wszystkie zwierzęta z grupy 3 (4 źrebięta urodzone w I półroczu 2000 r. i 2 konie w wieku 1 roku), w wieku od 1 do 3 miesięcy przebyły odoskrzelowe, nieżyłowo-roczne zapalenie płuc.

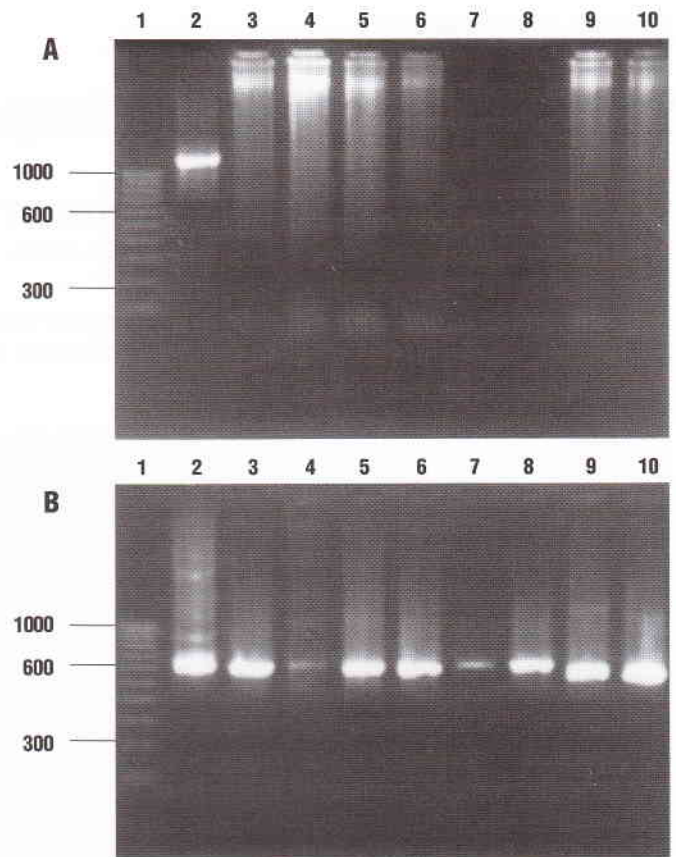
Krew pobierano do probówek wirówkowych zawierających $2 \times$ płyn RPMI z dodatkiem heparyny. Leukocyty izolowano przez wirowanie przez 30 min. na warstwie 60% preparatu Percoll w RPMI (12). Komórki gromadzące się na granicy faz zbierano, płukano RPMI i liczono. Z części leukocytów ekstrahowano DNA i wykonywano zagnieżdżoną PCR (nested PCR; nPCR) ze starterami specyficznymi dla regionu genu EHV-2 zlokalizowanego powyżej otwartej ramki odczytu kodującej produkt homologiczny dla ludzkiej IL-10 (6). Z pozostałych leukocytów wirus izolowano przez kokultywację w hodowlach komórek skóry konia (equine dermal cells, ED, ATCC CCL57). Zawiesiny zawierające 10^7 leukocytów dodawano do 24-godzinnych hodowli komórek ED i inkubowano 4-5 dni w temperaturze 37°C lub do wystąpienia efektu cytopatycznego (CPE). W przypadku braku CPE wykonywano pasaż hodowli. Jeśli CPE nie występował w trzech kolejnych pasażach hodowli, wynik izolacji uznawano za ujemny.

Ponadto, techniką PCR ze starterami specyficznymi dla genu gB EHV-2 (16) zbadano 9 izolatów uzyskanych w latach 1996-1998. Szczepy te izolowano z leukocytów krwi obwodowej koni w sposób wyżej opisany, a badanie techniką PCR ze starterami specyficznymi dla EHV-1 i EHV-4 wykluczyło ich przynależność do tych dwóch typów.

Wyniki i omówienie

Przykład amplifikacji DNA leukocytarnego techniką nPCR przedstawia ryc. 1. Spośród 29 przebadanych w ten sposób próbek krwi, w 22 przypadkach produkt o oczekiwanej wielkości 621 par zasad (pz), specyficzny dla EHV-2, obserwowano wyłącznie po II turze amplifikacji. Wirus izolowano *in vitro* z 8 próbek PCR-dodatnich i 2 PCR-ujemnych. Efekt cytopatyczny pojawiał się zwykle w 2 lub 3 pasażu hodowli i przejawiał się powstawaniem wyraźnie odgraniczonych łysinek otoczonych powiększonymi, silnie załamującymi światło komórkami. W hodowlach barwionych hematoksyliną-eozyną w 48-72 godziny po zakażeniu wyizolowanymi szczepami obserwowano powstawanie syncytiów i wewnątrzjądrowych ciałek wtętowych (ryc. 2).

Sumaryczne wyniki badania PCR i izolacji wirusa, z uwzględnieniem pochodzenia zwierząt, przedstawia tab. 1.

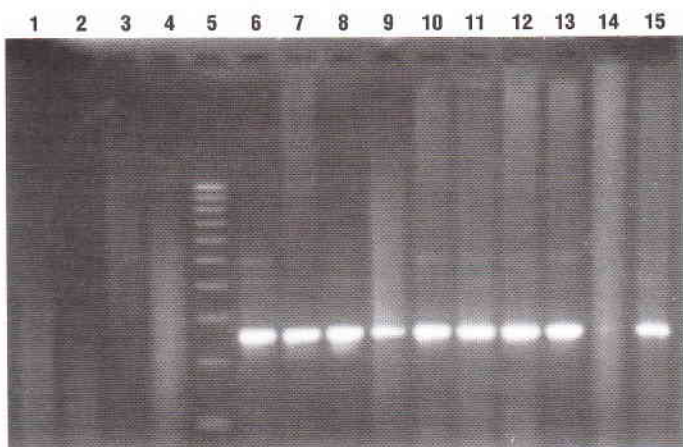


Ryc. 1. Wyniki I rundy (A) i II rundy (B) amplifikacji DNA leukocytarnego ze starterami specyficznymi dla IL-10. 1 – wzorzec masowy DNA, prążki co 100 bp; 2 – kontrola pozytywna, DNA EHV-2 (T400); 3-10 – DNA ekstrahowany z leukocytów krwi obwodowej



Ryc. 2. Efekt cytopatyczny w hodowli komórek ED w 72 godziny po zakażeniu EHV-2 (izolat R43) pochodzącym od zwierzęcia nie wykazującego objawów klinicznych. S – syncytium, czarne strzałki wskazują wewnątrzjądrowe ciała wtętowe (pow. $200\times$, barwienie H-E)

Badanie nPCR ze starterami specyficznymi dla genu gB wykazało, że 8 z 9 izolatów uzyskanych w latach 1996-1999 należało do typu 2 (ryc. 3). Spośród 8 wyizolowanych szczepów 6 pochodziło od zwierząt zdrowych (2 konie właścicieli indywidualnych, 2 hodowlane ze stadnin i 2 konie wyścigowe), natomiast jeden



Ryc. 3. Wyniki identyfikacji szczepów izolowanych w latach 1996-1999, amplifikacja ze starterami specyficznymi dla genu gB EHV-2. 1 – kontrola negatywna, DNA z hodowli komórkowej ED nie zakażonej; 2-4 – kontrole specyficzności reakcji – 2-DNA z hodowli ED zakażonej EHV-4 (T252), 3-DNA z hodowli zakażonej EHV-1 (AIV), 4 – DNA z hodowli ED zakażonej EHV-5 (KB/P48); 5 – wzorzec masowy DNA, prążki od 1000 bp co 100 bp; 6 – kontrola pozytywna, DNA EHV-2 (T400); 7-15 – próbki badane, DNA z hodowli ED zakażonych szczepami izolowanymi przez kokultywację

Tab. 1. Sumaryczne wyniki wykrywania EHV-2-specyficznych sekwencji w leukocytach krwi obwodowej koni techniką nested PCR i izolacji wirusa w hodowlach komórkowych

Grupa	liczba zwierząt	PCR+/PCR- EHV-2	PCR+/izolacja	PCR-/izolacja
1	17	13/4	4	1
2	6	4/2	0	0
3	6	5/1	4	1
razem	29	22	8	2

Objaśnienia: grupa 1 – konie z gospodarstw indywidualnych, grupa 2 – konie wyścigowe, grupa 3 – źrebięta i jednolatki ze stadniny S

szczep wyizolowano od zwierzęcia z objawami nerwowymi w postaci niezborności ruchowej i jeden od klaczy, która poroniła w 6 miesiącu ciąży.

Pierwszych izolacji herpeswirusów z leukocytów krwi obwodowej koni dokonano w Pracowni Wirusologii zakładu Wirusologii, Mykologii i Immunologii w latach 1996-1998, podczas badań nad latentnymi zakażeniami EHV-1 (Bańbura i wsp. dane nie publikowane). Uzyskane wtedy szczepy próbowano, bez powodzenia, zidentyfikować techniką PCR ze starterami specyficznymi dla EHV-1 i EHV-4. Zastosowanie natomiast starterów specyficznych dla EHV-2 pozwoliło zaliczyć je do typu 2 i od 1999 r. prowadzone są badania ukierunkowane na wykrywanie tego γ -herpeswirusa.

Znaczna część izolowanych dotychczas w Pracowni Wirusologii szczepów pochodzi od zwierząt nie wykazujących objawów klinicznych (grupa 1 oraz 6 szczepów izolowanych w latach 1996-1999). Biorąc

pod uwagę, że EHV-2, podobnie, jak inne herpeswirusy, zdolny jest do ustalania zakażenia latentnego w limfocytach B (8), wynik taki nie jest zaskakujący i potwierdza wcześniejsze obserwacje.

Na szczególną uwagę zasługują te przypadki występowania EHV-2, które powiązać można z konkretnymi objawami klinicznymi. Spośród 6 koni wyścigowych (grupa 2) techniką nPCR obecność wirusa stwierdzono u 4 koni, w tym u jednego nie wykazującego żadnych objawów. Na podstawie tych danych trudno ocenić, czy za objawy ze strony górnych dróg oddechowych u tych zwierząt odpowiedzialny był EHV-2, nie wyizolowano bowiem wirusa *in vitro* i nie wykonywano innych badań diagnostycznych. Biorąc jednak pod uwagę, że wirus ten izolowany jest częściej u koni z objawami ze strony układu oddechowego niż od zwierząt klinicznie zdrowych (14), ewentualność ta powinna być brana pod uwagę.

Spośród 6 koni ze stadniny S. (grupa 3), które przebyły zapalenie płuc, EHV-2 stwierdzono u wszystkich zwierząt – u 5 techniką nPCR i u 1 przez izolację wirusa. Choć bezpośrednia przyczyna zapalenia płuc nie została laboratoryjnie potwierdzona, z wywiadu wynikało, że w stadninie tej notowano wcześniej u źrebiąt zakażenia *Rhodococcus equi*. Na obecnym etapie badań trudno jest jednoznacznie powiązać zakażenie tym drobnoustrojem z występowaniem wirusa. Zważywszy jednak, że zależność między rodokokozą a zakażeniem EHV-2 wykazali inni autorzy (13), skojarzenie takie nie jest pozbawione podstaw. Potwierdzenie tej tezy wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań, ukierunkowanych na wykrywanie zarówno *Rhodococcus equi*, jak i EHV-2.

Spośród 8 szczepów izolowanych w latach 1996-1999 jeden pochodził od zwierzęcia wykazującego objawy nerwowe w postaci niezborności ruchowej. Również i w tym przypadku trudno jest jednoznacznie rozstrzygnąć, czy objawy kliniczne spowodowane były zakażeniem wirusowym. Możliwość taka powinna być jednak brana pod uwagę, gdyż EHV-2 wykazuje neurotropizm (17) i znane są przypadki zaburzeń nerwowych związanych z zakażeniem tym wirusem (6). Nie ma też bezpośredniego dowodu, że w jedy-nym, jak dotąd, zanotowanym przypadku poronienie było rezultatem zakażenia EHV-2, bowiem wirus izolowano z leukocytów krwi obwodowej klaczy, a nie z narządów wewnętrznych płodu. Jednak zjawisko takie obserwowano wcześniej (11) i, biorąc pod uwagę, że poronieniu niekoniecznie towarzyszyć musi obecność wirusa w tkankach płodu (19), hipoteza o wirusowej przyczynie poronienia wydaje się prawdopodobna.

W dwóch przypadkach wirus izolowano z PCR-ujemnych próbek leukocytów. Podobne zjawisko opisali wcześniej inni autorzy (6) i rozbieżność ta mogła wynikać z relatywnie małej ilości leukocytnego DNA użytego do amplifikacji w porównaniu do liczby komórek użytych do izolacji wirusa.

Mimo dość wyraźnych powiązań EHV-2 z różnymi syndromami chorobowymi u koni (6), udział tego wirusa w patogenezie zakażeń herpeswirusami koni ciągle pozostaje niejasny, a rozwiązanie tego zagadnienia utrudnione jest dodatkowo przez duże zróżnicowanie antygenowe wirusa i różnice w tropizmie poszczególnych szczepów. Na przykład w zakażeniu szczepem izolowanym w przypadku *keratokonjunktivit* wirus stwierdzano wyłącznie w worku spojówkowym, podczas gdy szczep pochodzący z przypadku zakażenia górnych dróg oddechowych wykazywany był w tkance limfoidalnej, płucach, worku spojówkowym, zwoju trójdzielnym i opuszcze węchowej (7).

Przedstawione wyniki uzupełniają listę wirusów powodujących zakażenia u koni w Polsce. Jednak zakres przeprowadzonych dotychczas w Pracowni Wirusologii badań nie pozwala na wyciąganie zbyt daleko idących wniosków i na obecnym etapie możliwe jest jedynie formułowanie ostrożnych hipotez. Natomiast wykazana wysoka częstość występowania EHV-2 u zdrowych zwierząt oraz prawdopodobny (choć nie w pełni potwierdzony) związek zakażenia tym wirusem z zakażeniem *Rhodococcus equi* oraz występowaniem objawów ze strony układu nerwowego, oddechowego i ronieniem w pełni uzasadnia podjęcie dalszych prac zmierzających do wyjaśnienia znaczenia tego wirusa w patologii koni.

Piśmiennictwo

- Allen G. P., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. Prog. Vet. Microbiol. Immun. 1986, 2, 78-144, S. Karger, Basel.
- Bañbura M., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.: Test PCR w diagnostyce wirusowego zakaźnego ronienia klaczy. Medycyna Wet. 1998, 54, 772-774.
- Bañbura M., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.: Występowanie wirusa zakaźnego ronienia klaczy w leukocytach krwi obwodowej koni. Medycyna Wet. 2000, 56, 521-523.
- Belak S., Palfi V., Tuboly S., Bartha L.: Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2. Zbl. Vet. Med. B, 27, 826-830.
- Blakeslee J. R., Olsen R. G., McAllister E. S., Fassbender J., Dennis R.: Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus, type 2, in the horse. Can. J. Microbiol. 1975, 21, 1940-1946.
- Borchers K., Wolfinger U., Goltz M., Broll M., Ludwig H.: Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. Arch. Virol. 1997, 142, 917-928.
- Borchers K., Wolfinger U., Ludwig H., Thein P., Baxi S., Field H. J., Slater J. D.: Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infection. Virus Res. 1998, 55, 101-106.
- Brill J., Woyciechowska S., Malicki K.: Chorobotwórczość krajowego szczepu wirusa ronienia zakaźnego klaczy „RAC” dla doświadczalnie zakażonych źrebnych klaczy i ich płodów. Med. Dośw. 1958, 4, 415-430.
- Bryans J. T., Allen G. P.: Herpesviral diseases of the horse. W: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs. Kluwer Academic Publishers, Boston 1989, s. 176-229.
- Drummer H. E., Reubel G. H., Studdert M. J.: Equine gamma herpesvirus 2 (EHV-2) is latent in B lymphocytes. Arch. Virol. 1996, 141, 495-504.
- Franchini M., Akens M., Bracher V., v. Fellenberg R.: Characterisation of gamma herpesviruses in the horse by PCR. Virology 1997, 238, 8-13.
- Jacobsen K., Gintz T., Reed S. M., Newbry J., Bayly W. M.: Isolation of equine neutrophils and analysis of functional characteristics by chemiluminescence and bactericidal assays. Am. J. Vet. Res. 1982, 43, 1912-1916.
- Nordengrahn A., Rusvai M., Merza M., Ekström J., Morein B., Belak S.: Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. Vet. Microbiol. 1996, 51, 55-68.

- Nordengrahn A., Ros C., Lindholm A., Palfi V., Belak S., Merza M.: Studies on the prevalence of equine herpesvirus type 2 and 5 DNA in horse populations by using type-specific PCR assays. Proc. 5th Internat. Congress of the Europ. Soc. Vet. Virology, Brescia, Italy, 27-30 August 2000, s. 103-104.
- Palfi V., Belak S., Molnar T.: Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. Zbl. Vet. Med. B 1978, 25, 165-167.
- Reubel G. H., Crabb B. S., Studdert M. J.: Diagnosis of equine gamma herpesvirus 2 and 5 infections by polymerase chain reaction. Arch. Virol. 1995, 140, 1049-1060.
- Rizvi S. M., Slater J. D., Borchers K., Field H. J., Slade A. J.: Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous systems of ponies. J. Gen. Virol. 1997, 78, 1115-1118.
- Rola J., Żmudziński J.: Herpeswirus koński typ 1 (EHV-1) przyczyną poronienia u klaczy w Polsce. Medycyna Wet. 1997, 53, 268-269.
- Smith K. C., Whitwell K. E., Binns M. M., Dolby C. A., Hannant D., Mumford J. A.: Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with Equid herpesvirus 1. Eq. Vet. J. 1992, 24, 256-259.
- Telford E. A. R., Studdert M. J., Agius C. T., Watson M., S., Aird H. C., Davison A. J.: Equine herpesviruses 2 and 5 are γ -herpesviruses. Virology 1993, 195, 492-499.
- Turner A. J., Studdert M. J., Peterson J. E.: Equine herpesviruses 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion. Aust. Vet. J. 1970, 46, 90-98.
- Turner A. J., Studdert M. J.: Equine herpesviruses 3. Isolation and epizootiology of slowly cytopathic viruses and serological incidence of equine rhinopneumonitis. Aust. Vet. J. 1970, 46, 581-586.
- Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Griffiths L., Edington N.: Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J. Gen. Virol. 1992, 73, 261-268.

Adres autora: lek. wet. Aleksandra Ruszczyk, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa; e-mail: ruszczyk@amaltea.sggw.waw.pl

VAN STRATEN M., FRIEGUT O., EVEN-TOR B.: Ognisko niesztowicy u wielbłądów w Izraelu. (Outbreak of contagious ecthyma in camels in Israel). Vet. Rec. 148, 150-151, 2001 (5)

W 1998 r. objawy wyprysku skórno-mięsniowego wystąpiły u 2 osobników w stadzie 150 wielbłądów. Szybko zmiany chorobowe objęły 90% zwierząt. Początkowo chorowały zwierzęta dorosłe, następnie młode. Przy tak dużej zachorowalności brak było wypadków śmiertelnych. Zmiany chorobowe w formie grudek i krost były zlokalizowane na skórze wokół warg i otworów nosowych. Niekiedy zmieniały się one w strupy i rozwijały się wtórne infekcje bakteryjne. Często występował obrzęk podzuchwowych węzłów chłonnych. U części zwierząt choroba przebiegała w postaci uogólnionej, w której zmiany chorobowe występowały na szyi, bokach tułowia, klatce piersiowej i kończynach. Ze strupów wyizolowano parapoxvirus.

G.

GRAHAM D. A., CULVERT V., GERMAN A., MCCULLOUGH S. J. M.: Zakażenia pestiwirusowe u owiec i świń w Północnej Irlandii. (Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland). Vet. Rec. 148, 69-72, 2001 (3)

Do rodzaju *Pestivirus* (rodzina *Flaviviridae*) należy wirus biegunki bydła (BVD) typ I i II, choroby granicznej oraz klasycznego pomoru świń. Przebadano serologicznie surowice owiec i kóz z terenów Irlandii Północnej na obecność przeciwciał dla pestiwirusów. Testem ELISA stwierdzono przeciwciała dla wirusa choroby granicznej u 49 (5,3%) z 918 owiec pochodzących z 28 (30,4%) na 92 badanych stad. Nie występowała zależność pomiędzy odsetkiem stad reagujących pozytywnie i obecnością bydła w farmach. W stadzie reagujących pozytywnie odsetek zwierząt reagujących pozytywnie wahał się od 17,5% do 40,0%. Badanie porównawcze 14 surowic dodatnich w kierunku przeciwciał dla wirusa BVD I wykazało we wszystkich przypadkach niskie miana. Dwadzieścia (2,9%) z 680 surowic świń z 46 stad wykazywało działanie cytotoksyczne, zaś 660 surowic reagowało w odczynie seroneutralizacji z antygenem wirusa choroby granicznej. Miano przeciwciał dla BVD I było czterokrotnie wyższe aniżeli dla wirusa choroby granicznej.

G.