

Spontaniczne zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni u ogierów

WITOLD GOLNIK, BARBARA SORDYL

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Katedry Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Golnik W., Sordyl B.

Spontaneous infections of Equine Arteritis Virus in stallions

Summary

The most significant consequence of EAV infections is the length of their carrier state and shedding the virus through the sperm of some stallions that have recovered from EAV infection. These animals contribute to the persistence of this virus in the horse population. Their elimination is the most important aspect of preventing this disease. 2642 stallions were serologically investigated between 1997–2002. Sperm was collected from sero-positive horses for virological investigation. The cytopathic agents were identified using indirect immunofluorescence tests. EAV was isolated in 35 cases (14.74%).

Keywords: Equine Viral Arteritis, stallions, shedders

Chorobę zakaźną, której towarzyszy ronienie płodów przez ciężarne klacze, rozpoznano po raz pierwszy jako wirusowe zapalenie tętnic koni (Equine Viral Arteritis – EVA) w 1957 r. w Stanach Zjednoczonych, izolując wirus zidentyfikowany jako wirus zapalenia tętnic koni (Equine Arteritis Virus – EAV) (8). Wkrótce stwierdzono, że choroba ta występuje na całym świecie (2, 4, 5, 19, 20), obejmując swym zasięgiem również Polskę (10). W badaniu serologicznym, w obecności przeciwciał anti-EAV uzyskano wyniki wskazujące na szerokie rozpowszechnienie zakażenia. Tak znaczny odsetek wyników pozytywnych nie ma jednak odzwierciedlenia w ilości ostro przebiegających enzootii, co sugeruje, że choroba ma najczęściej przebieg subkliniczny (1, 9, 12, 17, 18). Niezależnie od przebiegu wirusowego zapalenia tętnic koni, najbardziej istotną konsekwencją spontanicznych zakażeń jest utrwalenie się stanu nosicielstwa i siewstwa wirusa z nasieniem u niektórych ogierów ozdrowieńców (9, 11). Zdaniem Neu i wsp. (21) oraz Timoney i wsp. (24), częstotliwość występowania długoterminowych siewców z nasieniem wynosi 35%-60%. Ogiery te przyczyniają się do utrzymania się wirusa w populacji koni.

Przez długi czas zakażenie kropelkowe przez układ oddechowy, uznawano za główną drogę zakażenia, podczas gdy infekcja drogą płciową nie była brana pod uwagę. Dopiero wybuch choroby w Kentucky w Stanach Zjednoczonych w 1984 r. udowodnił, jak wielkie straty przynosi użycie do rozplodu ogierów ozdrowieńców, siewców wirusa EA z nasieniem (26, 27). W czasie krycia takim ogierem zainfekowanych zostaje od 85% do 100% klaczy, co odzwierciedla, jak efektyw-

nym sposobem przenoszenia wirusa jest droga płciowa (13, 15, 16, 24). Klacze zakażone wirusem EA w czasie krycia sięją wirus wraz z wydzielinami i wydalnikami, stając się źródłem infekcji dla pozostałych koni w stadzie. U spontanicznie zakażonych koni często nie występują typowe dla choroby objawy kliniczne (gorączka, spadek apetytu, ogólne osłabienie, zapalenie spojówek, obrzęk powiek, łzawienie, rozpułchnienie błony śluzowej nosa, wypływy z jam nosowych, wysypka skórna oraz obrzęki kończyn, brzucha, klatki piersiowej, wymienia), lecz w przypadku klaczy ciężarnych dojsć może do resorpcji lub poronień płodów (około 40%-50% zakażonych klaczy) (2, 9, 10), co jest jedną z przyczyn największych strat w hodowli koni. Wyeliminowanie z rozrodu ogierów siewców wirusa EA z nasieniem staje się więc najważniejszym elementem postępowania przeciwepidemicznego zapobiegającego chorobie.

Celem badań było określenie odsetka ogierów siewców wirusa zapalenia tętnic koni w Polsce.

Materiał i metody

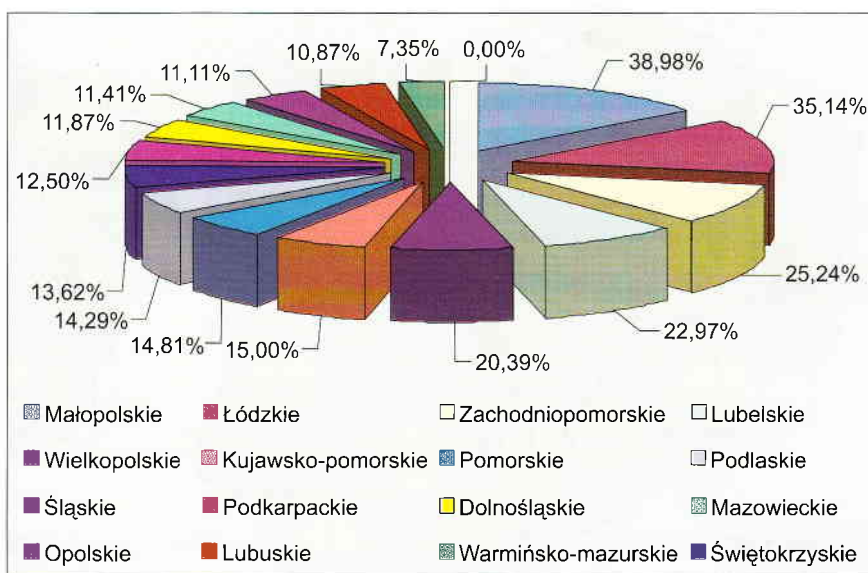
Badania przeprowadzone w okresie od 1997 r. do 2002 r. objęły 2642 ogiery pochodzące z różnych stad i stadnin na terenie kraju. W pierwszym etapie przeprowadzono badania serologiczne mające na celu wykrycie przeciwciał zobojetniających wirusa zapalenia tętnic koni. Wykonano je wg poprzednio opisanej metody, stosując zmodyfikowany odczyn zobojetniania wirusa (23). Następnie podjęto próby izolacji wirusa z nasienia serologicznie dodatnich ogierów (23). Pełne ejakulatory pobrane od 309 ogierów rozcieńczano płynem MEM Eagle'a w stosunku 1 : 20 i wirowano przy obrotach 500 g przez 10 min. Supernatantem w ob-

jętości 0,2 ml zakażano 24-godzinne hodowle komórek RK-13 i Vero. Hodowle te prowadzono w 24-dołkowych płytkach polistyrenowych, w środowisku o składzie: Minimum Essential Medium (MEM) Eagle'a – 90%, surowica płodu bydłęcego – 10%, w osłonie antybiotykowej (penicylina 200 j.m./ml, streptomycyna 200 µg/ml, amfoterycyna B 10 µg/ml). Inkubację hodowli prowadzono w termostacie z dopływem CO₂ w temperaturze 37°C. Płytki oglądano codziennie w mikroskopie odwróconym w celu wykrycia efektu cytopatycznego (CPE). W przypadku braku CPE w pierwszym pasażu badanego nasienia wykonywano trzy dalsze pasáže w odstępach 4-dniowych. Brak zmian cytopatycznych w hodowlach komórkowych w trakcie pasażu od 1 do 4 uważano za wynik negatywny, świadczący o niewystępowaniu wirusa w badanym materiale. Czynniki cytotatogenne identyfikowano za pomocą immunofluorescencji pośredniej (14). Badanymi izolatami zakażano 24-godzinną hodowlę komórek nerki mały Vero w probówkach Leightona, a następnie identyfikowano z użyciem koniugatu, który stanowiły przeciwciała królika immunizowanego surowicą końską, znakowane izotiocjanianem fluoresceiny – FITC (Sigma). Po 24-48 godz. inkubacji zakażonej hodowli komórek obserwowano ich zaokrąglanie, a niektóre z nich odklejały się od szkiełek w probówkach Leightona. Ponadto można było zauważyć niewielką liczbę charakterystycznych ziarnistości w cytoplazmie w rejonie okołojądrowym. Wynik pozytywny odczynu IF manifestował się jasnozielonym barwieniem cytoplazmy komórek wykazujących typowy dla wirusa efekt cytopatyczny. Komórki nie zakażone nie wykazywały swoistych barwień fluorescencyjnych. Jako kontrolę wykonania próby przeprowadzono barwienie hodowli Vero nie zakażonej wirusem (próba ujemna) oraz hodowli Vero zakażonej wzorcowym szczepem Bucyrus EAV (próba dodatnia).

Do analizy statystycznej wyników badań serologicznych i wirusologicznych zastosowano program Statistica 6 PL (oprogramowanie StafSoft), z użyciem testu chi-kwadrat oraz chi-kwadrat wyrażanego za pomocą oczekiwanego stosunku pewnych wielkości, przyjmując $p < 0,05$ i $df = 5$.

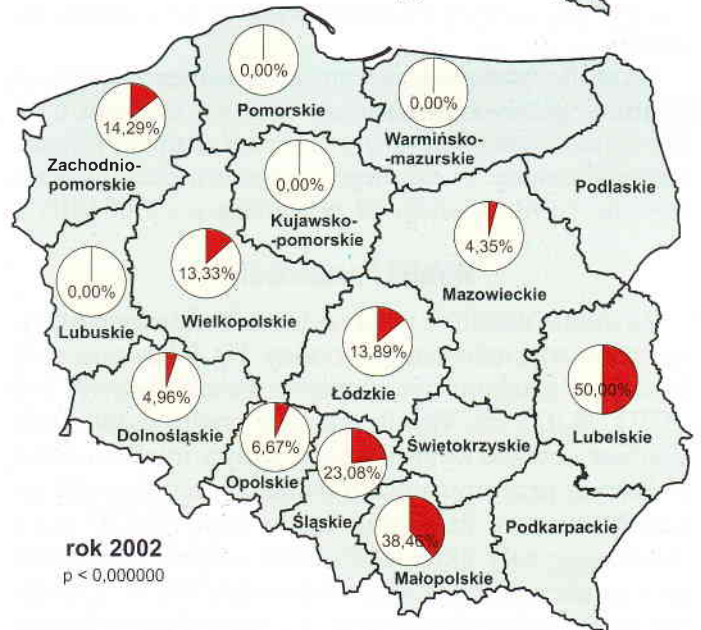
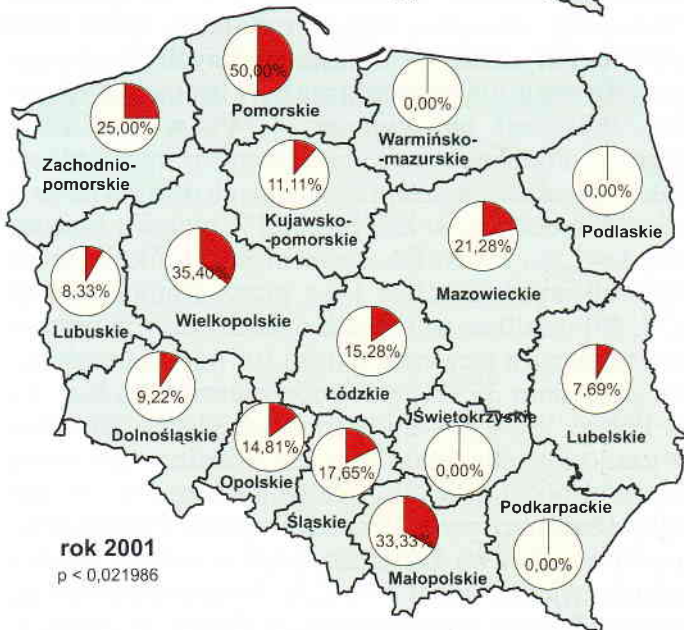
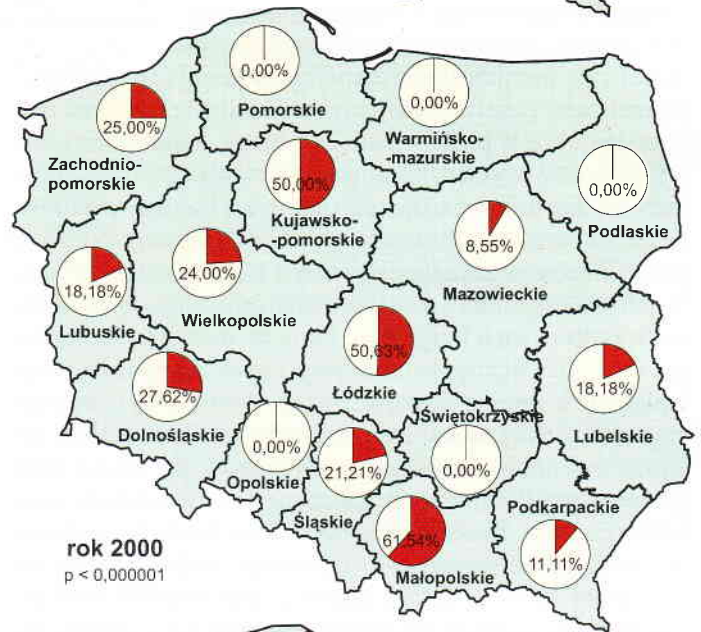
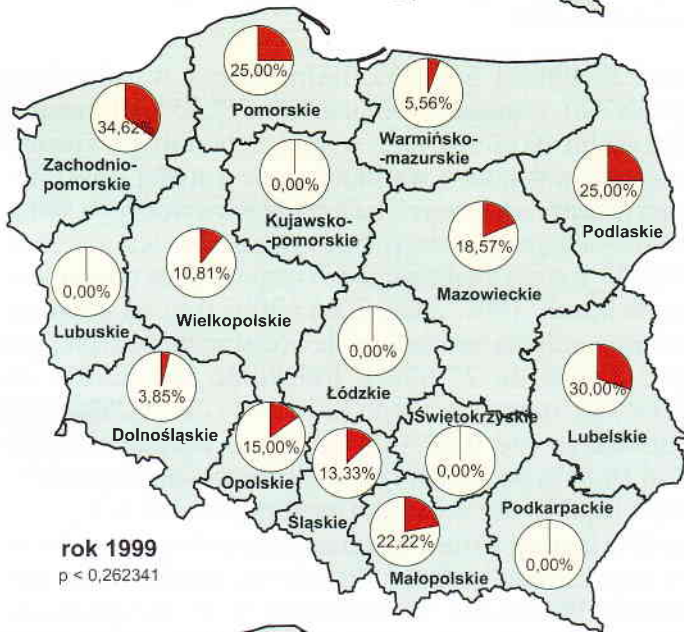
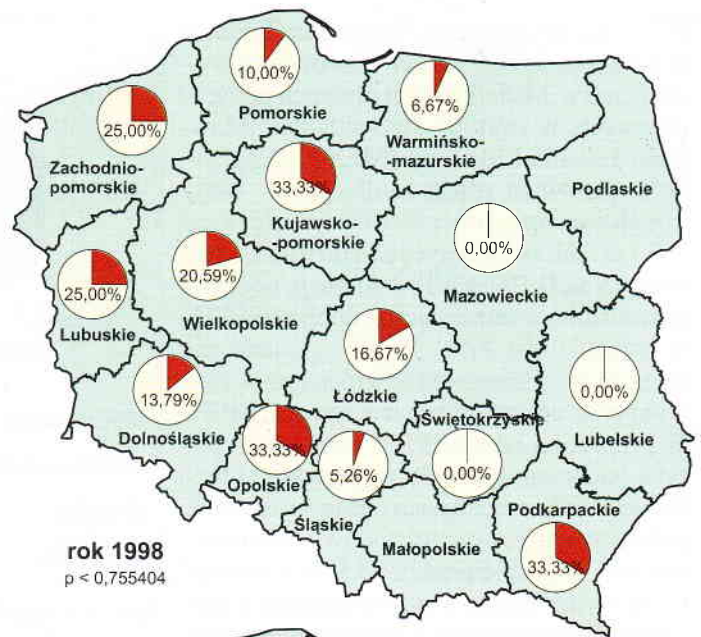
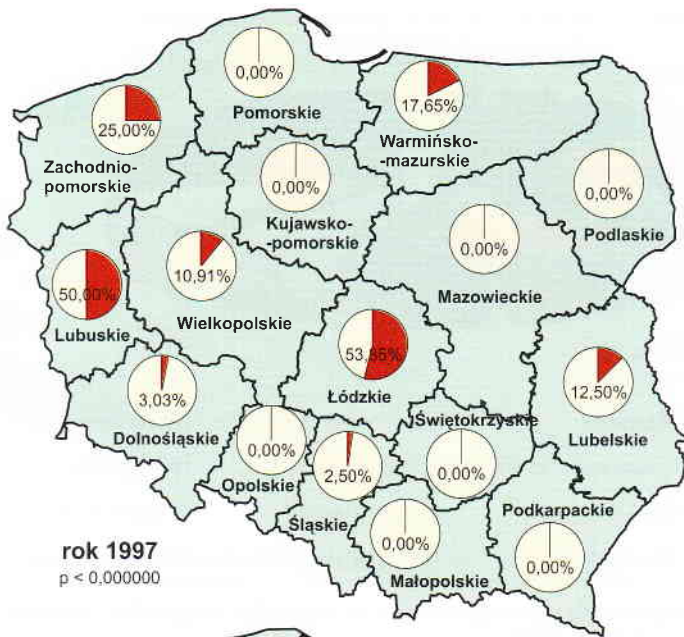
Wyniki i omówienie

Za miano dodatnie w odczynie zubożniania przyjmowano rozcieńczenie surowicy 1 : 4 lub powyżej, hamujące działanie cytopatyczne wirusa w dawce 100 TCID₅₀/0,025 ml. Wynik taki otrzymano u 461 koni. Zaobserwowano wysoce istotny wpływ miejsca i roku, w którym przeprowadzano badania, na wskaźnik zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni (WZW_EA). Analizując cały okres 1997-2002 można stwierdzić, że w poszczególnych województwach WZW_EA różnią się od siebie istotnie (ryc. 1). Najwyższe wskaźniki zakażeń wirusem EA odnotowano w województwach: małopolskim i łódzkim – sięgały one odpowied-



Ryc. 1. Udział poszczególnych województw w wartości wskaźnika zakażeń wirusem EA w latach 1997-2002

nio 38,98% i 35,14%, najniższe – w lubuskim (10,87%), warmińsko-mazurskim (7,35%) i świętokrzyskim (0,00%), lecz w tym ostatnim przypadku wartość wskaźnika wynikać może z małej ilości badań przeprowadzonych na terenie województwa świętokrzyskiego. Istotne różnice pomiędzy wartościami WZW_EA dla analizowanych województw odnotowano w latach: 1997, 2000, 2001 i 2002 (ryc. 2). Różnice te wystąpiły na terenach województw: dolnośląskiego (od 3,03% do 27,62%), łódzkiego (od 0,00% do 53,85%), mazowieckiego (od 0,00% do 21,28%), pomorskiego (od 0,00% do 50,00%), wielkopolskiego (od 10,81% do 35,40%) i lubelskiego – na pograniczu 0,05 (0,00% do 50,00%). Drugi etap badań polegał na próbie izolacji wirusa EA z nasienia tych ogierów, które w poprzednim badaniu okazały się serologicznie dodatnie. Wirusa EA wyizolowano w 35 przypadkach. Wskaźnik siewstwa wirusa zapalenia tętnic koni (WSW_EA) różnił się w poszczególnych latach i województwach, ale różnice te nie były istotne statystycznie. Wskaźnik ten wynosił 14,74% w skali kraju (ryc. 3). Podobne wyniki otrzymano w latach ubiegłych, w badaniach przeprowadzonych w kraju na terenie kilku stadnin, w których 11,1% ogierów okazało się siewcami wirusa EA z nasieniem (7). Z kolei w badaniach wykonanych w USA przez Timoney i wsp. (24, 25) ustalono, że odsetek ogierów ozdrowieńców, pozostających siewcami wirusa EA poprzez nasienie, sięga średnio 33,9%, jest więc znacznie wyższy niż w Polsce. Występowanie stanu nosicielstwa i siewstwa wirusa zapalenia tętnic koni jest zróżnicowane wśród ogierów pochodzących z różnych stadnin (6). W jednym z badanych przez Timoneya stad nie wykryto przypadków siewstwa EAV, natomiast w innych odsetek takich zwierząt sięgał 47% (25). Wyniki te pokrywają się z badaniami prowadzonymi w Polsce. W jednej ze stadnin odsetek ogierów siewców wynosił ponad 33%, podczas gdy w innej – 9,5%.



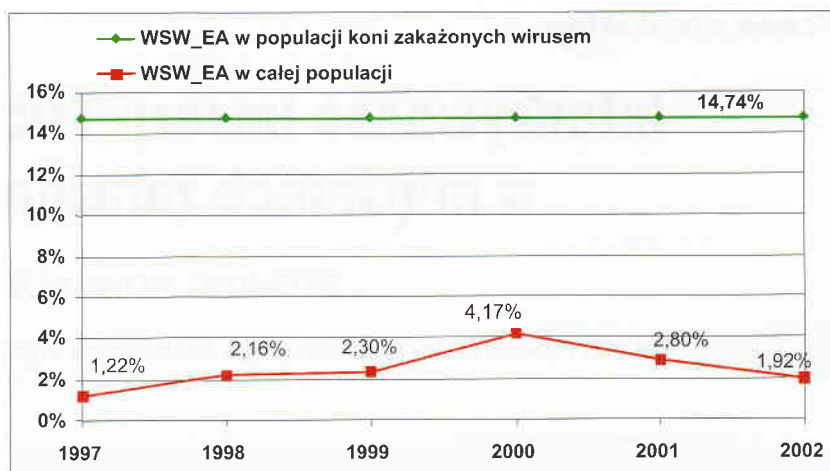
Ryc. 2. Wskaźnik zakażenia wirusem EA w latach 1997-2001

Ogierzy siewcy są głównym źródłem utrzymywania się wirusa w populacji koni. Spontanicznie zakażone ogierzy przyjęto dzielić na 3 kategorie (29): siewców krótkoterminowych, siejących wirus przez 2-5 tygodni, średnioterminowych, siejących wirus przez 3-8 miesięcy i długoterminowych, siejących wirus przez wiele lat, czasami do końca życia. W przypadku zakażonych klaczy i wałachów nie notowano długotrwałego siewstwa. Może wystąpić u nich jedynie krótkotrwałe siewstwo wraz z wydzielinami błony śluzowej nosogardzieli, ze śliną, moczem, kałem czy wydzieliną z worka spojówkowego. Zakażenie przez kontakt pośredni, np. przez obsługę jest możliwe, lecz nie odgrywa większej roli w rozprzestrzenianiu się wirusa EA. Ze względów epizootycznych podstawowe znaczenie ma zakażone wirusem nasienie. Obserwacje ogierów – długoterminowych siewców wykazały, że wirus EA utrzymuje się stale w nasieniu, a jego ilość waha się nieznacznie (25). Brak jest danych na temat okresowego wstrzymania siewstwa u takich ogierów (28). Wprawdzie Timoney obserwował 7-8 miesięczną przerwę w występowaniu wirusa w nasieniu siejącego ogiera, lecz nie znalazło to potwierdzenia w jego późniejszych pracach ani w pracach innych autorów (22, 25). Nie obserwowano nawrotu siewstwa w późniejszych latach u ogierów określanych jako siewcy krótkoterminowi (28). Do tej pory nie udało się również ustalić, co decyduje o tym, czy ogier ozdrowieniec stanie się siewcą krótko- czy długoterminowym. Jako źródło wirusa EA groźne jest nie tylko nasienie świeże. Użycie do inseminacji pełnowrażliwych klaczy nasienia schłodzonego lub mrożonego, zawierającego wirus może również stać się przyczyną wybuchu wirusowego zapalenia tętnic koni. Zdaniem niektórych autorów, nasienie masturbujących się ogierów może być także źródłem zakażenia dla innych koni w stadzie (3).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na konieczność okresowych badań serologicznych, a w przypadku wyników dodatnich konieczne jest wirusologiczne badanie nasienia. Eliminacja ogierów siewców z rozrodu jest, obok działań profilaktycznych, najważniejszym postępowaniem zapobiegającym wybuchom wirusowego zapalenia tętnic koni.

Piśmiennictwo

1. Akashi H., Konishi S., Ogata M.: Studies on equine viral arteritis. II. A serological survey of equine viral arteritis in horses imported in 1973/74. Jap. J. Vet. Sci. 1975, 38, 71-73.
2. Bürki F., Gerber H.: Ein virologisch gesicherter Grossausbruch von Equiner Arteritis. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 1966, 79, 391-395.
3. Bürki F., Hofer A., Nowotny N.: Objective data plead to suspend import-bans for seroreactors against equine arteritis virus except for breeder stallions. J. Appl. Anim. Res. 1992, 1, 31-42.
4. Cancellotti F. M., Renzi M.: Equine Arteritis (EAV) in Italy: current situation. Proc. 6th Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Cambridge 1991, s. 305.
5. Cecarelli A., Agrimi P., Piragino S.: Recherches serologiques sur arterite virale en Italie. Zooprofilassi 1972, 78, 245-256.
6. Chirnside E. D.: Equine Arteritis Virus: an overview. Br. Vet. J. 1992, 148, 181-197.



Ryc. 3. Zmiany wskaźnika siewstwa wirusa zapalenia tętnic koni (WSW_EA) w latach 1997-2002

7. Cierpisz J.: Rozprzestrzenianie zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni u ogierów użytkowanych w rozrodzie. Praca dokt., Wrocław 1996.
8. Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M.: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. It's differentiation from the equine abortion (influenza) virus. Cornell Vet. 1957, 47, 3-41.
9. Golnik W.: Wirusowe zapalenie tętnic koni, Międzynarod. Konf. Nauk.: Aktualne choroby wirusowe i pasożyty koni. Wrocław 1998, s. 46-53.
10. Golnik W., Michalak T.: Przypadki wirusowego zapalenia tętnic koni (arteritis equorum) w Polsce. Medycyna Wet. 1979, 35, 605-606.
11. Golnik W., Pawęska J., Dzik W.: Ogier potencjalnym źródłem zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 1991, 47, 459-461.
12. Golnik W., Pawęska J.: Występowanie zakażeń wirusem zapalenia tętnic u koni z różnych stadnin. Medycyna Wet. 1991, 47, 505-506.
13. Golnik W., Cierpisz J.: Próby użytkowania ogierów czolowych zakażonych spontanicznie wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 1994, 50, 482-483.
14. Golnik W., Sordyl B.: The detection of Equine Arteritis Virus (EAV) antigens in cell cultures using the indirect immunofluorescence antibody test. VIII Polish Conference on Cell Biology, Wrocław 2002, Cell. Mol. Biol. Lett. Suppl. 2002, 7, 276.
15. Horzinek M. C.: [w:] Virus Infections of Vertebrates. T. 6, Studdert M. J.: Virus Infections of Equines. Horzinek M. C.: Arteriviridae. Elsevier 1996, Amsterdam, s. 169.
16. Horzinek M. C.: Epidemiologia zakażeń wirusowych koni. Międzynarod. Konf. Nauk.: Aktualne choroby wirusowe i pasożyty koni. Wrocław 1998, s. 5-16.
17. Lang G., Mitchel W. R.: A serosurvey by ELISA for antibodies to EAV in Ontario racehorses. J. Equine Vet. Sci. 1984, 4, 153-157.
18. McCollum W. H., Bryans J. T.: Serological identification of infection by equine arteritis virus in horses of several countries. Proc. 3rd Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris 1972, s. 256-263.
19. McKenzie J.: Equine viral arteritis and trade in horses from the USA. Surveillance 1988, 15, 6-7.
20. Neu S. M., Timoney P. J., McCollum W. H.: Persistent infection of the reproductive tract in stallions persistently infected with equine arteritis virus. Proc. 5th Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Lexington 1987, s. 149-154.
21. Neu S. M., Timoney P. J., Lowry S. B.: Changes in semen quality in the stallion following experimental infection with equine arteritis virus. Theriogenology 1992, 37, 407-431.
22. Moraillon R., Moraillon A.: Acquisition récente dans l'épidémiologie de l'arterite a virus du cheval en France. Rec. Méd. Vét. 1974, 150, 1015-1022.
23. Timoney P. J.: Equine viral arteritis. [w:] Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties 2000, 583-586.
24. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Detection of the carrier state in stallions persistently infected with equine arteritis virus. Proc. Am. Ass. Equine Pract. 1986, 32, 57-65.
25. Timoney P. J., McCollum W. H., Murphy T. W., Roberts A. W., Willard A. W., Carswell J. G.: The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of transmission. J. Reprod. Fert. Suppl. 1987, 35, 95-102.
26. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., McDonald M. J.: Status of equine viral arteritis in Kentucky for 1986. Vet. Rec. 1987, 120, 282.
27. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine viral arteritis: epidemiology and control. J. Equine Vet. Sci. 1988, 8, 54-59.
28. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine Arteritis Virus: Significance for the stallions. equine diseases. Quart. University of Kentucky 1993, 1, 2.
29. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine viral arteritis. Vet. Clin. North Am. Equine Prac. 1993, 9, 295-309.