

Przypadek występowania końskiego herpeswirusa typu 5 (EHV-5)

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

Pracownia Wirusologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.

Occurrence of equine herpesvirus type 5 in Poland – a case study

Summary

A herpesvirus, termed LR 39, isolated in 1997 from the peripheral blood leukocytes (PBL) of a yearling stallion in Poland, was molecularly characterised by PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The virus induced cell syncytia, characterised by multinucleated giant cells. DNA extracted from the LR 39-infected cell culture was readily amplified by PCR with primers specific for the thymidine kinase (TK) gene of equine herpes virus type 5 (EHV-5), indicating that the LR 39 isolate belonged to type 5. Further examination of LR 39 by RFLP analysis of genomic DNA using restriction endonuclease BamHI revealed that the LR 39 genome was similar to the prototype EHV-5 strain 2-141/67 (kindly provided by dr Michael J. Studdert, School of Veterinary Science, University of Melbourne, Australia). Fragments H, J, L, M, N, O of LR 39 were slightly different in size compared to the respective fragments of strain 2-141/67, whereas fragment P was missing. We conclude that LR 39 should be tentatively classified as a type 5 EHV isolate.

Keywords: equine herpesvirus, EHV-5, molecular analysis

Herpeswirusowe zakażenia u koni stanowią istotny problem w praktyce weterynaryjnej. Spośród sześciu końskich α -herpeswirusów (typy 1, 3, 4, 6, 8 i 9) największe znaczenie mają zakażenia typami 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4) i ich udział w patogenezie zakaźnych chorób koni jest bezsporny – EHV-1 wywołuje objawy ze strony górnych dróg oddechowych, zaburzenia neurologiczne i poronienia u ciężarnych klaczy (1, 11), natomiast EHV-1 odpowiedzialny jest głównie za infekcje górnych dróg oddechowych (11).

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono typom 2 i 5 EHV, zaliczanym obecnie do podrodziny γ -herpesvirinae (16). EHV-2 uważany jest za słabo patogeny, a jego naturalne występowanie wiązane jest z immunosupresją, objawami zapalenia płuc lub górnych dróg oddechowych, zapaleniem spojówek i ogólnym pogorszeniem kondycji zwierzęcia (2, 3, 10, 17). EHV-2 izolowano również od znacznego odsetka koni bez jakichkolwiek objawów klinicznych (9). Sugerowany jest też udział EHV-2 w reaktywacji latentnych herpeswirusów typu 1 i 4 (18). Natomiast biologia EHV-5 jest znacznie gorzej poznana. Do tej pory izolowano go od koni w Australii (17), Nowej Zelandii (8), Niemczech (4), Szwajcarii (9) oraz w Polsce (Ruszczyk i wsp., dane niepublikowane), a dane epidemiologiczne są nadzwyczaj skąpe.

Częstość izolacji EHV-5 w porównaniu z EHV-2 jest znacznie mniejsza np.: Browning i wsp. (5) z 51

badanych szczepów wyodrębnili jedynie 4, które zaliczyli do EHV-5, a Reubel i wsp. (12), badając leukocyty krwi obwodowej techniką PCR stwierdzili, że EHV-5 występuje u 16%, a EHV-2 u 30% badanych koni. Prawdopodobnie przyczynami rzadszego izolowania EHV-5 jest powolna w porównaniu z EHV-2, replikacja wirusa w zakażonych komórkach hodowli oraz niewielka liczba leukocytów zakażonych tym wirusem, dla którego głównym celem są inne tkanki.

Brakuje również danych o patogenności wirusa, a badania w tej materii są utrudnione, gdyż EHV-5 izolowano często od zwierząt zakażonych jednocześnie EHV-2 (9). EHV-5 izolowany może być, podobnie, jak EHV-2, zarówno od zwierząt wykazujących objawy chorobowe ze strony układu oddechowego, jak i od zwierząt zdrowych (8). Sugeruje się też występowanie zakażeń latentnych i/lub przetrwałych, jednak nie wiadomo dokładnie, w jakich tkankach ustalane jest zakażenie latentne (8).

Celem badań była wstępna charakterystyka szczepu EHV-5 izolowanego w Polsce.

Materiał i metody

Szczepy wirusa. Wzorcowy szczep EHV-5 2-141/67, uzyskany dzięki uprzejmości dr Michaela J. Studderta ze School of Veterinary Science, University of Melbourne, Australia, służył jako kontrola pozytywna.

Izolat własny, oznaczony LR39, uzyskany był przez hodowlę wspólną komórek ED i leukocytów krwi obwodo-

wej jednorocznego ogiera rasy małopolskiej, nie wykazującego objawów chorobowych, pochodzącego z niewielkiego stada koni użytkowanych do jazd rekreacyjnych. Szczep ten należał do grupy szczepów uzyskanych w latach 1996-1999 podczas badań nad latentnymi zakażeniami EHV-1. Technika PCR wykluczyła jego przynależność do typów 1 i 4 oraz 2 (14) i dla ostatecznej identyfikacji zastosowano startery specyficzne dla genu TK EHV-5 (12, 14).

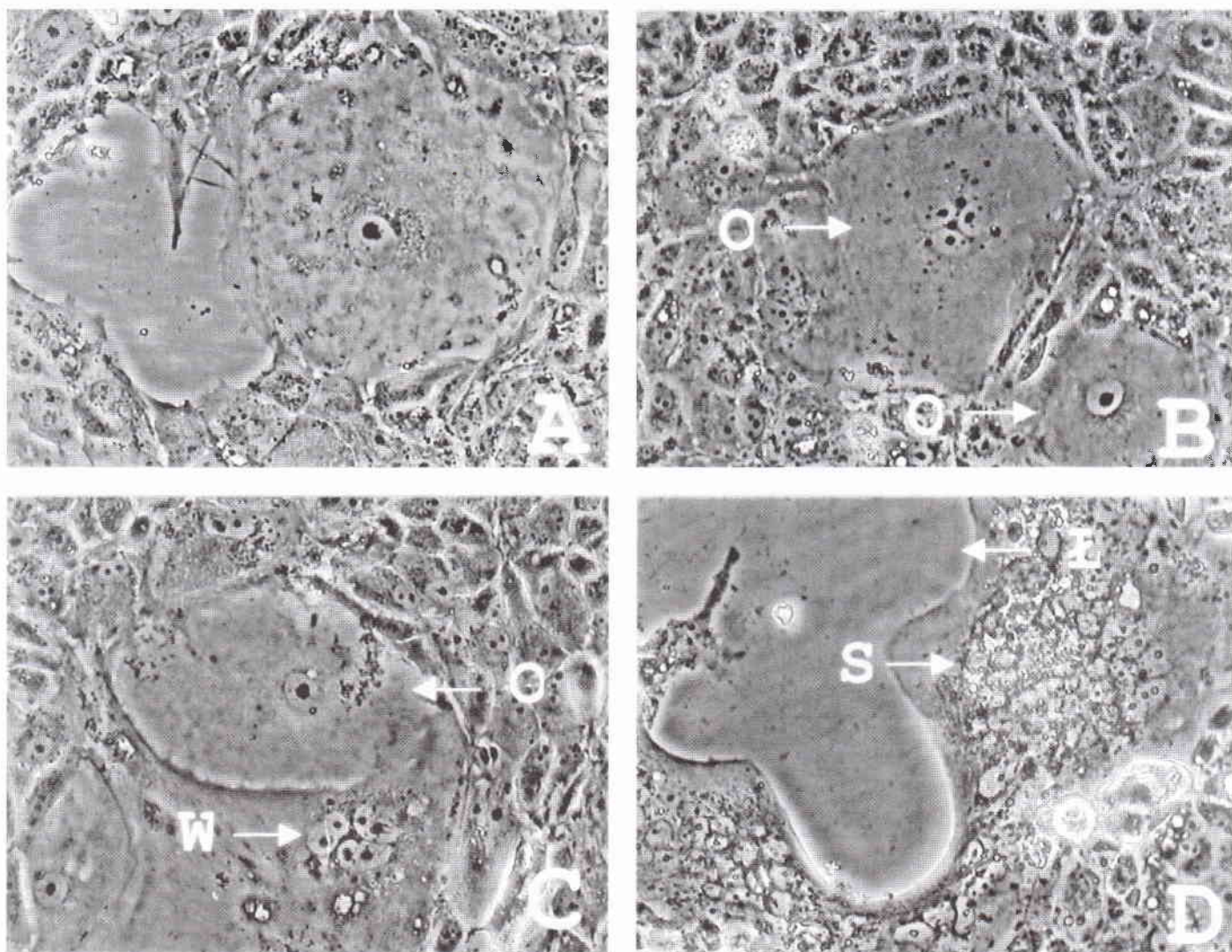
Do amplifikacji techniką nPCR używano 1 µg DNA izolowanego standardową metodą (15) z hodowli komórkowej ED zakażonej izolatem LR39. Kontrolę negatywną stanowił DNA hodowli niezakażonej, a kontrolę pozytywną – DNA hodowli zakażonej szczepem wzorcowym.

Szczepy 2-141/57 i LR39 namnażano w hodowli komórek ED, oczyszczano przez wirowanie w gradiencie 5-15% Ficoll'u 400 (Sigma) (7) i ekstrahowano genomowy DNA (13). 1 µg DNA poddawano trawieniu restrykcyjnym enzymem Bam HI, elektroforezie w 0,6% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i wykonywano dokumentację fotograficzną.

Wyniki i omówienie

Efekt cytopatyczny w hodowlach komórkowych zakażonych izolatem LR39 był podobny do efektu powodowanego przez szczep referencyjny 2-141/67 (ryc. 1A). Zmiany pojawiały się późno, po co najmniej 5 dniach od zakażenia i przejawiały się początkowo powstawaniem komórek olbrzymich, zawierających niekiedy po 2-3 jądra (ryc. 1B). Stwierdzano również fuzję komórek i występowanie komórek olbrzymich wielojądrzastych (ryc. 1C), a w późniejszej fazie zakażenia obserwowano duże, syncytia ułożone na obrzeżach łysek (ryc. 1D).

Podczas pasażowania obu szczepów w hodowlach komórek ED zaobserwowano, że wirus słabo (lub wcale) nie uwalnia się do płynu – dla efektywnego zakażenia w kolejnym pasażu konieczne było zamrożenie/rozmarzenie zakażonej hodowli i użycie do wykonania kolejnego pasażu płynu wraz z resztkami komórkowymi. Silniej wyrażony CPE uzyskiwano też w przypadku, gdy po adsorpcji nie usuwano inokulum.



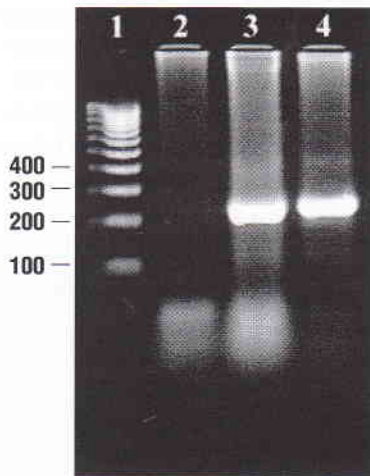
Ryc. 1. Efekt cytopatyczny w hodowlach komórek ED zakażonych EHV-5 (powiększenie mikroskopu 200×)

A – szczep referencyjny 2-141/67, 96 godzin po zakażeniu; B – izolat LR39, 120 godzin po zakażeniu, O – komórki olbrzymie; C – izolat LR39, ok. 140 godzin po zakażeniu, W – komórki olbrzymie wielojądrzaste; D – izolat LR39, ok. 160 godzin po zakażeniu, S – duże syncytium, L – łyseka.

Natomiast kiedy do zakażenia hodowli używano zawiesiny wirusa przechowywanej przez dłuższy czas w zamrożeniu lub przez kilka do kilkunastu dni w temperaturze +4°C, konieczne były 2-3-krotne pasażowanie zakażonej hodowli, podobnie jak przy izolacji wirusa z leukocytów przez hodowlę wspólną. Obserwacje te wskazują, że EHV-5, podobnie jak EHV-2, pozostaje silnie związany z błonami komórkowymi.

PCR – analiza produktów amplifikacji DNA izolowanego z hodowli komórkowej zakażonej izolatami LR39 wykazała występowanie prążka identycznego jak u szczepu referencyjnego (ryc. 2).

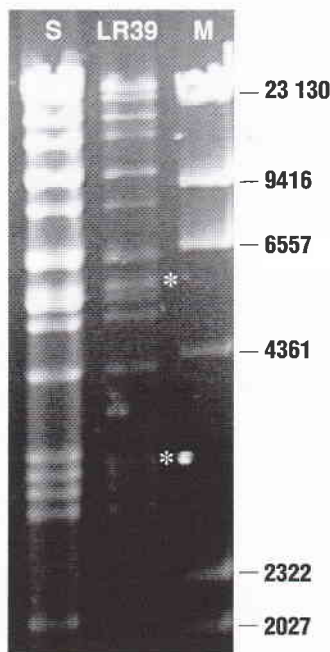
Analiza restrykcyjna genomowego DNA wykazała natomiast znaczne podobieństwo szczepu LR39 i 1-



Ryc. 2. Wynik identyfikacji izolatu LR39 techniką nPCR ze starterami specyficznymi dla genu TK EHV-5, druga tura amplifikacji, 2% żel agarozowy: 1 – wzorzec masowy DNA, 2 – kontrola negatywna, DNA niezakażonej hodowli komórkowej ED, 3 – kontrola pozytywna, DNA hodowli komórkowej ED zakażonej szczepem wzorcowym 2-141/67 EHV-5, 4 – DNA hodowli komórkowej ED zakażonej izolatami LR39

141/67 (ryc. 3). Oba szczepy różniły się nieznacznie wielkością fragmentów H i L oraz u szczepu LR39 brakowało fragmentu P.

Właściwa interpretacja uzyskanych wyników nie jest łatwa, bowiem na świecie dokonano analizy restrykcyjnej kilku zaledwie szczepów EHV-5 (4, 5). Cztery z nich wykazywały identyczny profil restrykcyjny (5), jeden natomiast różnił się od szczepu 2-141/67 jednym miejscem restrykcyjnym Eco RI (4), zatem podobieństwo szczepu LR39 i 2-141/67 nie jest zaskakujące. Interesująca jest natomiast jaskrawa różnica między EHV-5 a EHV-2 – każdy spośród zbadanych przez Ruszczyk (14) szczepów EHV-2 wykazywał inny profil restrykcyjny, nawet gdy izolaty po-



Ryc. 3. Porównanie wzorców restrykcyjnych szczepów 2-141/67 (S) i LR39 po cięciu genomowego DNA enzymem Bam HI; * – fragmenty restrykcyjne genomu LR39 różniące się wielkością od fragmentów szczepu 2-141/67. M – wzorzec masowy DNA.

chodziły z tego samego stada. Zbyt skąpe dane – znikoma liczba zbadanych dotąd izolatów EHV-5 – nie pozwalają na wysuwanie zbyt daleko idących wniosków, jednak ogromne podobieństwo szczepów EHV-5 izolowanych w odległych regionach geograficznych wskazuje, że EHV-5 jest znacznie bardziej jednolity pod względem genetycznym niż EHV-2.

Opisany przypadek występowania EHV-5 w Polsce był, jak dotąd, odosobniony. Niemożliwe są zatem jakiegokolwiek uogólnienia w tej materii, zwłaszcza że typowi 5 EHV nie można przypisać konkretnej jednostki chorobowej. Mimo to uwzględnienie tego herpeswirusa jako potencjalnego czynnika etiologicznego zakażeń wirusowych u koni i kontynuacja ukierunkowanych badań wirusologicznych wydają się uzasadnione, zwłaszcza w przypadkach o niewyjaśnionej etiologii.

Piśmiennictwo

- Allen G. P., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progr. Vet. Microbiol. Immunol. R. Pandey* (Wyd.), S. Karger, Basel, 1986, 2, 78-144.
- Belak S., Palfi V., Tuboly S., Bartha L.: Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2. *Zntbl. Vet. Med. B* 1980, 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. *Canad. J. Microbiol.* 1975, 21, 1940-1946.
- Borchers K., Frölich K., Ludwig H.: Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch. Virol.* 1999, 144, 771-780.
- Browning G. F., Studdert M. J.: Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* 1987, 68, 1441-1447.
- Bryans J. T., Allen G. P.: Herpesviral Diseases of the Horse. (W:) Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. Red. G. Wittman, Kluwer Academic Publishers, Boston (Dordrecht) London, 1989, s.176-229.
- Crabb B. S., Studdert M. J.: Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 2033-2041.
- Dunowska M., Meers J., Wilks C. R.: Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand. *New Zealand Vet. J.* 1999, 47, 44-46.
- Franchini M., Akens M., Bracher V., Fellenberg V.: Characterisation of gammaherpesviruses in the horse by PCR. *Virology* 1997, 238, 8-13.
- Nordengrahn A., Rusvai M., Merza M., Ekström J., Morcin B., Belák 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.
- Palfi V., Belák S., Molnár T.: Isolation of herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zntbl. Vet. Med. B* 1978, 25, 165-167.
- Reubel G. H., Crabb B. S., Studdert M. J.: Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 and 5 infection by polymerase chain reaction. *Arch. Virolology* 1995, 140, 1049-1060.
- Rola J.: Profile restrykcyjne polskich izolatów herpeswirusa koni typu 1. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 813-815.
- Ruszczyk A.: Izolacja i analiza szczepów herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2). Praca doktorska, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, Warszawa 2002.
- Strauss W. M.: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. 1992, W: Current Protocols in Molecular Biology, tom 1, 2.2.1-2.2.2., Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Wyd.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- 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 g-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. *Australian Vet. J.* 1970, 46, 90-98.
- Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Gryffiths L., Edington N.: Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection and distinction using polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virolology* 1997, 73, 261-268.

Adres autora: dr Aleksandra Ruszczyk, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: ruszczyk@amaltea.sggw.waw.pl