

Ocena występowania latentnych zakażeń herpeswirusowych u lisów hodowlanych

ARTUR RZEŻUTKA, ANDRZEJ JAKUBCZAK*, BEATA MIZAK

Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Rzeżutka A., Jakubczak A., Mizak B.

An assessment of the prevalence of latent herpesviral infections among farmed foxes

Summary

Abortions, neonatal deaths, and reproductive failures in a variety of animal species are caused by many pathogens, including alphaherpesviruses. Herpesviruses can persist in the form of a latent infection in a variety of tissues of the infected animals. In addition, the reactivation of the latent virus infection, especially in pregnant bitches, can lead to abortions or stillbirths. These problems are frequently reported on fox farms in Poland. The aim of this study was to establish if canine herpesvirus (CHV) can be considered as a viral pathogen responsible for the reproductive losses on fox farms. In the authors' study, 114 samples of internal organs of dead puppies and adult animals eliminated from breeding have been examined using polymerase chain reaction (PCR). None of the tested samples contained herpesviral DNA, the presence of which could confirm the existence of latent infections in foxes.

Keywords: canine herpesvirus, fox

Ronienia oraz choroby noworodków u wielu gatunków zwierząt są wynikiem infekcji wywoływanych przez α , β i γ herpeswirusy. Najczęściej opisuje się zakażenia α herpeswirusowe, które prowadzą do zaburzeń w rozrodzie, między innymi, u koni, bydła, świń, kotów czy psów (10, 15). Herpeswiroza psów przebiega łagodnie lub bezobjawowo. Może ona przyjąć uogólnioną postać lub też ograniczyć się do miejscowej infekcji dróg oddechowych, narządów płciowych lub układu nerwowego. Herpeswirusy zdolne są do wywoływania zakażeń latentnych, w których wirusowe DNA wbudowywane jest do komórek gospodarza będących na ogół miejscem pierwotnego wniknięcia wirusa do organizmu (1). Tkanki limfatyczne oraz komórki układu nerwowego, a w szczególności zwoje czuciowe uważane są za miejsce latencji herpeswirusowej u psów oraz innych gatunków zwierząt (3, 13, 14). Do reaktywacji zakażenia latentnego dochodzi w wyniku immunosupresji układu odpornościowego spowodowanej oddziaływaniem czynników stresogennych. Takim czynnikiem może być stres związany z ciążą lub porodem. Reaktywacja zakażenia u suk ciężarnych prowadzi do obumierania zarodków, ronień, rodzenia martwych lub niezdolnych do życia szczeniąt. Zaburzenia te coraz częściej obserwuje się na fermach lisów, na których straty osesków w okresie od

urodzenia do odsadzenia są znaczne i wynoszą ok. 25%. Liczne przypadki rodzenia słabych szczeniąt przez samice klinicznie zdrowe oraz wzrost śmiertelności osesków lisów w ciągu pierwszych 48-72 godzin życia prowadzi do obniżenia liczby odchowanych zwierząt, przyczyniając się do spadku opłacalności hodowli.

Zaburzenia obserwowane w rozrodzie lisów skłoniły autorów do podjęcia badań mających na celu ocenę występowania latentnych zakażeń herpeswirusowych u lisów jako przyczyny ronień oraz padnięć szczeniąt.

Materiał i metody

Wirus referencyjny. W badaniach wykorzystano szczep herpeswirusa psów (CHV DK2) namnażany w hodowli pierwotnej nerki psa. Szczep ten uzyskano dzięki uprzejmości prof. Maxa Appela z J. A. Baker Institute for Animal Health, Cornell University, USA.

Próbki użyte do badań wirusologicznych. W badaniach wykorzystano narządy wewnętrzne (serce, płuca, wątroba, nerka) pobrane od poronionych płodów lub padłych kilkudniowych szczeniąt lisa polarnego niebieskiego i pospolitego srebrzystego. Szczenięta (18 osobników) pochodziły z dwóch ferm lisów zlokalizowanych na terenie Lubelszczyzny, w których cyklicznie występowały problemy w odchowie szczeniąt. Do badań wirusologicznych użyto

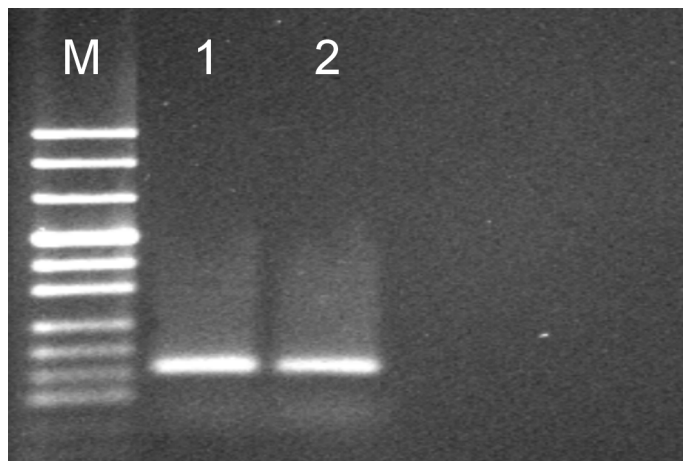
również narządów wewnętrznych pobranych od zwierząt obu płci i ras, tj. lisa polarnego i pospolitego. Były to zwierzęta stada podstawowego w wieku od 1 do 3 lat w okresie pełnej dojrzałości zimowej okrywy włosowej. Do badań pobierano: migdałki, śliniankę podżuchwową i przyuszną, macicę, wątrobę, śledzionę, węzły chłonne podżuchwowe i podbrzusne (łącznie 96 próbek). Zwierzęta były klinicznie zdrowe, nie stwierdzono u nich żadnych makroskopowo widocznych zmian w obrębie narządów rodnych. Eliminowano je ze stada podstawowego ze względu na obserwowane w sezonie 2000/2001 zaburzenia w rozrodzie objawiające się zmniejszeniem płodności, rodzeniem niezdolnych do życia szceniąt oraz wyciekami z dróg rodnych.

Fermy były pod stałym nadzorem lekarsko-weterynaryjnym, wykonywano tam szczepienia profilaktyczne zwierząt przeciwko nosowce oraz zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia lisów. Od kilku lat na fermach zaprzestano wykonywania szczepień ochronnych przeciwko zakażeniom parwowirusowym, a przeprowadzane corocznie badania serologiczne zwierząt stada podstawowego wykluczyły ich występowanie.

W okresie objętym badaniami zwierzęta żywione były zgodnie z obowiązującymi normami dla mięsożernych zwierząt futerkowych (2). Podstawowym składnikiem karmy mięsnej były odpady drobiowe, konserwowane piro-siarczynem sodu w ilości 0,1% oraz mączka mięsno-kostna importowana. Panujące na fermach warunki zoohigieniczne można uznać za dobre (dwukrotne w ciągu roku usuwanie odchodów oraz mycie klatek z wykorzystaniem myjki wysokociśnieniowej i preparatu Pollena JK).

Ekstrakcja wirusowego DNA. Z wycinków narządów wewnętrznych sporządzano 10% homogenizaty w PBS, które wirowano przez 10 min. przy $14\,000 \times g$ w celu uzyskania klarownego roztworu. Otrzymanych supernatantów używano bezpośrednio do ekstrakcji wirusowego DNA przy użyciu zestawu QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) zgodnie z instrukcją Producenta. Do reakcji PCR użyto otrzymanych roztworów DNA oraz jego rozcieńczenia 1 : 20. Wyizolowane DNA, które nie było używane bezpośrednio do badań przechowywano w temp. -85°C .

Reakcja PCR. W reakcji PCR zastosowano parę starterów przyłączającą się do fragmentu genu kodującego glikoproteinę gB herpeswirusa psów. Startery zaprojektowano na bazie sekwencji nukleotydowej genu glikoproteiny zamieszczonej w Banku Genów (AF361073). Startery CHVa (5'-TGCAGTTACTCAATGTGTGA-3') i CHVb (5'-TGTCCTTCAATATAGTTAGTT-3') umożliwiły amplifikację fragmentu genu o długości 147 pz (ryc. 1). Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 50 μl zawierała: 5 μl 10 $\times$ buforu A (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 11 mM MgCl_2 ; 500 mM KCl; 0,1% żelatyna), 1 μl 10 mM dNTPs, 2 μl (10 μM) roztworu każdego startera, 0,5 μl (1 U) Taq polimerazy (Terpol, Sieradz), 5 μl DNA badanej próbki oraz 34,5 μl wody. Mieszaninę przygotowano na lodzie i przeniesiono do nagrzanego bloku termocyklera T3 (Biometra). Po inkubacji mieszaniny reakcyjnej w temp. 94°C przez 5 min. amplifikację przeprowadzano w 35 cyklach, w których denaturacja zachodziła w temp. 94°C przez 1 min., wiązanie starterów w temp. 50°C przez 1 min., a elongacja w temp. 72°C przez 1 min. Kończącą elongację przeprowa-



Ryc. 1. Przykład reakcji amplifikacji fragmentu genu glikoproteiny gB herpeswirusa psów

Objaśnienia: M – marker pUC Mix 8; 1, 2 – produkty amplifikacji fragmentu genu gB stanowiącego kontrolę dodatnią reakcji

dzono w temp. 72°C przez 6 min. Przebieg reakcji amplifikacji oceniano na podstawie kontroli dodatniej i ujemnej reakcji. Kontrolę dodatnią stanowiło DNA uzyskane z pierwotnej hodowli komórek nerki psa zakażonej herpeswirusem psów, zaś kontrolę ujemną – mieszanina reakcyjna nie zawierająca DNA matrycy.

Analiza elektroforetyczna. Po zakończonej amplifikacji 10 μl mieszaniny reakcyjnej наносono na 1,7% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 100 V przez 90 min. w buforze $1 \times \text{TBE}$. Żel wybarwiano w roztworze bromku etydyny i obserwowano w świetle lampy UV. Wielkość uzyskanych produktów amplifikacji porównywano do wzorca masowego DNA (pUC Mix 8, Fermentas). Za wynik dodatni uznawano obecność prążka o długości 147 pz (ryc. 1).

Wyniki i omówienie

Obecność przeciwciał herpeswirusowych w surowicach samic lisów hodowlanych w Polsce, a także lisów wolno żyjących w Niemczech wskazuje, że są one wrażliwe na zakażenie herpeswirusem (16, 18). Potwierdził to Reubel i wsp. (11), podając lisom dożylnie zawiesinę herpeswirusa psów. Zakażenie doświadczalne zwierząt prowadziło do rozwoju choroby o ciężkim przebiegu, z objawami ze strony układu oddechowego. Zakażenie lisów drogą doustną nie wywoływało żadnych objawów. W wymazach pobieranych z dróg rodnych i oddechowych nie stwierdzono obecności DNA wirusa w grupie doświadczalnej, jak też u osobników grupy kontrolnej, które przetrzymywano na wspólnym wybiegu. Doświadczenie to potwierdza przypuszczenia, że bezpośredni kontakt zwierząt nie ma większego znaczenia w rozprzestrzenianiu się zakażeń herpeswirusowych u lisów. Nadal nie wiadomo, czy u lisów możliwa jest transmisja wirusa drogą płciową, która uważana jest u psów za jedną z głównych dróg rozprzestrzeniania się choroby.

W badaniach własnych zastosowano metodę PCR, którą przebadano łącznie 114 próbek narządów wewnętrznych pobranych od padłych lisiąt oraz zwierząt

wyeliminowanych z rozrodu. W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono materiału genetycznego herpeswirusa psów, którego obecność mogłaby wskazywać na istnienie zakażenia latentnego. Badaniami objęto m.in. migdałki, węzły chłonne podżuchwowe i podbrzusne, a więc narządy, w których metodą PCR najczęściej stwierdzano obecność wirusowego DNA u lisów doświadczalnie zakażonych oraz psów z latentną wirusową (4, 9, 11). Hashimoto i wsp. (5), stosując metodę immunofluorescencji, wykazał obecność herpeswirusa u zakażonych szczeniąt w wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach. W badaniach własnych nie stwierdzono obecności DNA wirusa w narządach wewnętrznych szczeniąt, wykluczając tym zakażenie herpeswirusem psów jako przyczynę ich padnięć.

Technika PCR jest rutynowo używana w mikrobiologicznej diagnostyce weterynaryjnej (12). Jest czułą i szybką metodą, pozwalającą w czasie kilku godzin wykazać obecność genomowego DNA wirusa w materiale badanym. W przypadku latentnych zakażeń herpeswirusowych, charakteryzujących się bezobjawowym przebiegiem, PCR jest jedyną zalecaną metodą, która pozwala skutecznie je diagnozować (12). Zastosowanie starterów przyłączających się w obrębie genu kodującego glikoproteinę gB herpeswirusa psów pozwoliło na wydajną amplifikację fragmentu genu oraz na jego identyfikację (8). W celu podniesienia czułości zastosowanej metody zwrócono szczególną uwagę na sposób oczyszczania i izolacji DNA. Badania porównawcze metod ekstrakcji kwasów nukleinowych z tkanek zwierząt potwierdziły wysoką wydajność zestawu QIAamp® DNA Mini Kit (Rzeżutka, dane niepublikowane). Obecność substancji inhibitorowych zanieczyszczających matrycowe DNA jest jedną z najczęściej rozpoznawanych przyczyn niższej czułości reakcji PCR. Mogą one prowadzić do całkowitego zahamowania reakcji, co skutkuje uzyskiwaniem wyników fałszywie ujemnych (7). W celu wykluczenia wpływu substancji inhibitorowych na reakcję PCR, amplifikacji poddano rozcieńczone (1 : 20) i nie rozcieńczone próbki DNA. Takie postępowanie gwarantowało wydajną amplifikację DNA, nawet wówczas, kiedy badana próbka zawierała niewielką ilość DNA matrycy (Rzeżutka, dane niepublikowane).

Uzyskane wyniki wskazują, że herpeswiroza lisów nie jest jednostką chorobową, która stanowiła przyczynę zaburzeń w rozrodzie w badanych fermach zwierząt. Pomimo prowadzonej w Polsce swoistej immunoprofilaktyki przeciwko zakażeniom parwowirusowym oraz terapii antybiotykowej na fermach lisów notuje się opisywane zaburzenia. Biorąc pod uwagę wyniki badań własnych oraz badań przeprowadzonych przez Śmielewską-Łoś i wsp. (16, 17) oraz Kostro i wsp. (6) nadal można uważać, że główną przyczyną słabych wyników hodowlanych są mieszane zakażenia bakteryjne, na które mogą nakładać się niedobory żywieniowe oraz nieodpowiednie warunki zoohigieniczne.

Piśmiennictwo

1. Anvik J. O.: Clinical considerations of canine herpesvirus infection. *Vet. Med.* 1991, 86, 394-403.
2. Barabas B., Bielański P., Jarosz S., Niedźwiadek S., Sławoń J.: Normy żywienia mięsożernych i roślinożernych zwierząt futerkowych – wartość pokarmowa pasz. Wydawnictwo Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego, Jabłonna 1994, 30-36.
3. Baxi M. K., Efsthathiou S., Lawrence G., Whalley J. M., Slater J. D., Field H. J.: The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 3113-3118.
4. Burr P. D., Campbell M. E. M., Nicolson L., Onions D. E.: Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1996, 53, 227-237.
5. Hashimoto A., Hirai K., Yamaguchi T., Fujimoto Y.: Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 844-850.
6. Kostro K., Osek J., Nozdryn-Plotnicki Z., Krakowski L.: Zakażenia β -hemolitycznym szczepem *Escherichia coli* przyczyną roniń i padnięć ciężarnych samic lisów polarnych. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1186-1190.
7. Lantz P. G., Abu al-Soud W., Knutsson R., Hahn-Hagerdal B., Radstrom P.: Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2000, 5, 87-130.
8. Limbach K. J., Limbach M. P., Conte D., Paoletti E.: Nucleotide sequence of the genes encoding the canine herpesvirus gB, gC and gD homologues. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 2029-2039.
9. Miyoshi M., Ishii Y., Takiguchi M., Takada A., Yasuda J., Hashimoto A., Okazaki K., Kida H.: Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 1999, 61, 375-379.
10. Poste G., King N.: Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *Vet. Rec.* 1971, 88, 229-233.
11. Reubel G. H., Pekin J., Venables D., Wright J., Zabar S., Leslie K., Rothwell T. L., Hinds L. A., Braid A.: Experimental infection of European red foxes (*Vulpes vulpes*) with canine herpesvirus. *Vet. Microbiol.* 2001, 83, 217-233.
12. Rodriguez J. M.: Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. J.* 1997, 153, 287-305.
13. Roizman B., Desrosiers R. C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A. C., Studdert M. J.: The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 1992, 123, 425-449.
14. Slomka M. J., Brown D. W. G., Clewley J. P., Bennett A. M., Harrington L., Kelly D. C.: Polymerase chain reaction for detection of herpesvirus simiae (B virus) in clinical specimens. *Arch. Virol.* 1993, 131, 89-99.
15. Smith K. C.: Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* 1997, 153, 253-268.
16. Śmielewska-Łoś E., Klimontowski S., Kaszubkiewicz C., Pacoń J.: Badania noworodków lisów hodowlanych w kierunku zakażeń wirusem CHV, *Mycoplasma* sp. oraz zarażenia *Toxocara canis*. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 253-257.
17. Śmielewska-Łoś E., Klimontowski S., Rypuła K., Karczmarczyk R.: Udział czynników zakaźnych w zaburzeniach rozrodu samic lisów hodowlanych. *Życie Wet.* 1998, 73, 93-97.
18. Truyen U., Müller T., Heidrich R., Tackmann K., Carmichael L. E.: Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol. Infect.* 1998, 121, 433-440.

Adres autora: dr Artur Rzeżutka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: arzez@piwet.pulawy.pl