

Ronienie u klaczy na tle zakażenia herpeswirusem końskim typu 1 (EHV-1)

STANISŁAW WINIARCZYK, WOJCIECH ŁOPUSZYŃSKI*, ZBIGNIEW GRĄDZKI,
MONIKA MICHAŁOWSKA, ANNA ZIĘTEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, *Katedra Anatomii Patologicznej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Winiarczyk S., Łopuszyński W., Grądzi Z., Michałowska M., Ziętek A.

Miscarriage in mares as a result of contracting equine herpes virus type 1 (EHV-1)

Summary

The aim of the study was to ascertain the causes of miscarriage in mares. The material used in the study was 4 miscarried fetuses in the 8th and 9th month of pregnancy. Vivisection of the fetuses displayed swelling and yellowing of the subcutaneous dermatological layer as well as the accumulation of a large amount of brown-colored liquid in the body cavities, enlargement of the liver with evidence of areas of necrosis, enlarged spleen and ecchymosis of the sub capsules. Histology examinations confirmed the appearance of areas of necrosis in the bronchial epithelium and liver tissue, necrosis of the central part of the lymph nodules in the spleen and serous-cell pneumonia. All the cases displayed Dimock interpolated bodies (A Cowdry type) in the liver cells and the bronchial epithelium. Genetic material of equine herpes virus 1 (EHV1) was discovered after using the PCR method. The time of miscarriage, changes evident in the vivisection and histology examination were typical of this infectious virus causing miscarriage. In addition, a positive PCR result confirmed the initial diagnosis.

Keywords: miscarriage, herpes virus, mare

Poronienie u klaczy jest to przedwczesne zakończenie ciąży wskutek śmierci płodu, która następuje po zakończeniu organogenezy pomiędzy 45. a 55. dniem trwania ciąży, ale przed upływem 300 dni, zanim płód jest zdolny do życia poza macicą. Częstotliwość występowania poronień u ciężarnych klaczy waha się średnio w granicach od 2% do 12% (8). Są one czynnikiem zmniejszającym szansę ponownego zażebienia klaczy. Po drugim poronieniu istnieje wysokie prawdopodobieństwo rozwinięcia się trwałej niepłodności (8). U koni około 50% poronień wywoływanych jest czynnikami zakaźnymi (6, 11, 13, 14). Poronienia klaczy na tle zakażeń wirusowych wywołane są głównie przez herpeswirus koni typu 1 (EHV-1) i wirus zapalenia tętnic koni (EAV) (12). Na 80 poronionych płodów pochodzących z różnych stadnin koni rasowych w kraju, przebadanych przez Gólnika na początku lat 90., w badaniu wirusologicznym wirus EA izolowany był w 40%, natomiast herpeswirus koni w 26% przypadków (4). Spośród herpeswirusów końskich EHV-1 cechuje się najwyższą patogennością i obok ronień wywołuje również schorzenia górnych dróg oddechowych, zaburzenia neurologiczne oraz okołoporodowe u źrebiąt. Z poronionych płodów izoluje się niekiedy typ 4 herpeswirusa końskiego (EHV-4), który odgrywa główną rolę w infekcjach górnych dróg oddechowych. Obydwa wymienione typy herpeswirusów należą do podrodziny *α-herpesvirinae* i mają zdolność wywoływania zakażeń latentnych. Bardzo często poronienie jest następstwem reinfekcji układu oddechowego ciężarnej klaczy w ostatnich 4 miesiącach ciąży lub jest wynikiem reaktywacji wirusa ze stanu latencji. Znamienny jest fakt, że

wcześniejsze infekcje i obecność swoistych przeciwciał nie chronią klaczy przed wystąpieniem ronienia (10).

Celem pracy było rozpoznanie przyczyny poronień u klaczy hodowanych w dwu gospodarstwach na terenie jednej gminy województwa lubelskiego.

Material i metody

Według relacji lekarzy weterynarii z gminy „J”, w okresie od grudnia do kwietnia 2002 roku zanotowano na tym terenie liczne ronienia u źrebnym klaczy. W tym czasie obserwacje własne przeprowadzono w dwu prywatnych stadninach położonych na terenie tej gminy. Od kilku lat na opisywanym terenie nie stosowano szczepień ochronnych przeciwko chorobom zakaźnym koni. Obsadę gospodarstwa A stanowiły konie rasy małopolskiej. Stan pogłowia w czasie prowadzenia badań obejmował: 1 ogiera, 14 klaczy, 15 źrebiąt. Poronienia wystąpiły u 2 klaczy na początku stycznia, w 8. i 9. miesiącu ciąży. W gospodarstwie B utrzymywano 5 klaczy, 3 źrebięta i 1 ogiera szlachetnej półkrwi. Tutaj również poroniły dwie klacze na przełomie grudnia i stycznia w 8. i 9. miesiącu ciąży. W obu gospodarstwach ronienia przebiegały bez objawów zwiastunowych, a łożyska odeszły bez komplikacji. Bezpośrednio po ronieniu jedna z klaczy (pierworódka) zalegała bez ruchu przez pół godziny. U pozostałych klaczy nie zaobserwowano żadnych innych objawów. Po 9 dniach wszystkie klacze wykazywały objawy rui i po pokryciu ponownie zaszły w ciążę.

Sekcja. Badanie sekcyjne czterech poronionych płodów zostało przeprowadzone według powszechnie przyjętego schematu. Do badań laboratoryjnych pobrano jałowo wycinki płuc, wątroby, śledziony, nerki, żołądka, jelit i łożyska oraz wyciek z pochwy i wymazy z okolicy szyjki macicy.

Badanie histopatologiczne. Pobrane wycinki utrwalono przez 24 godz. w obojętnej 10% formalinie. Następnie sporządzono preparaty mikroskopowe metodą parafinową, które zabarwiono hematoksyliną i eozyną i oglądano w mikroskopie świetlnym.

Badanie bakteriologiczne. Próbkę posiewano na podłoże Sabourauda, agar z krwią oraz selektywne podłoże McConkeya i inkubowano w 37°C przez 18 godzin.

Detekcja kwasów nukleinowych wirusów EHV-1 i EAV. Kwasy nukleinowe z próbek narządów poronionego płodu uzyskano na drodze rutynowej deproteinizacji fenolem lub z użyciem odczynnika Trizol (5). Badanie metodą PCR w kierunku herpeswirusowego ronienia klaczy wykonano wg Lawrence i wsp. (7). W tym celu amplifikowano jednocześnie fragment o długości 649 par zasad w obrębie genu glikoproteiny C oraz fragment o długości 492 par zasad w obrębie genu 76. W kierunku wirusowego zapalenia tętnic koni badanie metodą RT-PCR wykonano wg Belak i wsp. (3). Amplifikowano fragment genu nukleoproteiny wirusa EA o długości 395 par zasad. Swoistość reakcji potwierdzano w drugiej reakcji PCR, gdzie na matrycy produktu RT-PCR amplifikowano jego wewnętrzny odcinek o długości 262 par zasad. W badaniach kontrolnych metody PCR użyto wzorcowych szczepów AB4 EHV-1 (Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy) i Bucyrus EAV (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). Uzyskane produkty PCR były następnie analizowane metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym w buforze TBE przy 10 V/cm przez 50 minut. Wielkość produktów amplifikacji określano w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

Wyniki i omówienie

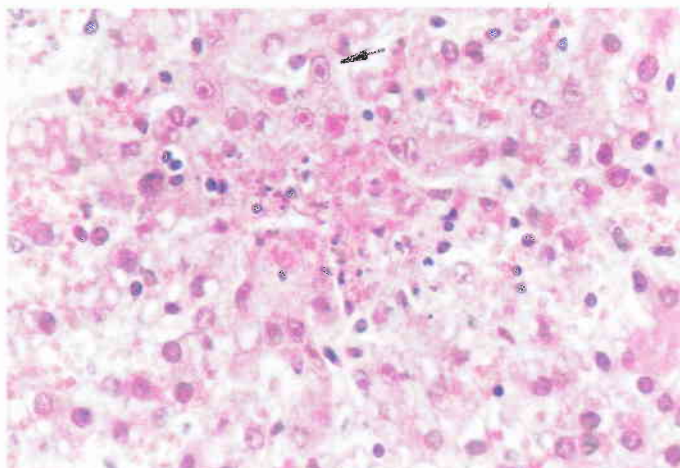
Podczas badania sekcyjnego czterech poronionych płodów stwierdzono zażółcenie błon śluzowych naturalnych otworów ciała, zażółcenie i obrzęk tkanki podskórnej z galaretowatym nacieczeniem, nagromadzenie się dużej ilości klarownego, bursztynowego płynu w jamie brzusznej i jamie klatki piersiowej, obrzęk i przekrwienie narządów wewnętrznych. Pod torebką powiększonej wątroby widoczne były drobne, ostro odgraniczone ogniska martwicowe barwy kremowożółtej, które u jednego z płodów były bardzo liczne (ryc. 1). Pod torebką powiększonej śledziony występowały punkcikowate wybroczyny. Badaniem histopatologicznym stwierdzono występowanie ognisk martwicowych w tkance płucnej i wątrobowej oraz martwicę centralnej części grudek chłonnych w śledzionie (ryc. 4), a także surowiczo-komórkowe zapalenie płuc. W trzech przypadkach wykryto w jądrach komórek wątroby i nabłonka oskrzelików płucnych ciała wtrętowe Dimocka (typu A Cowdry). Były one kształtu owalnego i zajmowały centralną część jądra, barwiąc się eozyną na kolor czerwony (ryc. 2, 3). W wątrobie komórki z opisywanymi wtrętami wewnątrzjądrowymi lokalizowały się przede wszystkim na obwodzie ognisk martwicowych. Stwierdzone zmiany anatomopatologiczne i histologiczne są charakterystyczne dla wirusowego ronienia klaczy i były już wcześniej opisane w Polsce przy tej chorobie przez Woyciechowską i wsp. (16), Wołoszyna i Rubaja (15) oraz Rolę i Żmudzińskiego (9).

Badania bakteriologiczne i mikologiczne wypadły negatywnie. Tylko w niektórych posiewach stwierdzano pojedyncze kolonie bakterii Gram-dodatnich.

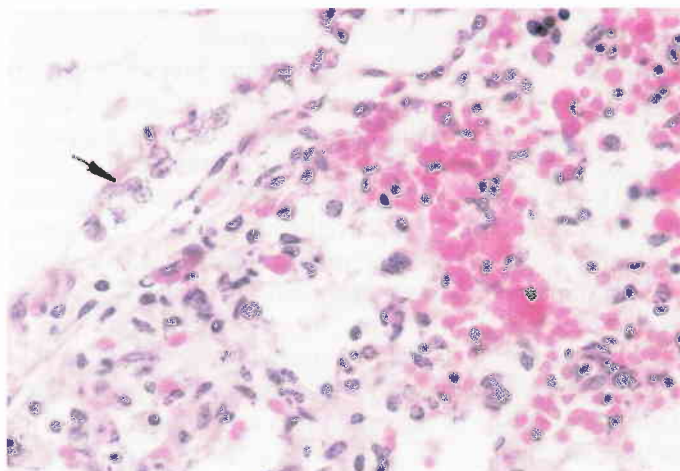
Amplifikacji poddano kwasy nukleinowe wyodrębnione z wycinków tkanki płuc i wątroby. Produkty PCR o wielkości 649 pz i 492 pz uzyskano ze starterami swoistymi dla ERV1 we wszystkich badanych przypadkach (ryc. 5). Natomiast wynik metody RT-PCR i nested PCR ze starterami swoistymi dla wirusa EAV był negatywny.



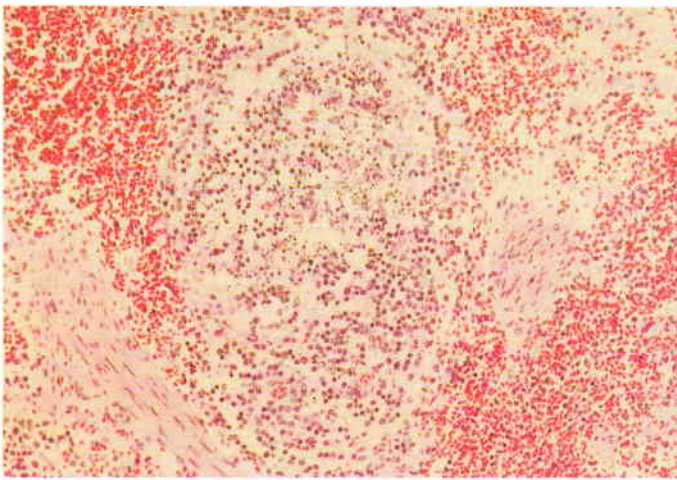
Ryc. 1. Wątroba poronionego płodu. Widoczne ostro odgraniczone ogniska martwicowe barwy kremowożółtej



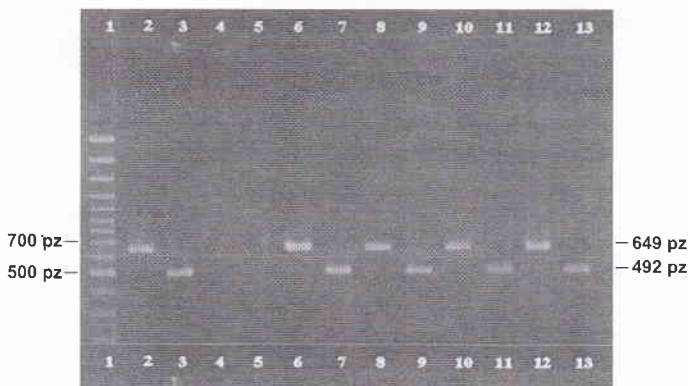
Ryc. 2. Obraz mikroskopowy wycinka wątroby poronionego płodu. Widoczne wewnątrzjądrowe ciała wtrętowe Dimocka (A Cowdry) w sąsiedztwie ognisk martwicowych. Barw. H. E. Pow. ok. 180 x



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy wycinka tkanki płucnej poronionego płodu. Widoczne wewnątrzjądrowe ciała wtrętowe w nabłonku oskrzelika. Barw. H. E. Pow. ok. 180 x



Ryc. 4. Obraz mikroskopowy wycinka śledziony poronionego płodu. Widoczne ogniska martwicowe w centralnej części grudek chłonnych. Barw. H. E. Pow. ok. 80 ×



Ryc. 5. Wyniki badania próbek tkanki płucnej od czterech poronionych płodów metodą PCR na obecność materiału genetycznego wirusa zakaźnego ronienia klaczy (EHV-1). Elektroforeza w 1% żelu agarozowym. Produkty amplifikacji genu glikoproteiny C i genu 76 o wielkości 649 pz. i 492 pz. Ścieżki: 1 – marker masowy Fermentas, DNA ladder 100bp.; 2 – kontrola pozytywna gC (szczep AB4, EHV-1); 3 – kontrola pozytywna genu 76 (szczep AB4, EHV-1); 4 – kontrola negatywna gC; 5 – kontrola negatywna genu 76; 6 – gC/1; 7 – gen 76/1; 8 – gC/2; 9 – gen 76/2; 10 – gC/3; 11 – gen 76/3; 12 – gC/4; 13 – gen 76/4

Wirusowe zakaźne ronienie klaczy występuje tam, gdzie prowadzi się hodowlę koni. Pierwszy udokumentowany przypadek wystąpienia herpeswirusowego ronienia klaczy w Polsce został zarejestrowany w 1949 roku, a w 10 lat później został wyizolowany pierwszy szczep RAC-H, zastosowany następnie w immunoprofilaktyce swoistej tego schorzenia (16). Szeroko zakrojone badania nad etiologią ronień u klaczy przeprowadzone w latach 1949-1971 wykazały obecność herpeswirusa końskiego w tkankach 30% poronionych płodów. Po wprowadzeniu szczepień ochronnych źrebnym klaczy częstotliwość herpeswirusowego ronienia spadła do 7,8% w latach 70. (16). Badania wirusologiczne poronionych płodów wykonane w latach 90. potwierdziły główną rolę herpeswirusa końskiego typ 1 w wywoływaniu poronień u klaczy w Polsce (9). W oparciu o wykrywanie materiału genetycznego EHV-1 w leukocytach krwi obwodowej dorosłych koni nie wykazujących żadnych objawów chorobowych wykazano istnienie latencji u 24,5% badanych osobników (2). Zakażenia EHV-1 mają tendencje

do enzootycznego utrzymywania się w większych skupiskach koni i są trudne do eliminacji pomimo masowych szczepień ochronnych. Przeciwciała poszczepienne oraz zakażenia latentne uniemożliwiają zastosowanie testów serologicznych do wykrywania i eliminowania ewentualnych nosicieli tego wirusa. Wykazano również swoiste sekwencje EHV-1 w leukocytach koni przy jednoczesnym braku przeciwciał swoistych dla tego wirusa w surowicy krwi (2). W tym kontekście zastosowanie w okresie kwarantanny dla koni nowo wprowadzanych do stada metody PCR wykrywającej latentne zakażenia u seronegatywnych nosicieli mogłoby w istotny sposób przyczynić się do poprawy efektów zwalczania tej choroby. Metoda amplifikacji kwasów nukleinowych zastosowana w badaniach własnych okazała się najszybszym sposobem potwierdzenia podejrzenia herpeswirusowego ronienia postawionego na podstawie wywiadu, badania klinicznego i sekcijnego. Wykrywanie antygenu EHV-1 metodą immunofluorescencji w płucach poronionych płodów jest wprawdzie szybkie, ale ze względu na znacznie niższą czułość w pewnym procencie przypadków daje wyniki fałszywie negatywne, a badanie wirusologiczne zmierzające do izolacji i identyfikacji wirusa jest bardzo czasochłonne (1).

Reasumując należy stwierdzić, że w oparciu o dane z wywiadu, badanie sekcyjne, histopatologiczne i metodę PCR ustalono, że przyczyną opisanego masowego ronienia klaczy było zakażenie herpeswirusem końskim typu 1. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie problemu, jaki stanowią te zakażenia w hodowli koni w Polsce.

Piśmiennictwo

- 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., Ballaghy-Pordany A., Timoney P. J., McCollum W. H., Little T. V., Hyllseth B., Klingeborn B.: Evaluation of nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. [w:] *Proc. 7th Int. Conf. Equine Inf. Dis. R&W publications*, Newmarket, UK 1994, s. 33-38.
- Golnik W.: Wirusowe zapalenie tętnic koni. *Życie Wet.* 1993, 68, 9-12.
- Grądzki Z.: Przydatność wybranych metod ekstrakcji RNA do wykrywania wirusa TGE w hodowli komórkowej i kale słoń metodą RT-PCR. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 423-426.
- Hong C. B., Donahue J. M., Giles R. C., Petrites-Murphy M. B., Poonacha K. B., Roberts A. W., Smith B. J., Tramontin R. R., Tuttle P. A., Swerczek T. W.: Etiology and pathology of equine pencestis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, 5, 56-63.
- Lawrence G. L., Gilkerson J., Love D. N., Sabine M., Whalley J. M.: Rapid, single-step differentiation of equid herpesviruses 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus specific primers. *J. Virol. Methods.* 1994, 47, 59-72.
- Paccamonti D. L.: Abortion. [w:] *The horse, diseases and clinical management*. Ed. Kobluk C. N., Ames T. R., Geor R. J., Saunders W. B. Company, Philadelphia 1995.
- Rola J., Żmudzinski J.: Herpeswirus koński typ 1 (EHV-1) przyczyną poronień u klaczy w Polsce. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 268-269.
- Studdert M. J.: Herpesviridae. [w:] *Virus infectious of vertebrates*, vol. 6, 9-31, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands 1996.
- Swerczek T. W.: Identifying the bacterial causes of abortion in mares. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1991, 86, 1210-1216.
- Swerczek T. W.: The most common viral causes of equine abortion. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1991, 86, 1205-1208.
- Winiarczyk S., Osek J., Grądzki Z., Nozdryn-Plotnicki Z.: Sporadyczne ronienie u klaczy na tle zakażenia *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 205-207.
- Wiśniewski E., Dąbrowska J.: Wczesna obumieralność zarodków, ronienia i przedwczesne porody u klaczy. *Życie Wet.* 1996, 71, 41-46.
- Wółoszyn S., Rubaj B.: Influenza a wirusowe ronienie klaczy. *Medycyna Wet.* 1960, 16, 710-716.
- Woyciechowska S., Kita J., Frymus T.: Sytuacja epizootologiczna ronień na tle wirusa rhinopneumonitis equorum w Polsce. *Medycyna Wet.* 1980, 36, 388-391.

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk, ul. Popieluski 26, 20-052 Lublin