

# Przypadki występowania końskiego herpeswirusa typu 2 (EHV-2) związane z zakażeniami układu oddechowego lub zaburzeniami neurologicznymi<sup>\*</sup>

MARCIN W. BAÑBURA, ANNA CHMIELEWSKA, ANNA TUCHOLSKA, HANNA SENDECKA\*, MAGDALENA RZEWUSKA\*\*, TOMASZ DZIECIĄTKOWSKI

Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii, \*Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej Katedry Nauk Przedklinicznych, \*\*Zakład Patologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Bañbura M. W., Chmielewska A., Tucholska A., Sendeczka H., Rzewuska M., Dzieciatkowski T.

## Outbreak of equine herpes virus type-2 (EHV-2) infections in relation to respiratory or neurological symptoms

### Summary

The article describes three cases of equine herpes virus type-2 (EHV-2) infection in race horses. A three-year old mare E. and three-year old stallion W. of Arabian bred showed symptoms of pneumonia and pleuropneumonia. Bacteriological examination of nasal swabs demonstrated the presence of *Pseudomonas aeruginosa* in stallion W. which died on day 16 following the onset of illness. A two-year old stallion L. of English bred showed severe neurological symptoms such as ataxia and inability to maintain a standing position. This stallion underwent euthanasia on day 4 after the onset of the first symptoms. Bacteriological examinations of brain samples demonstrated the presence of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Haematoxylin-eosin stained sections of brain exhibited acute, non-purulent lymphocyte encephalitis.

Nested PCR detected the presence of EHV-2-specific sequences in DNA extracted from the peripheral blood leukocytes of all three horses and the virus was isolated in equine dermal (ED) cell cultures.

The results indicated that both the respiratory as well as neurological symptoms were caused by bacterial infections. It would be tempting to speculate that the immunosuppressive properties of EHV-2 played an important role in the severity of the observed symptoms.

**Keywords:** EHV-2, pneumonia, neurological disorders

Spośród dziewięciu herpeswirusów wywołujących zakażenia u koni, sześć należy do podrodziny  $\alpha$ -*Herpesvirinae* (EHV-1, 3, 4, 6, 8 i 9), trzy natomiast (EHV-2, EHV-5 i EHV-7) zaliczono do podrodziny  $\gamma$ -*Herpesvirinae* (14). Z ekonomicznego punktu widzenia największe znaczenie mają zakażenia EHV-1 powodującym ronienia, zaburzenia neurologiczne i układu oddechowego oraz EHV-4 wywołującym *rhinopneumonitis* (1, 24). W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się EHV-2, którego występowanie stwierdzano w wielu regionach świata – w Europie, Stanach Zjednoczonych, Australii i Nowej Zelandii (3, 9, 11, 18, 23). Mimo iż zakażenia EHV-2 należą do najpowszechniejszych zakażeń wirusowych u koni w Europie (5, 15, 17), a w Nowej Zelandii jest on wirusem najczęściej izolowanym od zwierząt wykazujących objawy chorobowe ze strony układu oddechowego (7, 8), jego rola w patogenezie zakaźnych chorób koni nie jest jasno określona. Uważa się natomiast, że EHV-2

prowadzi do immunosupresji, ogólnego pogorszenia kondycji zwierzęcia oraz zakażeń wtórnym, np. *Rhodococcus equi* (2, 3, 17, 16).

W ostatnich latach EHV-2 izolowano także w Polsce (20), a uzyskane wyniki badań nie odbiegają od danych publikowanych przez innych autorów – obecność wirusa stwierdzano w leukocytach krwi obwodowej zarówno u koni zdrowych, jak i wykazujących objawy ze strony układu oddechowego. W nielicznych przypadkach wirus izolowano także od zwierząt z zaburzeniami neurologicznymi o różnym nasileniu, nie istniały jednak żadne przesłanki do łączenia objawów neurologicznych z zakażeniem EHV-2.

We wrześniu 2002 r. do Pracowni Wirusologii Katedry Nauk Przedklinicznych zgłoszono 2 przypadki zachorowań koni przebiegające z objawami ciężkiego zapalenia płucnej, a w marcu 2003 – jeden przypadek ze znacznie nasilonymi objawami neurologicznymi.

Celem przeprowadzonych badań było określenie przyczyny zachorowań i identyfikacja czynnika zakaźnego.

<sup>\*</sup> Praca finansowana częściowo w ramach grantu KBN Nr 3 PO6K 006 24.

## Materiał i metody

Badaniem objęto trzy konie sportowe. Dwa z nich, klacz E. i czteroletni ogier W. czystej krwi arabskiej, wykazywały objawy ze strony układu oddechowego – u klaczy E. stwierdzono objawy nieżytowego zapalenia górnych dróg oddechowych, natomiast u ogiera W. obserwowano nasilone objawy ostrego, obustronnego zapalenia płucnej. W piątym dniu choroby od obu koni pobrano krew do badań wirusologicznych, a w czternastym dniu – wymazy z nozdrzy do badania bakteriologicznego.

Mimo intensywnej terapii polegającej na podawaniu antybiotyków, preparatów bodźcowych i, w późniejszej fazie, płukania jamy płucnowej, ogier W. padł w szesnastym dniu choroby.

U trzeciego zwierzęcia, dwuletniego ogiera L. pełnej krwi angielskiej, obserwowano objawy neurologiczne – niezborność ruchową i niezdolność do utrzymania pozycji stojącej. W drugim dniu choroby pobrano krew oraz, po eutanazji w czwartym dniu od wystąpienia objawów neurologicznych, mózg do badań wirusologicznych. W tym celu fragmenty tkanki zamrożono do czasu ekstrakcji DNA i wykonania PCR. Mózg poddano również badaniu bakteriologicznemu, a jego wycinki utrwalono w 10% buforowanej formalinie w celu wykonania badania histopatologicznego.

Z próbek krwi pobieranych „na skrzep” uzyskiwano surowicę i testem podwójnej immunodiffuzji (DID) wg Woyciechowskiej (25) wykonywano serologiczne badanie w kierunku zakaźnego ronienia klaczy.

Z próbek krwi pobieranych do płynu RPMI z dodatkiem heparyny izolowano leukocyty (12), z których część użyto do izolacji wirusa techniką hodowli wspólnej (kokulturywacji) w hodowlach komórek skóry konia (linii ciągłej ED). Hodowle wspólne inkubowano 5 dni w temperaturze 37°C, po czym wykonywano pasaż komórek ED i obserwowano hodowle do chwili wystąpienia efektu cytopatycznego (CPE). Wynik izolacji uznawano za ujemny, jeśli w trzech kolejnych pasażach komórek nie stwierdzano CPE.

Podjęto także próbę izolacji wirusa z mózgu konia wykazującego objawy neurologiczne – fragmenty tkanki rozcierano w jałowym homogenizatorze szklanym, wykonywano 10% zawiesinę w jałowym PBS z dodatkiem antybiotyków, 0,1 ml wprowadzano do 24-godzinnej hodowli komórek ED i inkubowano 5 dni w temperaturze 37°C. W przypadku braku efektu cytopatycznego wykonywano pasaż komórek i inkubowano hodowlę przez kolejne 5 dni. Wynik izolacji uznawano za ujemny, jeśli w trzech kolejnych pasażach nie występował efekt cytopatyczny.

Z pozostałych leukocytów oraz z zamrożonej próbki mózgu izolowano DNA (22) i wykonywano nested PCR ze starterami specyficznymi dla EHV-1 (4), EHV-2 (5) i EHV-5 (19).

Badanie bakteriologiczne wycinków mózgu, pobieranych z kory mózgowej i z głębszych warstw należących do węc-

mózgowie, oraz wymazów z nozdrzy wykonano, stosując podłoża agar wzbogacony krwią i McConkeya. Posiewy inkubowano 24-48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Identyfikacji wyizolowanych szczepów bakteryjnych dokonano w oparciu o analizę właściwości biochemicznych oznaczanych przy pomocy testów API (Bio Mérieux, Francja). Dodatkowo wykonano badanie mikroskopowe bezpośrednich preparatów odciskowych z materiału badanego, barwionych metodą Grama.

Fragmenty mózgu utrwalone w formalinie zatapiano w parafinie według standardowej procedury. Skrawki mikrotomowe grubości 4 µm barwiono metodą hematoksyliny-eozyna i oglądano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60 wyposażonym w kamerę cyfrową. Dokumentację fotograficzną sporządzano przy pomocy programu Micro Image 4.0.

## Wyniki i omówienie

Zbiórcze wyniki wirusologicznego badania surowicy i krwi obwodowej oraz bakteriologicznego badania wymazów i wycinków mózgu przedstawia tab. 1.

W próbkach surowicy techniką DID nie stwierdzono obecności przeciwciał anti-EHV-1. Badanie leukocyturnego DNA techniką nested PCR nie wykazało obecności sekwencji specyficznych dla EHV-1 i EHV-5. We wszystkich trzech przypadkach stwierdzono natomiast występowanie sekwencji specyficznych dla EHV-2, przy czym u dwóch zwierząt z objawami ze strony układu oddechowego produkt reakcji widoczny był po II rundzie amplifikacji, podczas gdy u konia z objawami neurologicznymi – już po I rundzie.

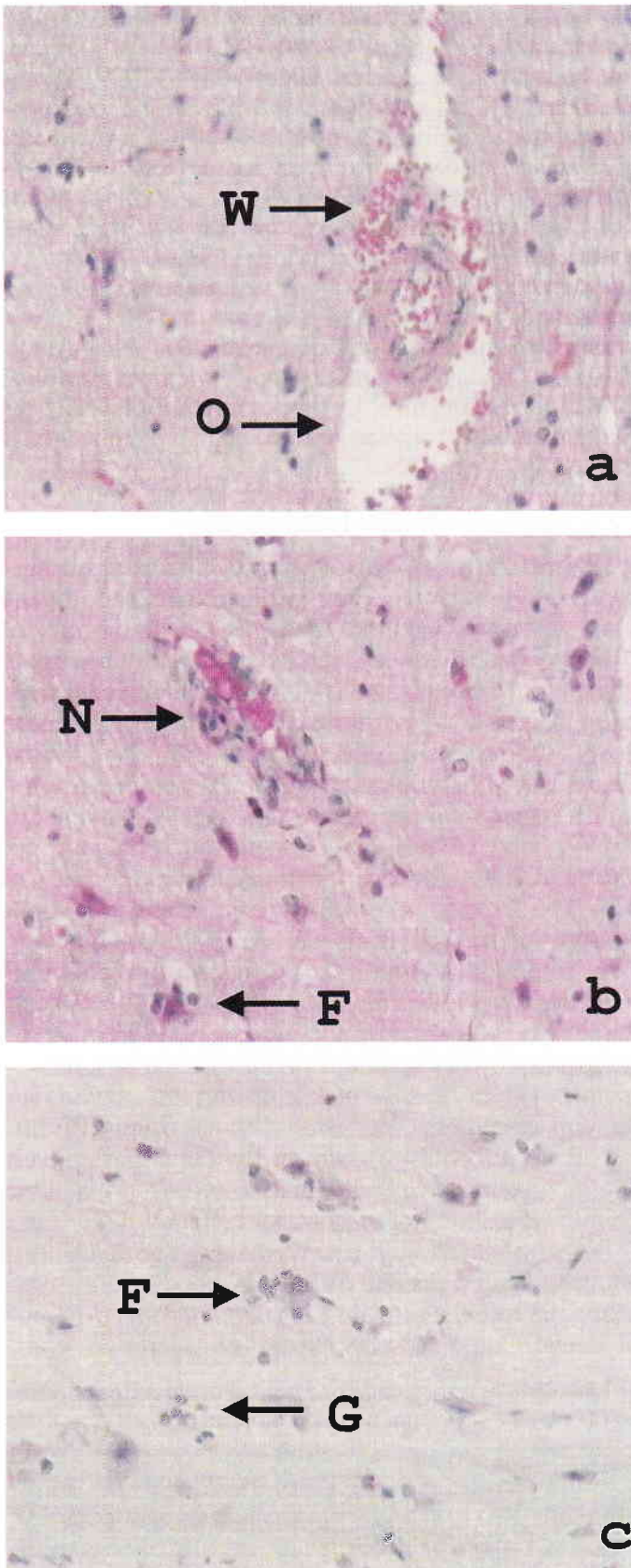
W hodowlach komórek ED wirus wyizolowano z leukocytów krwi obwodowej wszystkich trzech zwierząt. Efekt cytopatyczny pojawiał się już w pierwszym pasażu hodowli wspólnej i przejawiał się powstawaniem pojedynczych łysinek z ułożonymi obwodowo dużymi syncytiami. W następnych pasażach CPE pojawiał się już po 24 godzinach i w ciągu następnych 48 godzin obejmował większość komórek, prowadząc do niemal całkowitego zniszczenia hodowli.

Badanie bakteriologiczne wymazów z górnych dróg oddechowych wykazało u klaczy E. obecność licznych drobnoustrojów z rodzaju *Corynebacterium*,  $\beta$ -hemolitycznych paciorkowców i koagulazo-ujemnych gron-

Tab. 1. Wyniki wirusologicznego i bakteriologicznego badania koni chorujących z objawami ze strony układu oddechowego (o) oraz z objawami neurologicznymi (n)

Badane zwierzę	Badanie wirusologiczne krwi				izolacja wirusa	Badanie bakteriologiczne wymazów z nozdrzy (n) oraz wycinków mózgu (w)
	DID EHV-1	EHV-1	nested PCR EHV-2	EHV-5		
E/o	-	-	+/2	-	+	<i>Corynebacterium</i> sp. (n) <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolityczny <i>Staphylococcus</i> sp. koagulazo-ujemny
W/o	-	-	+/2	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n)
L/n	-	-	+/1, 2	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> , (w) <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>

Objaśnienia: +/2 – wynik dodatni po II rundzie amplifikacji, +/1, 2 – wynik dodatni po I i II rundzie amplifikacji



Ryc. 1. Zmiany histopatologiczne w mózgu ogiera L. poddanego eutanazji z powodu ciężkich objawów neurologicznych (powiększenie mikroskopu 200 ×): a – okołonaczyniowy obrzęk (O) i wynaczynienie (W); b – okołonaczyniowy naciek komórek jednojądrzastych (N), zmiany wsteczne w neuronach i neuronofagia (F); c – zmiany wsteczne w neuronach i neuronofagia (F), guzek glejowy pozostały po uprzątnięciu uszkodzonego neuronu przez komórki glejowe (G)

kowców, natomiast u ogiera W. stwierdzono liczne pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*.

Z tkanki mózgowej ogiera L. wykazującego objawy neurologiczne wyhodowano *Staphylococcus aureus* i  $\beta$ -hemolitycznego *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. W preparacie bezpośrednim stwierdzono liczne skupiska Gram-dodatnich ziarniaków.

W skrawkach histopatologicznych z mózgu konia stwierdzono silne rozszerzenie i wypełnienie krwią naczyń krwionośnych, wynaczynienia oraz znacznego stopnia poszerzenie okołonaczyniowych przestrzeni chłonnych (ryc. 1a). Wokół naczyń krwionośnych występowały również nacieki zapalne o niewielkim nasileniu złożone z komórek jednojądrzastych (ryc. 1b). Obserwowano również rozplam komórek glejowych, głównie mikrogleju, o charakterze zarówno ogniskowym, jak i rozlanym. Widoczne były także zmiany wsteczne w komórkach zwojowych, wyrażające się rozpadem chromatyny jąder komórkowych i obkurczeniem lub obrzękiem i rozplynnieniem komórek. Neurony takie otoczone były komórkami glejowymi, których zadaniem było ich uprzątanie (ryc. 1a, 1c). Zjawisko takie określane jest mianem neuronofagii. Obraz ten jest uznawany za charakterystyczny dla ostrego, nieropnego limfocytarnego zapalenia mózgu (*encephalitis lymphocytaria nonpurulenta acuta*) (13).

Mimo wyraźnych objawów chorobowych u badanych zwierząt interpretacja uzyskanych wyników nie jest łatwa. EHV-2 uważany jest bowiem za czynnik zakaźny słabo chorobotwórczy w warunkach naturalnych i powodujący raczej osłabienie ogólnej kondycji zwierzęcia (2, 17) (general malaise and poor performance), a nie konkretną jednostkę chorobową. W trakcie prowadzonych badań zauważono jednak, że we wszystkich trzech przypadkach izolacja wirusa z leukocytów krwi obwodowej była bardzo łatwa – efekt cytopatyczny w hodowlach komórkowych obserwowano już w pierwszym pasażu i znacznie nasilał się w następnych pasażach – pojawiał się już po 24 godzinach i w ciągu następnych 48 godzin prowadził do niemal całkowitego zniszczenia hodowli. Szczepy izolowane wcześniej od zwierząt zdrowych (20, 21) powodowały na ogół słaby efekt cytopatyczny przejawiający się powstawaniem pojedynczych łysinek i syncytiów, a efektywne pasażowanie wirusa wymagało wykonywania pasażu samej zakażonej hodowli komórkowej. Wydaje się zatem, że istnieje związek między intensywnością replikacji wirusa *in vitro* a nasileniem objawów klinicznych u zakażonych zwierząt. Jeśli przyjąć, że dynamika replikacji *in vitro* zbliżona jest do dynamiki replikacji *in vivo* i jest ona wyznacznikiem zjadliwości wirusa, to udział opisywanych szczepów w patogenezie tych trzech przypadków klinicznych można wyjaśnić intensywną replikacją wirusa w leukocytach. Ponieważ uważa się że EHV-2 może działać immunosupresyjnie (2, 6, 17), można ostrożnie założyć, iż w objętych badaniami trzech przypadkach zakażenie EHV-2 istotnie prowadziło do wtór-

nych, wikłających zakażeń bakteryjnych. Świadczy o tym duże nasilenie objawów zakażenia oraz, w przypadku zwierzęcia wykazującego objawy neurologiczne, duża ilość wirusa w leukocytach krwi obwodowej i obecność gronkowca złocistego i  $\beta$ -hemolitycznego paciorkowca w posiewach z mózgu. Nieprawdopodobne wydaje się wprawdzie, by doszło do bezpośredniego bakteryjnego zakażenia tkanki nerwowej i, choć nie wykonano posiewów z krwi, uzyskane wyniki badania bakteriologicznego tłumaczyć należy bakteriami. Hipoteza ta nie jest pozbawiona podstaw – u EHV-2 znaleziono bowiem gen homologiczny z genem interleukiny 10 (IL-10). IL-10 pełni w organizmie funkcje, które w efekcie prowadzą do zahamowania odpowiedzi komórkowej i zapalnej (10). Ponadto, zakażenie EHV-2 prowadzi do zahamowania transkrypcji chemokiny MCP-1, czynnika chemotaktycznego dla monocytów i komórek NK, co w konsekwencji powoduje upośledzenie funkcjonowania mechanizmów obronnych gospodarza i ułatwia zakażenie innymi czynnikami (6).

Komentarza wymagają również wyniki badania histopatologicznego. Wydaje się, że obserwowane zmiany charakterystyczne dla ostrego, nieropnego limfocytarnego zapalenia mózgu mogły być przyczyną ciężkich objawów neurologicznych. Nie można jednak jednoznacznie rozstrzygnąć, jaka była przyczyna obserwowanych zmian. Duża ilość wirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej wskazuje na to, iż badanie wykonano w fazie wirerii wywołanej wyjątkowo dynamicznie replikującym się wirusem, jednak w tkance mózgowej obecności wirusa nie stwierdzono. Wydaje się zatem mało prawdopodobne, by zmiany histopatologiczne w mózgu spowodowane były samą wiracją i nasuwa się przypuszczenie, że zmiany te i towarzyszące im objawy neurologiczne mogły być spowodowane uogólnionym zakażeniem bakteryjnym. Zarówno gronkowiec złocisty, jak i  $\beta$ -hemolityczny paciorkowiec wytwarzają bowiem liczne toksyny i enzymy o właściwościach cytotoksycznych.

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych wskazują, że za ostateczny obraz kliniczny obserwowany w opisanych przypadkach odpowiedzialne są czynniki bakteryjne, chociaż związek zachorowań z zakażeniem EHV-2 wydaje się prawdopodobny.

## Piśmiennictwo

- Allen G. P., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections, *Prog. Vet. Mic. Imm.* 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, *Zbl. Vet. Med.* 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, *Can. J. Microbiol.* 1975, 21, 1940-1946.
- Borchers K., Slater J.: A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4, *J. Virol. Meth.* 1993, 45, 331-336.
- Borchers K., Wolfinger U., Golz M., Broll H., Ludwig H.: Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections, *Arch. Virol.* 1997, 142, 917-928.
- Dunowska M., Meers J., Johnson R. D., Wilks C. R.: Influence of equine herpesvirus type 2 infection on monocyte chemoattractant protein 1 gene transcription in equine blood mononuclear cells, *Res. Vet. Sci.* 2001, 71, 111-113.
- Dunowska M., Wilks C. R., Studdert M. J., Meers J.: Viruses associated with outbreaks of equine respiratory disease in New Zealand, *New Zealand Vet. J.* 2002, 50, 132-139.
- Dunowska M., Wilks C. R., Studdert M. J., Meers J.: Equine respiratory viruses in foals in New Zealand, *New Zealand Vet. J.* 2002, 50, 140-147.
- Gleeson L. J., Studdert M. J.: Equine herpesviruses, Experimental infection of a foetus with type 2, *Aust. Vet. J.* 1977, 53, 360-362.
- Golqb J., Jakóbsiak M., Zagożdżon R.: Cytokiny, [w:] *Immunologia*, (red.) Jakóbsiak M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, 263-299.
- Holloway S. A., Studdert M. J., Drummer H. E.: Characterisation of equine herpesvirus 2 glycoprotein B, *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 1619-1629.
- Jacobsen K., Gint T., Reed S. M., Newbry J., Bayly W. M., Perryman L. E., Wes Leid R.: Isolation of equine neutrophils and analysis of functional characteristics by chemiluminescence and bactericidal assays, *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 1912-1916.
- Jubb K. V. F.: The nervous system, [w:] *Pathology of domestic animals*, Vol. 3, (red.) Jubb K. V. F., Kennedy P. C., Palmer N., Academic Press, New York, wyd. IV 1993, 267-347.
- Minson A. C., Davison A., Eberle R., Desrosiers R. C., Fleckenstein B., McGeoch D. J., Pellet P. E., Roizman B., Studdert D. M. J.: Family Herpesviridae, [w:] *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (red.) van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R., Wickner R. B. Academic Press, San Diego/San Francisco 2000, 203-225.
- Murray M. J., Eichorn E. S., Dubovi E. J., Ley W. B., Cavey D. M.: Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals, *Eq. Vet. J.* 1996, 28, 432-436.
- Nordegrahn 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.
- Palfi V., Belak S., Molnar T.: Isolation of herpesvirus type 2 from foals showing respiratory symptoms, *Zbl. Vet. Med.* 1978, 25, 165-167.
- Plummer G., Bowling C. P., Goodheart C. R.: Comparison of four horse herpesviruses, *J. Virol.* 1969, 18, 738-741.
- 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.
- Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.: Izolacja i identyfikacja herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2), *Medycyna Wet.* 2001, 57, 603-606.
- Ruszczyk A.: Izolacja i analiza szczepów herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2), Praca doktorska, Wydział Med. Wet. SGGW, Warszawa 2002.
- Strauss W. M.: Preparation of genomic DNA from Mammalian tissue, [w:] *Current Protocols in Molecular Biology*, (red.) Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York 1992, 2.2.1.-2.2.3.
- Turner A. J., Studdert M. J., Peterson J. E.: Equine herpesviruses. 2. Persistence of equine herpesvirus in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion, *Aust. Vet. J.* 1970, 46, 90-98.
- Van Maanen C.: Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update, *Vet. Quart.* 2002, 24, 57-78.
- Woyciechowska S.: Odczyn immunoprecypitacji w żelu agarowym jako metoda diagnostyczna *Rhinopneumonitis equorum*, *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1966, 18, 159-170.