

Forma nerwowa zakażenia herpeswirusem koni typ 1 jako nowo pojawiająca się choroba zakaźna koni

GABOR PŁOSZAY, JERZY ROLA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Płoszay G., Rola J., Żmudziński J. F.

Neurologic form of equine herpesvirus 1 infection as a newly emerging infectious disease of horses

Summary

Equine herpesvirus 1 (EHV1) is one of the most important infectious agents in horses. This virus causes inflammation of the upper respiratory tract, pneumonia, abortion, death of newborn foals and encephalomyelitis known as Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy (EHM). In recent years there has been a marked increase in the incidence of EHM caused by infection with neuropathogenic strains of EHV1. For this reason, some experts believe that EHM should be classified as a newly emerging infectious disease. Although this disease is less frequently observed than the other clinical forms of EHV1 infection, it may cause serious economic losses in breeding horses and have a very negative impact on the functioning of riding schools, racetracks and veterinary hospitals.

This review discusses selected aspects of EHM, such as the link between the neurologic form of the disease and the EHV1 genotype, clinical signs, and methods of diagnosis and prevention.

Keywords: EHV1, equine herpesvirus myeloencephalopathy, genotype

Spośród zakażeń wirusowych rozpoznawanych u koni zakażenie herpeswirusem koni typ 1 (EHV-1) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych (2). Wirus ten powoduje: zapalenie górnych dróg oddechowych i płuc, poronienia, padnięcia wśród nowo narodzonych źrebiąt oraz zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego określane jako herpeswirusowa mieloencefalopatia (Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy, EHM) (3, 14, 22). Większość zakażeń EHV1 u koni dorosłych przebiega w postaci subklinicznej, jednakże w ostatnich latach, szczególnie w USA, zaobserwowano wzrost zachorowań koni z objawami nerwowymi, których przyczyną było zakażenie neuropatogennymi szczepami EHV1. Z tego powodu eksperci z Centrum Epidemiologii i Zdrowia Zwierząt Departamentu Rolnictwa USA uznali, że postać nerwowa zakażenia EHV1 należałoby zaliczyć do nowo pojawiających się chorób zakaźnych. Mimo że postać ta stwierdzana jest rzadziej niż pozostałe postacie kliniczne EHV1, to może być ona przyczyną poważnych strat ekonomicznych w hodowli koni i mieć bardzo negatywny wpływ na funkcjonowanie szkółek jeździeckich, torów wyścigowych oraz szpitali weterynaryjnych (21). W Polsce EHM nie została dotychczas potwierdzona laboratoryjnie.

Celem artykułu było przedstawienie aktualnych danych odnośnie do postaci nerwowej zakażenia EHV1.

Występowanie

Forma nerwowa zakażenia EHV1 została opisana w latach 60. XX w. i dotychczas występowała sporadycznie, najczęściej w dużych skupiskach koni. Sytuacja ta zmieniła się pod koniec lat 90. ubiegłego wieku, kiedy odnotowano wzrost liczby przypadków postaci nerwowej EHV1 (7, 9, 20). W Holandii van Maanen i wsp. (15) opisali w 1995 r. wybuch choroby z objawami nerwowymi w szkółce jeździeckiej liczącej 41 koni, spośród których 34 miały podwyższoną temperaturę wewnętrzną, a 20 wykazywało różnego stopnia zaburzenia neurologiczne. W ciągu trzech pierwszych dni choroby jeden koń padł, a innego z ciężkimi objawami nerwowymi poddano eutanazji. Rozpoznanie kliniczne EHM potwierdzono badaniami laboratoryjnymi. Serokonwersję stwierdzono u 28 koni, od 4 koni wyizolowano wirusa, który następnie został zidentyfikowany jako EHV1. Ponowne badanie przeprowadzone w tej samej szkółce rok później wykazało, że 10 koni z łagodnymi objawami nerwowymi całkowicie wyzdrowiało, spośród 8 koni intensywnie leczonych 3 wróciły do wcześniejszej kondycji, a 5 poddano eutanazji z powodu utrzymujących się zaburzeń nerwowych i nietrzymania moczu.

W Belgii dużą epizootię EHM opisali ven der Meulen i wsp. (16) w 2003 r. Pierwsze zachorowania wystąpiły w szkółce jeździeckiej liczącej 41 koni,

a następnie w wyniku bezpośredniego i pośredniego kontaktu z chorymi końmi zakażenie rozprzestrzeniło się na co najmniej 10 sąsiednich stadnin. Analiza zachorowań wykazała, że z całej stawki 111 koni u 42% wystąpiły gorączka i utrata apetytu. Zaburzenia neurologiczne w postaci ataksji, porażenia kończyn tylnych i ogona stwierdzono u 15% koni, a współczynnik śmiertelności wynosił 10%.

W 2009 r. w Belgii zarejestrowano kolejną epizootię EHM wywołaną zakażeniem neuropatogennym szczepem EHV1 (10). Choroba wystąpiła w co najmniej 13 stadninach, ale dokładnej analizie poddano przypadki zachorowań z 7 gospodarstw. Z ogólnej liczby 212 koni objawy zakażenia EHV1 wystąpiły u 26% zwierząt, a następnie u 43% z nich pojawiły się zaburzenia neurologiczne, wśród których dominowały ataksja i porażenia.

W USA jedna z największych epizootii EHM spowodowana zakażeniem neuropatogennym szczepem EHV1 wystąpiła w szkole jeździeckiej Uniwersytetu Findlaya w 2003 r. (11). Spośród 135 koni przebywających na terenie szkoły objawy zakażenia w postaci gorączki i depresji stwierdzono u 117 koni. U 46 koni wystąpiły zaburzenia neurologiczne charakteryzujące się niezbornością kończyn tylnych. W ciągu dwóch tygodni od wystąpienia zachorowań u 12 koni objawy nerwowe mocno nasiliły się i doprowadziły do zalegania koni i w konsekwencji do ich eutanazji.

ORF30 a postać nerwowa EHM

W 1992 r. Telford i wsp. (25) określili po raz pierwszy sekwencję całego genomu EHV1. Osiągnięcie to oraz dalszy postęp w rozwoju metod badawczych opartych na biologii molekularnej umożliwiły poznanie funkcji poszczególnych genów wirusa. Genom EHV1 zbudowany jest z dwuniciowej cząsteczki DNA o długości około 150 tys. par zasad. W obrębie genomu zidentyfikowano 76 genów, spośród których 63 zlokalizowano w odcinku długim U_L , 9 w odcinku krótkim U_S oraz 4 wewnątrz sekwencji powtarzających się. Jednym z genów znajdujących się w odcinku długim U_L jest gen ORF30 kodujący enzym polimerazę DNA. Nugent i wsp. (17) analizując sekwencję nukleotydową szczepów EHV1, nieneuropatogenego V592 i neuropatogenego Ab4, stwierdzili różnicę w pozycji 2254 genu ORF30. W sekwencji szczepu V592 występuje w tym miejscu nukleotyd adenina (A), natomiast w sekwencji szczepu Ab4 jest guanina (G). Mutacja ta określana jako polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) pociąga za sobą zmianę w sekwencji aminokwasowej białka polimerazy DNA w pozycji 752, w wyniku której asparagina (N) została zastąpiona przez kwas asparaginowy (D). Po przebadaniu większej liczby szczepów autorzy wysunęli hipotezę, że postać nerwowa EHV1 wywołują szczepy, u których doszło do mutacji SNP w pozycji 2254. Według nich, szczepy posiadające genotyp G_{2254} mają potencjał neuropatogeny i wywołują zachorowania z objawami

nerwowymi, podczas gdy szczepy o genotypie A_{2254} nie są neuropatogenne i zwykle powodują poronienia i zakażenia układu oddechowego.

Obserwowany ostatnio wzrost liczby przypadków EHM wśród koni znalazł potwierdzenie w wynikach badań laboratoriów diagnostycznych, które coraz częściej izolują szczepy o genotypie G_{2254} . Perkins i wsp. (19) po analizie genu ORF30 ponad 170 izolatów EHV1 w powiązaniu z objawami klinicznymi stwierdzili, że ryzyko wystąpienia choroby z zaburzeniami nerwowymi było 162 razy wyższe po zakażeniu szczepem o genotypie G_{2254} niż A_{2254} . Inni autorzy wykazali, że odsetek szczepów neuropatogennych występujących w populacji koni w stanie Kentucky między 1951 a 2006 r. systematycznie wzrastał (23). W latach 1960. wynosił on 3,3%, w następnej dekadzie 7,7%, pod koniec XX w. 14,4%, a w okresie od 2000 do 2006 r. 19,4%.

Należy jednak dodać, że jest grupa badaczy, którzy twierdzą, że SNP adenina/guanina w pozycji 2254 nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na wystąpienie EHM. Wymienieni wcześniej Perkins i wsp. (19) wykazali, że 24% izolatów pochodzących od koni z objawami nerwowymi posiadało genotyp A_{2254} . Z kolei badania przeprowadzone w Niemczech wykazały, iż 10,6% (7/66) szczepów EHV1 wyizolowanych z poronionych płodów posiadało genotyp G_{2254} , z tego tylko dwa izolaty pochodziły z przypadków poronień, którym towarzyszyły objawy nerwowe u klaczy (7). Innym dowodem wskazującym na polietiologiczne tło EHM są wyniki badań, w których do zakażenia myszek użyto neuropatogennego szczepu Ab4p, pozbawionego genu ORF37 (12). Uzyskany mutant zachował zdolność do namnażania się w hodowli komórek MDBK, jednak utracił właściwości neuropatogenne, gdyż nie powodował żadnych zaburzeń neurologicznych i śmierci zakażonych myszek.

Rozpoznanie

Postać nerwowa EHV1 występuje najczęściej sporadycznie i stwierdzana jest głównie u koni dorosłych. Wirus, po namnożeniu się w nabłonku górnych dróg oddechowych, przedostaje się do okolicznych węzłów chłonnych, w których dochodzi do zakażenia limfocytów T CD8+. Następnie drogą krwi, z zakażonymi limfocytami, EHV1 dociera do centralnego układu nerwowego i namnaża się w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych, powodując zapalenie naczyń, wybroczyny i zakrzepy. Zmiany te prowadzą do niedokrwienia, a w efekcie końcowym do uszkodzenia (martwicy) tkanki nerwowej mózgu lub rdzenia kręgowego. Objawy nerwowe pojawiają się nagle, zazwyczaj między 6. a 10. dniem po zakażeniu, a ich rodzaj i nasilenie zależą od lokalizacji oraz rozmiaru uszkodzeń centralnego układu nerwowego. Wśród zaburzeń neurologicznych obserwuje się: okresową ataksję, niedowład kończyn, głównie tylnych oraz porażenia. U chorych koni może dochodzić także do utraty napięcia mięśni ogona, odbytu i nietrzymania moczu. Ro-

kowanie zależy od postaci choroby. W przypadkach o ciężkim przebiegu, kiedy konie zalegają z objawami porażenia, jest ono niepomysłne.

Rozpoznanie zakażenia EHV1 jedynie na podstawie objawów klinicznych może być wątpliwe i powinno być poparte badaniem laboratoryjnym. Pomocne w rozpoznaniu EHM może być badanie krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego. W pierwszych 7-10 dniach po zakażeniu w krwi stwierdza się limfopenię oraz podwyższone stężenie fibrynogenu (hiperfibrinogenemia). Natomiast płyn mózgowo-rdzeniowy może mieć żółte zabarwienie (ksantochromia) i podwyższone stężenie białka całkowitego. Zmiany obserwowane w płynie mózgowo-rdzeniowym ustępują dość szybko i zwykle po 2 tygodniach od wystąpienia objawów klinicznych płyn ma już prawidłowe parametry.

W przypadku metod umożliwiających bezpośrednie wykrycie EHV1 „złotym standardem” jest w dalszym ciągu test izolacji wirusa w hodowli komórkowej. Wirus ten szybko namnaża się w komórkach, powodując wyraźny efekt cytopatyczny zarówno w hodowlach komórkowych pierwotnych, jak i w ustalonych liniach komórkowych. Dodatkową zaletą omawianej metody jest możliwość wyosobnienia aktualnie krążących szczepów EHV1, które można wykorzystać do charakterystyki genetycznej. Natomiast pewnym ograniczeniem jest jej czasochłonność, gdyż do wyizolowania i identyfikacji wirusa potrzeba z reguły kilkunastu dni. Wynik testu izolacji zależy głównie od właściwego pobrania próbek do badania laboratoryjnego. Ponieważ szczyt siewstwa wirusa przypada na okres przed pojawieniem się objawów nerwowych, istotne jest, aby próbki pobrać w początkowej fazie choroby, w okresie występowania gorączki. Pobranie próbek w późniejszym okresie może skutkować wynikiem negatywnym. Innym czynnikiem mającym wpływ na wynik testu są warunki transportu próbek, gdyż w niewłaściwych warunkach może dojść do inaktywacji wirusa i uzyskania wyniku fałszywie ujemnego.

Aktualnie w laboratoriach diagnostycznych coraz częściej stosowana jest technika PCR, która pozwala na wykrycie DNA wirusa nawet w próbkach transportowanych i przechowywanych w nieodpowiednich warunkach (8, 13). W przeciwieństwie do testu izolacji jest to metoda szybka, gdyż umożliwia wykrycie wirusa w badanej próbce w ciągu kilkunastu godzin od dostarczenia jej do laboratorium. Piśmiennictwo zawiera szereg informacji dotyczących zastosowania konwencjonalnego PCR w diagnostyce EHV1 (5, 13, 17, 18). Startery używane do amplifikacji DNA były projektowane dla różnych genów EHV1, a metoda PCR charakteryzowała się wysoką czułością i specyficznością. Słabą stroną omawianej techniki był brak procedur standaryzacji oraz konieczność stosowania elektroforezy w żelu agarozowym do rozdziału produktów amplifikacji celem określenia ich długości.

Opracowanie techniki pozwalającej na śledzenie przebiegu PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

poprzez zastosowanie sond molekularnych wyznaczanych fluorochromami umożliwiło precyzyjne określenie zmiany stężenia produktu w mieszaninie reakcyjnej (1, 23). Technika ta pozwala m.in. na ocenę ilościową koncentracji wirusa w próbkach krwi oraz w wymazach z nosa, co można wykorzystać do dokładnego określenia stadium choroby oraz ryzyka ekspozycji pozostałych zwierząt w stadzie na zakażenie EHV1, jak również monitorowania odpowiedzi na podjętą terapię (4, 6, 14). Ponadto PCR w czasie rzeczywistym pozwala na wykrycie mutacji SNP w sekwencji nukleotydowej genu ORF30, dzięki czemu istnieje możliwość szybkiego odróżnienia szczepów neuropatogennych (G₂₂₅₄) od nieneuropatogennych (A₂₂₅₄), a tym samym lepszego wyboru terapii oraz właściwych zabiegów zoohigienicznych, które zabezpieczą przed rozprzestrzenianiem się choroby (1). Niektórzy autorzy sugerują, że podczas wybuchu EHM najbardziej użyteczne w diagnostyce wydaje się równoległe wykonywanie testu izolacji i PCR. Połączenie tych dwóch metod daje możliwość biologicznej i molekularnej charakterystyki izolatu (14).

W rozpoznaniu choroby pomocne może być także badanie serologiczne. Stwierdzenie w teście seroneutralizacji co najmniej 4-krotnego wzrostu miana przeciwciał w próbkach surowicy pobranych w odstępie 7-21 dni wskazuje, że w ostatnim okresie doszło do zakażenia EHV1. Badanie to ma ograniczoną wartość w przypadku koni szczepionych przeciwko EHV1.

Zapobieganie

Ze względu na brak swoistego leczenia postępowanie z chorymi końmi polega na zapewnieniu im dobrej opieki pielęgniarzkiej, odpowiedniego żywienia i podawania leków zmniejszających stan zapalny centralnego układu nerwowego.

Nieodłącznym elementem prewencji stada jest bioasekuracja, w tym odpowiednie zarządzanie stajnią (2). W przypadku wystąpienia EHM należy jak najszybciej ściśle odizolować chore zwierzę od pozostałej stajki koni oraz pobrać próbki do badań laboratoryjnych, aby potwierdzić lub wykluczyć zakażenie EHV1. Postępowanie to ma na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się zakażenia w stadzie, gdyż chore zwierzęta są głównym źródłem wirusa wydalanego z wydzieliną z dróg oddechowych. Konie z objawami klinicznymi powinny przebywać w izolacji do całkowitego wyzdrowienia, kiedy nie wykazują już objawów klinicznych choroby i nie stwierdza się u nich siewstwa wirusa. Zwierzęta powinny być utrzymywane w małych grupach fizycznie oddzielonych od siebie, tak aby w razie wybuchu choroby zapobiec kontaktom między grupami. Zwierzęta wprowadzane do stada, zarówno nowo zakupione, jak i wracające z pokazów, zawodów sportowych powinny przechodzić 21-dniową kwarantannę. Należy także wprowadzić zakaz przemieszczania koni, a stajnię objąć nadzorem lekarsko-weterynaryjnym.

Piśmiennictwo

1. Allen G. P.: Development of Real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007, 19, 69-72.
2. Allen G. P.: Epidemic disease caused by Equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet. Educ.* 2002, 14, 136-142.
3. Allen G. P.: Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horse. *Am. J. Vet. Res.* 2008, 69, 1595-1600.
4. Allen G. P., Breathnach C. C.: Quantification by Real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in Horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* 2006, 38, 252-257.
5. Ballagi-Poradny A., Klingeborn B., Flensburg J., Belak S.: Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequence in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1990, 22, 373-381.
6. Dzieciatkowski T., Przybylski M., Cymerys J., Turowska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.: Equine herpesvirus type 1 quantification in different types of Samals by a real-time PCR. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, 12, 311-315.
7. Fritsche A. K., Borchers K.: Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.* 2011, 176-180.
8. Galosi C. M., Vila Roza M. V., Oliva G. A., Pecoraro M. R., Echeverria M. G., Corva S., Etcheverragaray M. E.: A polymerase chain reaction for detection of equine herpesvirus-1 in routine diagnostics submissions of tissues from aborted fetuses. *J. Vet. Med.* 2001 48, 341-346.
9. Goehring L. S., Maanen C. van, Oldruitenborgh-Oosterbaan M. M. van: Neurological syndromes among horses in The Netherlands: a 5 year retrospective survey (1999-2004). *Vet. Q.* 2005, 27, 11-20.
10. Gryspeerdt A., Vendekerckhove A., Van Doorselaere J., Van de Walle G. R., Nauwynck H. J.: Description of an unusually large outbreak of nervous system disorders caused by equine herpesvirus 1 (EHV1) in 2009 in Belgium. *Vlaams Diergen. Tijds.* 2011, 80, 147-153.
11. Henninger R. W., Reed S. M., Saville W. J., Allen G. P., Hass G. F., Kohn C. W., Sofaly C.: Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 157-165.
12. Kasem S., Yu M. H., Yamada S., Kodaira A., Matsumura T., Tsujimura K., Madbouly H., Yamaguchi T., Ohya K., Fukushi H.: The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the Mouse encephalitis model. *Virology* 2010, 400, 259-270.
13. Kirisawa R., Endo A., Iwai H., Kawakami Y.: Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1993, 36, 57-67.
14. Lunn D. P., Davis-Poynter N., Flaminio M. J. B. F., Horohov D. W., Osterrieder K., Pusterla N., Townsend H. G. G.: Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, 23, 450-461.
15. Maanen C. van, Oldruitenborgh-Oosterbaan M. M. van, Damen E. A., Derksen A. E.: Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* 2001, 33, 191-196.
16. Meulen K. van der, Vercauteren G., Nauwynck H., Pensaert M.: A local epidemic of equine herpesvirus-1 induced neurological disorders in Belgium. *Vlaams Diergen. Tijds.* 2003, 72, 366-372.
17. Nugent J., Birch-Machin I., Smith K. C., Mumford J. A., Swann Z., Newton J. R., Bowden R. J., Allen G. P., Davis-Poynter N.: Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J. Virol.* 2006, 80, 4047-4060.
18. O'Keefe J. S., Murray A., Wilks C. R., Moriarty K. M.: Amplification and differentiation of the DNA of an abortigenic (type 1) and respiratory (type 4) strain of equine herpesvirus by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 1991, 50, 349-351.
19. Perkins G. A., Goodman L. B., Tsujimura K., van de Walle G. R., Kim S. G., Dubovi E. J., Osterrieder N.: Investigation of the prevalence of neurologic equine herpesvirus virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). *Vet. Microbiol.* 2009, 139, 375-378.
20. Pronost S., Leon A., Legrand L., Fortier Ch., Miszczak F., Freymuth F., Fortier G.: Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* 2010, 145, 329-333.
21. Pusterla N., Wilson D. W., Madigan J. E., Ferraro G. L.: Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent development. *Vet. J.* 2009, 180, 279-289.
22. Slater J. D., Lunn D. P., Horohov D. W., Antczak D. F., Babiuk L., Breathnach C., Chang Y. W., Davis-Poynter N., Edington N., Ellis S., Foote C., Goehring L., Kohn C. W., Kydd J., Matsumura T., Minke J., Morley P., Mumford J., Neubauer T., O'Callaghan D., Osterrieder K., Reed S., Smith K., Townsend H., van der M. K., Whalley M., Wilson W. D.: Report of equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 111, 3-13.
23. Smith K. L., Allen G. P., Branscum A. J., Cook R. F., Vickers M. L., Timoney P. J., Balasuriya U. B. R.: The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet. Microbiol.* 2010, 141, 5-11.
24. Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategię monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008, 80, 71-85.
25. Telford E. A. R., Watson M. S., McBride K., Davison A. J.: The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* 1992, 189, 304-316.

Adres autora: lek. wet. Gabor Ploszay, ul. 3-go Maja 16 m. 4, 41-300 Dąbrowa Górnicza; e-mail: gabor.ploszay@piwet.pulawy.pl