

Mieszane zakażenia końskimi herpeswirusami typu 1 i 2 (EHV-1 i EHV-2)*)

MARCIN W. BAÑBURA, LUCJAN WITKOWSKI*, ANNA CHMIELEWSKA, ANNA TUCHOLSKA

Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych, *Zakład Chorób Zakaźnych i Epidemiologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Bañbura M. W., Witkowski L., Chmielewska A., Tucholska A.

Mixed infections of equine herpes virus types 1 and 2 (EHV-1 and EHV-2)

Summary

110 blood samples from clinically healthy mares of English breed, half-blood and the Wielkopolska race were tested for the presence of EHV-1 and EHV-2 using nested PCR. 15 samples were EHV-1-positive, 24 samples were EHV-2-positive, whereas only 4 samples were both EHV-1 and EHV-2 positive. The virus was isolated from PBLs in equine dermal cell cultures by co-cultivation or by culture inoculation with cell lysates derived from PBLs. A total of 14 strains were isolated from EHV-2 and EHV-1/EHV-2-positive samples. However, all of them were identified by nPCR as being type 2. Since no EHV-1 was isolated, even from dually infected leukocytes, it was concluded that the presence of EHV-2 does not stimulate in-vitro isolation of EHV-1 from infected leukocytes. It is tempting to speculate that such stimulatory effects in-vivo may involve EHV-2-induced immunosuppression. Despite any possible mechanism of EHV-1 stimulation, it seems that EHV-2 does not play a significant role in the epidemiology of EHV-1-caused miscarriages in horses since mixed infections are rather rare.

Keywords: EHV-1, EHV-2, virus

Zakażenia koni wywoływane przez herpeswirusy stanowią istotny problem w praktyce weterynaryjnej. Największe straty w hodowli powodowane są niewątpliwie przez typ 1 wirusa (EHV-1, podrodzina α -herpesvirinae), który jest przyczyną zakażeń górnych dróg oddechowych, zaburzeń neurologicznych i poronień (1, 20). Typ 2 (EHV-2, podrodzina γ -herpesvirinae) uważany jest natomiast za słabo patogenny – w warunkach naturalnych stwierdza się jego występowanie zarówno u zwierząt wykazujących objawy zapalenia płuc lub górnych dróg oddechowych (5, 6, 8-10, 15, 16) czy zapalenia spojówek (11), jak i u zwierząt nie wykazujących żadnych objawów (10, 13, 14, 17). Dlatego też wyrażany jest pogląd, że EHV-2 nie jest odpowiedzialny za konkretną jednostkę chorobową, a jego działanie polega na immunosupresji, co predysponuje do wtórnych zakażeń bakteryjnych (5, 6, 15, 16). Zaobserwowano również, że reaktywacji latentnego EHV-1 od doświadczalnie zakażonych koni towarzyszyła izolacja wirusa typu 2 (21). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że EHV-2 może mieć wpływ na reaktywację EHV-1, jednak związek taki nigdy nie został doświadczalnie potwierdzony.

Występowanie EHV-1 i EHV-2 w leukocytach krwi obwodowej stwierdzono również w Polsce (3, 18), a w badaniach *in vitro* wykazano, że jednoczesne zakaże-

nie hodowli komórkowych dwoma typami wirusa prowadzi do przyspieszenia występowania efektu cytopatycznego powodowanego przez EHV-1 (12). Nie wiadomo jednak, czy w warunkach naturalnych obecność EHV-2 w jakikolwiek sposób stymuluje reaktywację krążącego w środowisku EHV-1.

Celem podjętych badań było określenie częstości naturalnego występowania zakażeń obydwoma typami wirusa oraz zbadanie wpływu obecności EHV-2 na reaktywację EHV-1 *in vitro*.

Materiał i metody

Próbki pochodziły od klaczy pełnej krwi angielskiej, półkrwi i rasy Wielkopolskiej w różnym wieku. Z krwi pobieranej do płynu RPMI zawierającego dodatek heparyny izolowano leukocyty, z których część używano do ekstrakcji leukocytarnego DNA (19) i wykonania PCR ze starterami specyficznymi dla EHV-1 (7) i EHV-2 (8). Pozostałe leukocyty dzielono na dwie porcje i jedną z nich zamrażano. Świeżych leukocytów używano do izolacji wirusa techniką hodowli wspólnej z komórkami linii ciągłej ED (skóry konia) (21). Wynik uznawano za ujemny, jeśli w trzech kolejnych pasażach komórek nie stwierdzano efektu cytopatycznego (CPE). Z leukocytów zamrożonych i rozmrożonych wirus izolowano techniką klasyczną, stosowaną do izolacji wirusa z tkanek poronionych płodów. Wynik uznawano za ujemny, jeśli w trzech kolejnych „ślepych” pasażach płynu z hodowli nie stwierdzano CPE.

*) Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 3 P06K 006 24.

Wyniki i omówienie

Ogółem zbadano 110 próbek krwi. W 15 próbkach techniką nPCR stwierdzono występowanie sekwencji specyficznych tylko dla EHV-1, w 24 – tylko dla EHV-2. W 4 próbkach wykazano jednoczesne występowanie obu typów wirusa. Z żadnej z próbek leukocytów, w których stwierdzono występowanie tylko EHV-1, wirusa nie wyizolowano. Z próbek tylko EHV-2-dodatnich wyizolowano 12 szczepów, natomiast z próbek wykazujących obecność obu typów wirusa uzyskano dwa izolaty, które jednak techniką PCR zidentyfikowane zostały jako EHV-2. Zbiorcze wyniki badań przedstawione zostały w tabeli 1.

Tab. 1. Wyniki wykrywania obecności wirusa w leukocytach krwi obwodowej badanych koni oraz jego izolacji i identyfikacji techniką PCR (n = 110)

Rodzaj badania	EHV-1	EHV-2	EHV-1 + EHV-2
Wykrywanie wirusa w leukocytach techniką nPCR	15	24	4
Izolacja wirusa i identyfikacja techniką PCR	0	12	0 2

Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach naturalnych mieszane zakażenia EHV-1/EHV-2 występują dość rzadko – na 19 przypadków EHV-1 tylko 4 z nich wykazywały jednocześnie obecność EHV-2, a wirus izolowany z dwóch z nich również należał do typu 2. Nie udało się zatem wykazać, że EHV-2 wpływa stymulująco na reaktywację *in vitro* EHV-1 naturalnie krążącego w środowisku. Można też przypuścić, że opisywana przez innych autorów reaktywacja latentnego EHV-1 (21) wynikała nie tyle z jednoczesnej obecności EHV-2, ile z właściwości wirusa użytego do zakażenia eksperymentalnego i jego adaptacji do hodowli komórkowej. Wiadomo skądinąd, że wielokrotne pasażowanie EHV-1 *in vitro* wpływa na właściwości wirusa i prowadzi do zmian jego profilu restrykcyjnego (2). Nie wiadomo jednak, w jaki sposób zmiany te wpływają na zdolność wirusa do reaktywacji w hodowli komórkowej. Nie jest też jasne, czy brak izolacji EHV-1 z leukocytów krwi obwodowej wynika ze stanu, w jakim wirus znajduje się w leukocytach, czy też z bardzo małej jego ilości, nie wystarczającej do izolacji. Zagadnienie to jest tym ciekawsze, że wirus natywny, w dużych ilościach obecny w tkankach poronionego płodu, izoluje się na ogół dość łatwo (4). W tym kontekście wyłaniają się następujące fascynujące pytania – czym różnią się szczepy zaadaptowane do hodowli komórkowych *in vitro* od szczepów terenowych i w jaki sposób różnice te wpływają na ich zdolność do reaktywacji z leukocytów oraz w jakiej formie wirus występuje w leukocytach i czym różni się od natywnego wirusa obecnego w tkankach poronionych płodów.

Na podstawie uzyskanych wyników nie można całkowicie wykluczyć udziału EHV-2 w reaktywacji

EHV-1 *in vivo*, gdzie warunki reaktywacji i replikacji wirusa w oczywisty sposób różnią się od warunków *in vitro*, a stymulujący wpływ EHV-2 wynikać może z jego właściwości immunosupresyjnych. Jednak nawet przyjmując, że, niezależnie od mechanizmu, EHV-2 stymuluje reaktywację EHV-1 *in vivo*, jego rola jako czynnika wpływającego na pojawianie się natywnego EHV-1 wydaje się nieznaczna z uwagi na stosunkowo rzadkie występowanie zakażeń mieszanych.

Piśmiennictwo

- Allen G. P., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microb. Imm.* 1986, 2, 78-144.
- Allen G. P., Yeagan M. R., Bryans J. T.: Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after *in vitro* and *in vivo* virus passage. *Infect. Immun.* 1983, 40, 436-439.
- Banbura M. W., Chmielewska A., Tucholska A., Malicki K.: Występowanie wirusa zakaźnego ronienia klaczy w leukocytach krwi obwodowej koni. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 521-523.
- Banbura M. W.: Produktywne i latentne zakażenia końskim herpeswirusem typu 1 (EHV-1). Wyd. SGGW 2003.
- 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.
- Borchers K., Wolfinger U., Ludwig H., Thein P., Baxi S., Field H. J., Slater J. D.: Virological and molecular biological investigation into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Res.* 1998, 55, 101-106.
- Browning G. F., Studdert M. J.: Equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Vet. Bull.* 1988, 58, 775-790.
- Collinson P. N., O'Rielly J. L., Ficorilli N., Studdert M. J.: Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, 205, 329-331.
- Dzieciatkowski T.: Wpływ końskiego herpeswirusa typu 2 (EHV-2) na produktywność zakażenia wirusem zakaźnego ronienia klaczy (EHV-1) w warunkach *in vitro*. Praca doktorska, Wydz. Med. Wet. SGGW, Warszawa 2004.
- Harden T. J., Bagust T. J., Pascoe R. R., Spradbrow P. B.: Studies on equine herpesviruses. 5. Isolation and characterization of slowly cytopathic equine herpesviruses in Queensland. *Aust. Vet. J.* 1974, 50, 483-488.
- Kemeny L., Pearson J. E.: Isolation of herpesvirus from equine leukocytes: comparison with equine rhinopneumonitis virus. *Can. J. Comp. Med.* 1970, 34, 59-65.
- 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.
- Roeder P. L., Scott G. R.: The prevalence of equine herpes virus 2 infections. *Vet. Rec.* 1975, 96, 404-405.
- Ruszczyk A., Chmielewska A., Tucholska A., Banbura M. W.: Izolacja i identyfikacja herpeswirusa koni typu 2 (EHV-2). *Medycyna Wet.* 2001, 57, 603-606.
- Strauss W. M.: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue, [w:] Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (red.): *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York 1992, 2.2.1.-2.2.3.
- Van Maanen C.: Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Quart.* 2002, 24, 57-78.
- Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Griffiths L., Edington N.: Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 1992, 73, 261-268.

Adres autora: dr Marcin W. Bańbura, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: banbura@alpha.sggw.waw.pl