

Wykorzystanie metody PCR i badania hodowlanego w diagnostyce i różnicowaniu zakażeń herpeswirusowych koni (EHV1 i EHV4)

ZBIGNIEW GRĄDZKI, LILIANA BOGUTA

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Grądzi Z., Boguta L.

Use of PCR and cell culture method in the diagnosis and differentiation of EHV1 and EHV4 infections in horses

Summary

The aim of the study was the isolation and identification of herpesviruses (EHV1 and EHV4) in nasal swabs from horses with upper respiratory tract infections and organs of aborted foetus by using PCR and cell culture method. A total of 110 swab samples taken from 90 horses with upper respiratory tract infections and 20 healthy animals and tissue samples from aborted fetuses were included in the study. Sampled animals were selected from 12 horse farms located in the central and south-eastern part of Poland, with different geographical conditions, types of breeding and number of livestock. The collected samples were first examined with the use of PCR to detect DNA of equine herpesviruses type 1 and 4. DNA of EHV4 has been detected in 9 samples taken from 9 horses from two farms. DNA of EHV1 was detected in one swab sample and in tissue samples of aborted fetuses. A representative group of 58 samples taken from sick horses and tissue samples from the fetuses were examined for the virus isolation with the use of three cell lines (RK-13, EEL, MDBK). The positive effect of the virus isolation was obtained with regards to two EHV1 strains, one isolated from a swab sample and the second one from an aborted fetus. However, the isolation of EHV4 strains from 9 samples positive in PCR was unsuccessful. All samples taken from 20 horses from the control group were negative in both virological tests.

Keywords: horse, herpesviruses, EHV1, EHV4, PCR, cell culture

Zakażenia herpeswirusowe są szeroko rozprzestrzenione w hodowli koni na świecie i w Polsce (13, 27, 30, 32). Świadczą o tym wyniki prowadzonych badań inwentaryzacyjnych z użyciem metod serologicznych (13). Stanowią one jeden z ważniejszych problemów zdrowotnych w fermach hodowlanych oraz zakładach treningowych (1, 11, 12, 19, 28, 29). Herpeswirusy koni typ 1 (EHV1) i typ 4 (EHV4) należą do podrodziny *Alphaherpesvirinae* w obrębie rodziny *Herpesviridae* (23, 25, 29). EHV1 odpowiedzialny jest za wywoływanie zakażeń układu oddechowego, masowych ronień klaczy, zejść śmiertelnych źrebiąt w okresie neonatalnym oraz zaburzeń neurologicznych (3, 6, 7, 26, 27, 33). EHV4 wykazuje ściśle powinowactwo antygenowe z EHV1 i uważany jest za główny wirusowy czynnik ostro przebiegających infekcji górnych dróg oddechowych koni (6, 7, 12, 19, 22, 29, 30). Znaczenie tych zarasków jako pierwotnych czynników przyczynowych zakażeń górnych dróg oddechowych koni jest trudne do określenia. Spowodowane jest to naturą zakażeń herpeswirusowych u zwierząt oraz niedoskonałością metod diagnostycznych, a także trudnościami natury tech-

nicznej, zwłaszcza w odniesieniu do izolacji wirusów w hodowli komórkowej.

Podobnie jak większość herpeswirusów EHV1 i EHV4 wywołują u koni utrzymujące się całe życie zakażenia latentne (4). Reaktywacja tych zakażeń wiąże się z okresowymi nawrotami choroby, którym towarzyszy siewstwo zjadliwych wirusów oraz ich transmisja wśród wrażliwej populacji koni. Konie wykazujące objawy ze strony układu oddechowego powinny być badane w kierunku zakażeń herpeswirusowych przy użyciu bezpośrednich metod wirusologicznych. Dodatni wynik badania powinien być wskazaniem do izolacji zwierzęcia oraz ograniczenia obrotu koni mających kontakt ze zwierzętami zakażonymi. Wczesna diagnostyka zakażeń herpeswirusowych koni ma istotne znaczenie dla ograniczenia szerzenia się infekcji w stadninach oraz powodowanych przez nie strat ekonomicznych.

Celem badań była izolacja i identyfikacja herpeswirusów (EHV1 i EHV4) występujących w wymazach z błony śluzowej nosa koni chorujących z objawami infekcji górnych dróg oddechowych oraz w narządach wewnętrznych poronionego płodu przy użyciu metody PCR i badania hodowlanego.

Tab. 1. Wiek koni wykazujących objawy zakażenia górnych dróg oddechowych, od których pobierano do badań wymazy z błony śluzowej nosa

Wiek koni chorych	Liczba koni
< 6 miesięcy	57
7-12 miesięcy	2
1-2 lata	15
3-10 lat	13
> 10 lat	3

Objaśnienia do tab. 2.: – brak efektu cytotatycznego; * efekt cytotatyczny, w nawiasie oznaczenie próbki (numer fermy, numer zwierzęcia); a – liczba wyników dodatnich PCR w kierunku EHV1, w nawiasie oznaczenie próbki; b – liczba wyników dodatnich PCR w kierunku EHV4, w nawiasie oznaczenia próbek

Tab. 2. Wyniki badania wirusologicznego i PCR

Ferma	Liczba pobranych wymazów	Badanie hodowlane, liczba próbek	Wynik zakażenia linii komórkowych			PCR liczba próbek	Wynik badania PCR	
			EEL	RK-13	MDBK		EHV1	EHV4
I	15	10	–	–	–	15	0	0
II	1	1	–	–	–	1	0	0
III	15	10	–	–	–	15	0	0
IV	12	5	–	–	–	12	0	0
V	12	5	–	–	–	12	0	0
VI	5	5	–	–	–	5	0	0
VII	5	5	–	–	–	5	0	0
VIII	11	5	–	–	–	11	0	7 ^b (8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.9, 8.10, 8.11)
IX	7	5	–	–	–	7	0	2 ^b (9.1, 9.2)
X	4	4	–	–	–	4	0	0
XI	1	1	–	–	–	1	0	0
XII	2	2	EHV1 (12.2)*	EHV1 (12.2)*	EHV1 (12.2)*	2	1 ^a (12.2)	0
RAZEM:	90	58		1		90	1	9

Materiał i metody

Badaniami objęto konie w różnym wieku (tab. 1), wykazujące objawy zapalenia błony śluzowej górnych dróg oddechowych o domniemanej etiologii zakaźnej. Badaniem klinicznym u zwierząt stwierdzano objawy ogólne w postaci podwyższenia wewnętrznej ciepłoty ciała (39,3-40,5°C), apatii, zmniejszenia apetytu lub anoreksji. Symptomom tym towarzyszyły objawy narządowe o różnym nasileniu, wśród których najczęściej stwierdzano: przyspieszenie i pogłębienie oddechów, kaszel, zaostrenie szmerów oddechowych nad tchawicą i dużymi oskrzelami, obustronny lub jednostronny wypływ z nosa o różnym charakterze i konsystencji oraz powiększenie regionalnych węzłów chłonnych.

Materiał do badań kolekcjonowano w okresie dwóch kolejnych sezonów hodowlanych. Najwięcej próbek z klinicznych przypadków zakażeń górnych dróg oddechowych pobierano w okresie wiosennym. Materiał pobrano ogółem od 110 zwierząt, głównie źrebiąt i młodych koni, pochodzących z 12 ferm zlokalizowanych na terenie centralnej i południowo-wschodniej Polski (tab. 2). W grupie tej 20 zwierząt nie wykazywało klinicznie uchwytanych objawów chorobowych i służyło jako kontrola. Podstawowy materiał do badań stanowiły wymazy z błony śluzowej jamy nosowej. Przed pobraniem wymazu okolicę nozdrzy oczyszczano i dezynfekowano. Waciki umieszczano w próbkach zawierających po 2 ml płynu Hanksa z dodatkiem antybiotyków (penicylina – 50 000 j.m/ml i streptomycyna – 50 µg/ml) i transportowano do laboratorium w pojemniku z wkładem chłodzącym w temperaturze 4°C. W przypadku wystąpienia ronień u klaczy wykonywano badanie anatomopatologiczne oraz pobierano wycinki narządów wewnętrznych poronionego płodu (płuca, wątroba i śledziona) do badań wirusologicznych oraz w kierunku identyfikacji materiału genetycznego herpeswirusów koni.

Ekstrakcja DNA. Materiał do izolacji genomowego DNA herpeswirusów stanowił homogenizat narządów płodu lub zawiesina wymazów z błony śluzowej nosa w płynie Hanksa

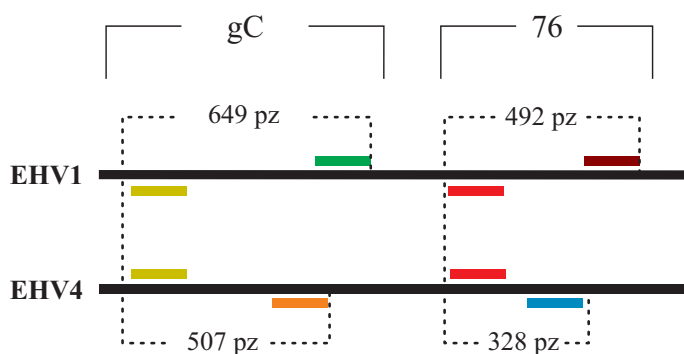
z dodatkiem antybiotyków, po wstępnej inkubacji w temperaturze 4°C. Do ekstrakcji kwasów nukleinowych zastosowano standardową metodę z użyciem proteinazy K oraz fenolu i chloroformu (24). Wyizolowany kwas nukleinowy przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze –20°C. Każdorazowo, równolegle do badanych próbek, wykonywano kontrolę ekstrakcji DNA, wykorzystując zawieszinę wzorcowych szczepów wirusa EHV1, Ab4 oraz EHV4, 2252 (tab. 3) namrażanych w ciągłych liniach komórkowych (kontrola pozytywna).

Startery reakcji PCR. Sekwencje starterów reakcji PCR wybrano w oparciu o analizę dostępnego piśmiennictwa (15) z dwóch regionów konserwatywnych, zlokalizowanych w obrębie genu glikoproteiny C (gC) oraz genu 76 (76) genomu herpeswirusów koni. W badaniach zastosowano dwa zestawy starterów, po trzy startery każdy, odpowiadające obydwu regionom diagnostycznym. Każdy zestaw zawierał starter sensowny typowo swoisty dla EHV1, sensowny typowo swoisty

Tab. 3. Referencyjne szczepy wirusów oraz linie komórkowe wykorzystane w badaniach

Szczepy wirusowe Linie komórkowe*	Pochodzenie
EHV1, Ab-4	Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy
EHV1, Kentucky D	Uniwersytet Weterynaryjny, Wiedeń, Austria
EHV4, 2252	Uniwersytet Weterynaryjny, Wiedeń, Austria
EEL*	Państwowy Instytut Weterynaryjny, Uppsala, Szwecja
MDBK*	Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy
RK-13*	Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

Objaśnienia: EEL – Equine Embryonic Lung; MDBK – Madin-Darby Bovine Kidney; RK – Rabbit Kidney



Objaśnienia (startery PCR):

- EHV1 gC ■ EHV1 76
- EHV4 gC ■ EHV4 76
- EHV1/4 gC ■ EHV1/4 76

Ryc. 1. Regiony w obrębie genu glikoproteiny C (gC) i genu 76 (76) genomów EHV1 i EHV4 amplifikowane w reakcji PCR; długość produktów amplifikacji

dla EHV4 oraz antysensowny, komplementarny do regionu wspólnego dla obydwu typów wirusa. Jeden z zestawów umożliwiał amplifikację specyficznych regionów w obrębie genu gC u obydwu typów wirusa, drugi – amplifikację regionów w obrębie genu 76 (ryc. 1). Parametry reakcji były tak dobrane, aby amplifikacja DNA w obrębie obydwu regionów mogła być prowadzona w tym samym czasie w jednym bloku termocyklera. W efekcie dla każdego amplifikowanego regionu (gC i 76) uzyskiwane były, zależnie od typu wirusa, różnej wielkości produkty (ryc. 1), co pozwalało na równoczesną identyfikację i różnicowanie obydwu herpeswirusów w jednostopniowej reakcji PCR. Równoczesna amplifikacja obydwu regionów pozwala także na potwierdzenie specyficzności reakcji. Sekwencje starterów reakcji PCR przedstawia tab. 4. Startery syntetyzowano w firmie „DNA Gdańsk II”.

Wykonanie reakcji PCR. Matrycę reakcji PCR stanowił DNA ekstrahowany z zawiesiny wymazów z błony śluzowej nosa koni oraz tkanek poronionego płodu lub izolowany z supernatantu zakażonej hodowli komórkowej (kontrola pozytywna). Reakcję przeprowadzano w objętości 50 µl mieszaniny, używając 5 µl matrycy DNA. Każdej reakcji PCR towarzyszyła wykonywana równolegle amplifikacja próbki kontrolnej dodatniej oraz kontroli odczynnikowej, w której w miejsce matrycy DNA dodawano 5 µl wody. Mieszaninę reakcyjną poddawano wstępnej denaturacji przez 5 minut w temperaturze 94°C, a następnie 30 cyklom o następujących parametrach: denaturacja DNA – 94°C, 75 sekund, wiązanie starterów – 56°C, 90 sekund, wydłużanie starterów – 72°C, 90 sekund. Reakcję przeprowadzano w probówkach typu Eppendorf o pojemności 0,5 ml w termocyklerze Biometra T3 (Niemcy). Po zakończeniu reakcji produkty PCR przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze –20°C.

Analiza produktów amplifikacji. Produkty amplifikacji analizowano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Sigma), przygotowanym w buforze TBE w obecności wzorca masowego (100 bp DNA, Fermentas, Litwa). Żele barwiono przez 20 minut roztworem bromku etydy, oglądano w świetle promieni UV (transiluminator Villber Lourmat, Francja) oraz wykonywano dokumentację fotograficzną (Gel-Doc Villber Lourmat, Francja). Wynik reakcji PCR uznawano za dodatni w przypadku obecności w żelu pojedynczych prążków DNA o wielkości określonej lokalizacją odpowiednich

Tab. 4. Sekwencje starterów reakcji PCR

Nazwa startera	Kierunek (5'→3')	Sekwencja (5'→3')	Region
EHV1 gC	→	GCGAGATGTGGTTGCCTAATCTCG	gC
EHV4 gC	→	AGCCACGAACAACCTCAACCGATGT	gC
EHV1/4 gC	←	GAGACGGTAACGCTGGTACTGTAA	gC
EHV1 76	→	GAGGCTGCCGAGTTGTTATAC	76
EHV4 76	→	CTGAAGAAATCTACGAGATGCATA	76
EHV1/4 76	←	GTTTCGTTGTCGCTTTCGCTGTA	76

par starterów w genomie (ryc. 1). Specyficzność produktów amplifikacji potwierdzano na podstawie obecności w żelu podwójnych prążków dla każdego typu herpeswirusa, zgodnie z założeniami jednostopniowej reakcji PCR (15).

Badanie hodowlane. Waciki z wymazami z błony śluzowej nosa inkubowano w płynie Hanksa z dodatkiem antybiotyków w temperaturze 4°C przez 4 godziny. Po inkubacji próbki porcjowano i przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych badań. Wycinki narządów wewnętrznych poronionego płodu umieszczano w płynie Hanksa i poddawano homogenizacji (Homogenizator MPW-120, Polska), uzyskując 10% zawiesinę tkanki. Materiał przechowywano w temperaturze –80°C.

Isolację i identyfikację herpeswirusów w hodowlach komórkowych wykonywano z użyciem materiału pochodzącego od reprezentatywnej grupy zwierząt z każdego z badanych środowisk (tab. 2). Do badań użyto próbek pochodzących z klinicznych przypadków zakażeń górnych dróg oddechowych koni. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano referencyjne szczepy wirusów EHV1 i EHV4 (tab. 3). Do izolacji wirusów w hodowli tkankowej propagowano trzy linie komórkowe, nerki bydłowej (MDBK – Madin-Darby bovine kidney), nerki królika (RK-13 – rabbit kidney) oraz płuc płodu końskiego (EEL – equine embryonic lung) (tab. 3). Linie pasażowano w butelkach plastikowych (Iwaki, Japonia) o powierzchni dna 25, 75, 150 lub 225 cm² według ogólnie przyjętych zasad, używając jako podłoża wzrostowego płynu Eagle'a (MEM – Minimum Essential Medium Eagle, Sigma Aldrich, Niemcy) z dodatkiem 10% bydłowej surowicy płodowej (Fetal Bovine Serum, Sigma Aldrich, Niemcy) oraz L-glutaminy z dodatkiem penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (0,1 mg/ml) (L-glutamine Penicillin Streptomycin Solution Stabilised, Sigma Aldrich, Niemcy). Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C.

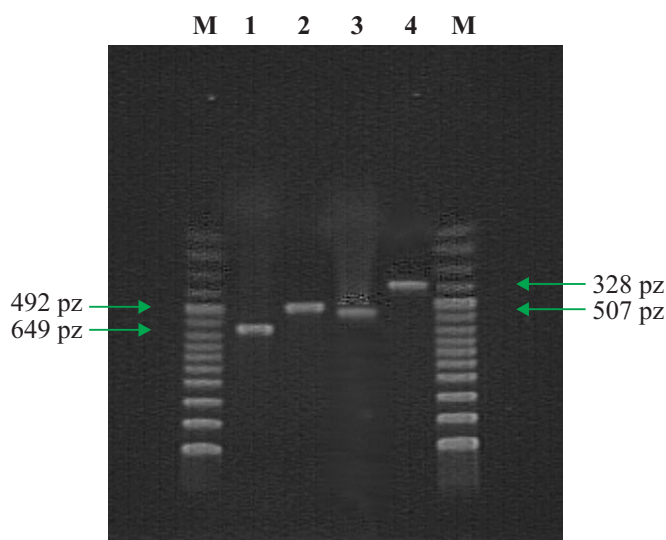
Do zakażenia linii komórkowych materiałem uzyskanym z wymazów z błony śluzowej nosa lub z tkanek poronionego płodu wykorzystywano 24-godzinne hodowle w butelkach o powierzchni dna 25 cm², pasażowane w rozcieńczeniu 1 : 2 i wykazujące około 80% pokrycia powierzchni wzrostowej. Próbką pochodzącą od jednego zwierzęcia zakażano równoległe trzy wymienione linie komórkowe. Równoległe wykonywano zakażenia kontrolne, używając referencyjnych szczepów wirusów EHV1, Ab-4 o mianie 10^{3.5} TCID₅₀ i EHV4, 2252 o mianie 10^{3.4} TCID₅₀. Zakażone hodowle komórek kontrolowano mikroskopowo przez 5 dni na obecność efektu cytopatycznego (CPE). Wstępnej identyfikacji wyizolowanego wirusa dokonywano poprzez określenie spektrum tkanek wrażliwych na zakażenie, charakteru zmian mikroskopowych w zakażonych hodowlach i szybkości ich rozprzestrzeniania się. Obecność herpeswirusów koni w materiale użytym do zakażenia potwierdzano poprzez wykazanie ich materiału genetycznego metodą PCR.

Wyniki i omówienie

W toku przeprowadzonych obserwacji klinicznych stwierdzono, że najczęściej przypadków jawnych zakażeń górnych dróg oddechowych koni miało miejsce w okresie późnowiosennym. Spośród 90 koni, objętych badaniami na przestrzeni dwóch pełnych sezonów hodowlanych, u 51 do zachorowania doszło w kwietniu, u 23 w maju, u 12 w czerwcu, u 3 w listopadzie, u 1 w grudniu. Większość klinicznych przypadków tych zachorowań (63,3%) dotyczyła źrebiąt i młodych koni w wieku do 6. miesiąca życia (tab. 1). Z danych wynikało, że w okresie poprzedzającym wystąpienie zakażeń górnych dróg oddechowych w wytypowanych do badań stadninach konie nie były narażone na działanie czynników stresowych, mogących mieć związek przyczynowy z zachorowaniami. Ustalono natomiast, że przypadki infekcji górnych dróg oddechowych, sporadycznie wikłane zapaleniem płuc i niekiedy kończące się zejściem śmiertelnym występowały w tych fermach regularnie w cyklu rocznym, najczęściej w okresie wiosennym.

Wymazy z błony śluzowej od 110 koni poddano wstępnie badaniu metodą PCR w kierunku identyfikacji materiału genetycznego herpeswirusów koni typu 1 i 4. Dodatkowo analizie metodą PCR poddano homogenizaty narządów wewnętrznych (płuca, wątroba, śledziona) płodu poronionego przez klacz z grupy zwierząt chorych. Wyniki badań prezentują tab. 2 i ryc. 2. Obecność DNA herpeswirusa koni typu 4 (EHV4) stwierdzono w 9 próbkach, pochodzących od 9 zwierząt z dwóch ferm (VIII i IX). Kwas nukleinowy herpeswirusa koni typu 1 (EHV1) stwierdzono tylko w jednym wymazie (ferma XII). Żrebna klacz, od której pochodził badany materiał wykazywała typowe dla infekcji wirusowej objawy kliniczne niezbytowego zapalenia górnych dróg oddechowych w postaci surowiczego-śluzowego wypływu z nosa, krótkotrwałej apatii i zmniejszenia apetytu. Ciepłota wewnętrzna utrzymywała się w granicach norm fizjologicznych. Wymienione objawy utrzymywały się przez 4 dni. W 9. miesiącu ciąży u klaczy doszło do poronienia. W wywiadzie ustalono, że wydalenia płodu nie poprzedzały klinicznie uchwytnie objawy zwiastunowe. Ogólny stan zdrowia klaczy w okresie po poronieniu również nie odbiegał od normy. Badaniem anatomopatologicznym płodu wykazano obecność zwiększonej ilości płynu w jamach ciała, przekrwienie narządów wewnętrznych, podtorebkowe, punkcikowate wybroczyny w narządach mięsistych oraz drobne ogniska martwicowe w wątrobie (ryc. 3). Zmiany te nasuwały podejrzenie wirusowego ronienia klaczy na tle zakażenia EHV1. Metodą PCR w homogenizatach ze wszystkich badanych narządów wewnętrznych płodu stwierdzono obecność materiału genetycznego EHV1, co świadczy, że wirus ten był przyczyną ronienia.

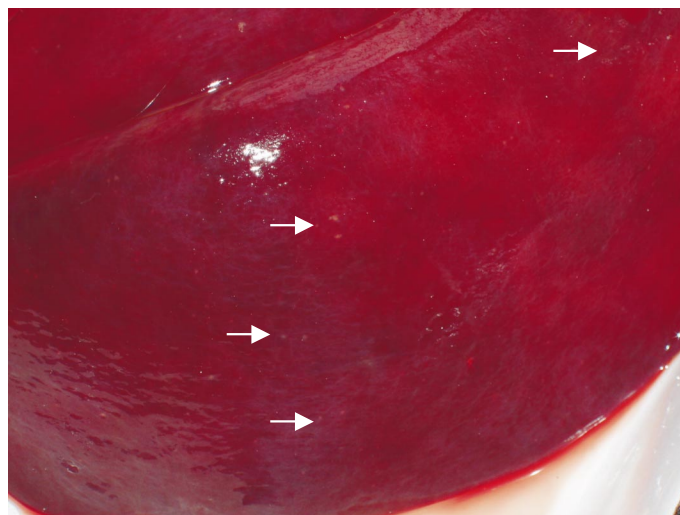
Reprezentatywną grupę 58 próbek pobranych od 90 koni pochodzących z 12 środowisk oraz materiał z tkanek poronionego płodu poddano próbie izolacji wirusów w hodowli komórkowej poprzez zakażenie badany materiał trzema liniami ciągłymi (RK-13, EEL, MDBK). Wyniki badania hodowlanego podano w tab. 2.



Ryc. 2. Produkty reakcji PCR uzyskane na matrycy DNA terenowych szczepów EHV1 i EHV4 z użyciem starterów komplementarnych do regionów w obrębie genu glikoproteiny C (gC) i genu 76 (g76)

Objaśnienia: M – marker masy cząsteczkowej (100bp DNA ladder, MBI Fermentas, Litwa); nr 1 – EHV1-12.2 – startery EHV1 gC; EHV1/4 gC; nr 2 – EHV1-12.2 – startery EHV1 76, EHV1/4 76; nr 3 – EHV4-9.1 – startery EHV4 gC, EHV1/4 gC; nr 4 – EHV4-9.1 – startery EHV4 76, EHV1/4 76. Oznaczenia szczepów podano zgodnie z tab. 2; oznaczenia starterów – zgodnie z tab. 4.

Pozytywny efekt izolacji i adaptacji do hodowli komórkowej uzyskano w odniesieniu do dwóch szczepów EHV1. Jeden szczep wyizolowano z wymazu z błony śluzowej górnych dróg oddechowych klaczy (ferma XII), a drugi z poronionego przez nią płodu. Obydwa szczepy namnażały się na wszystkich, wykorzystanych w badaniach liniach komórkowych, powodując pojawienie się po 48-72 godzinach inkubacji hodowli charakterystycznego efektu cytopatycznego, obejmującego 80-100% powierzchni wzrostowej. Dodatni wynik badania hodowlanego potwierdzono metodą PCR, używając do ekstrakcji DNA supernatantu zakażonej hodowli komórkowej.



Ryc. 3. Badanie anatomopatologiczne poronionego płodu. Widoczne drobne ogniska martwicowe w wątrobie

Nie powiodła się natomiast próba izolacji i adaptacji do hodowli komórkowych herpeswirusów koni typu 4, których materiał genetyczny stwierdzono metodą PCR w 9 próbkach, pochodzących z wymazów z błony śluzowej górnych dróg oddechowych. W żadnej z użytych do badań linii komórkowych nie stwierdzono efektu cytopatycznego, świadczącego o obecności w badanym materiale innych wirusów, wykazujących predylekcję do układu oddechowego. W odniesieniu do próbek pobranych od 20 koni z grupy kontrolnej wyniki obydwu badań wirusologicznych były ujemne.

Przeprowadzone badania wirusologiczne miały na celu izolację oraz identyfikację i różnicowanie dwóch głównych czynników przyczynowych zakażeń górnych dróg oddechowych koni – EHV1 i EHV4. Badania obejmowały próbę izolacji wirusów z użyciem trzech linii komórkowych oraz metodę PCR z użyciem dwóch zestawów starterów. Badanie hodowlane wypadło pozytywnie w przypadku dwóch próbek, z których wyizolowano szczepy EHV1. Jeden szczep (LB-99) pochodził z wymazu z błony śluzowej nosa, natomiast drugi (LB-00) z tkanek poronionego płodu. Badanie tych samych próbek metodą PCR potwierdziło obecność EHV1 w dwóch próbkach dodatnich w badaniu hodowlanym oraz wykazało obecność DNA herpeswirusów dodatkowo w 9 próbkach. Na podstawie wielkości uzyskanych produktów amplifikacji zidentyfikowano je jako zawierające DNA EHV4.

Uzyskane wyniki wskazują na zasadność równoczesnego stosowania w tego typu badaniach kilku różnych metod diagnostycznych, co pozwala na zminimalizowanie ograniczeń, wynikających ze specyfiki poszczególnych testów, przy jednoczesnym zwiększeniu prawdopodobieństwa rozpoznania. W odniesieniu do metody izolacji wirusów w hodowli komórkowej istotnym ograniczeniem jest moment pobierania od chorych koni wymazów do badania wirusologicznego. Wykazano, że w zakażeniach górnych dróg oddechowych koni zdolne do replikacji cząsteczki wirusów pojawiają się w wydzielinie zapalnej w większej ilości najczęściej w okresie krótkotrwałej wiremii, która manifestuje się klinicznie wzrostem temperatury wewnętrznej (29). Wyjątkiem jest wirus zapalenia nosa typu B (ERBV), który można izolować z wymazów z błony śluzowej nosa zwierząt chorych nawet do miesiąca po zakażeniu (5). Fazę wiremii, w której pobranie materiału daje największe szanse izolacji zarazka, niekiedy trudno jest uchwycić. Ponadto wirusy z predylekcją do górnych dróg oddechowych często wywołują zakażenia o przebiegu subklinicznym lub bezobjawowym. Na ten fakt zwrócili uwagę, między innymi, Carman i wsp. (5), w opublikowanych wynikach badań serologicznych koni chorych oraz nie wykazujących objawów choroby, pochodzących ze środowisk, w których okresowo występowały infekcje dróg oddechowych.

Znaczenie w badaniach wirusologicznych ma także sposób pobierania materiału oraz czas i warunki jego transportu do pracowni diagnostycznej. Obecność lipoproteinowej otoczki w wirionach herpeswirusów czyni te zarazki wrażliwymi na czynniki środowiska zewnętrznego. W badaniach własnych poprzez wykorzystanie

podłoży transportowych oraz pojemników z lodem ograniczono wpływ czynników zewnętrznych na żywotność wirusów.

Badanie hodowlane w przypadku zakażeń wirusowych uznawane jest za „złoty standard” diagnostyczny, jednak nie wszystkie wirusy dają się łatwo adaptować do wzrostu i namnażania w hodowli komórek, zwłaszcza w odniesieniu do próbek materiału klinicznego. Znaczne rozbieżności w tym zakresie stwierdzane są często nawet w obrębie jednej rodziny wirusów. Przykładowo, EHV1 daje się łatwo izolować w wielu liniach komórkowych, szczególnie z tkanek poronionego płodu, natomiast EHV4 pomimo szerokiego rozprzestrzenienia w populacji koni, rzadko jest izolowany (10). Ponadto niektóre wirusy, np. wirus zapalenia nosa typu A, nie zawsze powodują powstanie charakterystycznego efektu cytopatycznego w zakażonej hodowli (16).

Badania dotyczące izolacji i identyfikacji wirusowych czynników etiologicznych infekcji dróg oddechowych koni prowadzone były w wielu krajach świata (5, 9, 10, 14, 19, 21). Uzyskiwane wyniki nie zawsze jednak wskazywały jednoznacznie na przyczynę zachorowań. Lakritz i wsp. (14) badali źrebięta w wieku 1-7 miesięcy, wykazujące objawy zaburzeń oddechowych w kierunku wykrywania herpeswirusów, adenowirusów oraz wirusa grypy koni. Na 11 badanych zwierząt tylko w jednym przypadku autorom udało się wyizolować szczep herpeswirusa koni należący do typu 2 (EHV2), który z uwagi na ubikwitarne występowanie, łatwość hodowli i częste nosicielstwo u zwierząt zdrowych rzadko uznawany jest za przyczynę infekcji. Badania na obszerniejszym materiale opublikowali Gilkerson i wsp. (10). Na 327 badanych wymazów z błony śluzowej nosa źrebiąt pozytywny wynik izolacji herpeswirusa typu 4 uzyskano tylko w 19 przypadkach (5,8%). Dodatkowo wyniki badania hodowlanego potwierdzono metodą PCR, w której obecność materiału genetycznego EHV4 wykazano dodatkowo w 7 wymazach (8%). Wyniki tych badań potwierdziły zasadność równoczesnego stosowania kilku testów diagnostycznych, co wykazano także w badaniach własnych. Wyniki 10-letnich badań nad występowaniem zakażeń herpeswirusowych u koni opublikowali w Japonii Matsumura i wsp. (19). W populacji 3326 zwierząt w różnym wieku typ 1 herpeswirusa wyizolowano z 38 wymazów z nosa, typ 4 z 60, a typ 2 z 86 próbek. W odniesieniu do wysokiego odsetka izolacji EHV2 autorzy przytaczają sugestię Studderta (cyt. 14) dotyczącą braku związku tego wirusa z infekcjami dróg oddechowych. Carman i wsp. (5) przeprowadzili natomiast porównawcze badania 92 koni z objawami ostrego zapalenia dróg oddechowych w kierunku identyfikacji wirusów zapalenia nosa typu A i B, herpeswirusa typu 1 oraz wirusa grypy. W badaniu hodowlanym oraz w teście seroneutralizacji pozytywny wynik uzyskano w odniesieniu do wirusa grypy, odpowiednio, w 4,3% i 36% przypadków, ERAV w 0% i 9,8% przypadków, ERBV w 14% i 30,4% przypadków oraz EHV1 w 0% i 22% przypadków. Analiza wyników tych badań wskazuje na rozbieżności pomiędzy oceną serologiczną i badaniem hodowlanym, co potwierdzono także w poprzednich badaniach własnych (13).

Zakażenia koni z udziałem EHV1 zwykle badane są w kontekście wywoływania ronień klaczy, padnięć źrebiąt w okresie okołoporodowym, a niekiedy zaburzeń neurologicznych (18, 20). Rzadko natomiast zarazek izolowany jest z górnych dróg oddechowych. Kliniczne objawy zakażenia pierwotnego lub reaktywacji wirusa ze stanu latencji są zazwyczaj słabo nasilone i często pozostają niezauważone. W badaniach własnych tylko w jednym przypadku udało się wyizolować ten wirus z wymazu z błony śluzowej nosa klaczy, która poroniła, a z narządów wewnętrznych płodu wyizolowano EHV1. W dalszych badaniach potwierdzono tożsamość tego izolatu z uzyskanym z wymazu. Wprawdzie opisany przebieg choroby oraz sekwencja występowania objawów były dość typowe, ale w przypadkach, kiedy nie dochodzi do poronienia, z reguły trudno jest powiązać wystąpienie niespecyficznych objawów ze strony układu oddechowego z zakażeniem EHV1. Opis analogicznego przypadku ronienia u klaczy, poprzedzonego zakażeniem górnych dróg oddechowych, podają Crabb i Studdert (6, 7).

Nowoczesna diagnostyka zakażeń herpeswirusowych koni, poza różnicowaniem poszczególnych typów, powinna zmierzać w kierunku różnicowania szczepów EHV1 wywołujących ronienia, zaburzenia neurologiczne i zakażenia układu oddechowego. Wyniki ostatnich badań wskazują, między innymi, na możliwość wykorzystania testu Real Time PCR do różnicowania neuropatogennych i nieneuropatogennych szczepów EHV1 na podstawie różnic genetycznych w obrębie genu polimerazy (2). Metodę tę zastosowano także do rutynowej, szybkiej diagnostyki zakażeń EHV1 (8). Przydatny do celów diagnostyki i różnicowania zakażeń herpeswirusowych jest także test PCR-multiplex, umożliwiający wykrywanie i różnicowanie dwóch lub więcej typów wirusa w jednej reakcji (15, 31). Zastosowanie tej metody do różnicowania EHV1, EHV2, EHV4 i EHV5 opisali Wang i wsp. (32). Wykorzystana w badaniach własnych jednostopniowa reakcja PCR-multiplex okazała się przydatną do wykrywania oraz różnicowania dwóch najważniejszych herpeswirusów koni, EHV1 i EHV4. Wysoka czułość i specyficzność metody PCR w połączeniu z prostotą wykonania oraz znaczną oszczędnością czasu czyni z niej wygodną alternatywę dla metod konwencjonalnych, takich jak badanie hodowlane, dotychczas uznawane za test odwoławczy.

Piśmiennictwo

- Allen D. A., Bryans J. T.: Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress Vet. Microbiol. Immunol.* 1986, 2, 78-144.
- Allen G. P., Breathnach C. C.: Quantification by Real-time PCR of the magnitude and duration of leukocyte-associated viremia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV1. *Equine vet. J.* 2006, 38, 252-257.
- Allen G. P., Kydd J. H., Slater J. D., Smith K. C.: Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of Equine Herpesvirus abortion. [w:] Wernery U., Wade J. F., Mumford J. A., Kaaden O. R. (wyd.): *Equine Infectious Diseases VIII*. 8-th Int. Conf., Dubai, R&W Publications, Newmarket 1998, 129-146.
- Bañbura M.: Latencja i związane z latencją transkrypty z zakażeniach herpeswirusem koni typu 1 (EHV1). *Post. Mikrobiol.* 1999, 38, 345-353.
- Carman S., Rosendal S., Huber L., Gyles C., McKee S., Willoughby R. A., Dubovi E., Thorsen J., Lein D.: Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, 9, 17-23.
- Crabb B. S., Studdert M. J.: Equine herpesviruses 4 (Equine Rhinopneumonitis Virus) and 1 (Equine Abortion Virus). *Adv. Virus. Res.* 1995, 45, 153-190.
- Crabb B. S., Studdert M. J.: Equine Rhinopneumonitis (Equine Herpesvirus 4) and Equine Abortion (Equine Herpesvirus 1). [w:] Studdert M. J. (red): *Virus infections of Vertebrates*, vol. 6 *Virus Infections of Equines*, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands 1996, 11-37.
- Diallo I. S., Hewitson G., Wright L., Rodwell B. J., Corney B. G.: Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 2006, 131, 92-98.
- Dynon K., Black W. D., Ficorilli N. P., Hartley C. A., Studdert M. J.: Detection of viruses in nasal swab samples from horses with acute, febrile, respiratory disease using virus isolation, polymerase chain reaction and serology. *Aust. Vet. J.* 2007, 85, 46-50.
- Gilkerson J., Jorm L. R., Love D. N., Lawrence G. L., Whalley J. M.: Epidemiological investigation of equid herpesvirus-4 (EHV4) excretion assessed by nasal swabs taken from thoroughbred foals. *Vet. Microbiol.* 1994, 39, 275-283.
- Gilkerson J. R., Whalley J. M., Drummer H. E., Studdert M. J., Love D. N.: Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet. Microbiol.* 1999a, 68, 15-25.
- Gilkerson J. R., Whalley J. M., Drummer H. E., Studdert M. J., Love D. N.: Epidemiology of EHV1 and EHV4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley Stud farm: are mares the source of EHV1 for unweaned foals. *Vet. Microbiol.* 1999b, 68, 27-34.
- Grądzki Z., Boguta L.: Występowanie przeciwciał dla herpeswirusów EHV1 i EHV4 w populacji koni na terenie południowo-wschodniej Polski. *Medycyna Wet.* (w druku).
- Lakritz J., Wilson W. D., Berry C. R., Schrenzel M. D., Carlson G. P., Madigan J. E.: Bronchointerstitial pneumonia and respiratory distress in young horses: clinical, clinopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989). *J. Vet. Intern. Med.* 1993, 7, 277-288.
- Lawrance G. L., Gilkerson J., Love D. N., Sabine M., Whalley J. M.: Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods* 1994, 47, 59-72.
- Li F., Drummer H. E., Ficorilli N., Studdert M. J., Crabb B. S.: Identification of noncytotoxic equine rhinovirus 1 as a cause of acute febrile respiratory disease in horses. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 937-943.
- Maanen C. V.: Equine herpesviruses 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.* 2002, 24, 58-78.
- Maanen C. V., Oldruitenborgh-Oosterbaan M. M., Damen E. A., Derksen A. G.: Neurological disease associated with EHV1 infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Eq. Vet. J.* 2001, 33, 191-196.
- Matsumura T., Sugiura T., Imagawa H., Fukunaga Y., Kamada M.: Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. *J. Vet. Med. Sci.* 1998, 54, 207-211.
- McCartan C. G., Russell M. M., Wood J. L., Mumford J. A.: Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet. Rec.* 1995, 136, 7-12.
- Mumford E. L., Traub-Dargatz J. L., Salman M. D., Collins J. K., Getzy D. M., Carman J.: Monitoring and detection of acute viral respiratory tract disease in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 213, 385-390.
- O'Keefe J. S., Alley M. R., Jones D., Wilks C. R.: Neonatal mortality due to equid herpesvirus 4 (EHV4) in a foal. *Aust. Vet. J.* 1995, 9, 353-354.
- Reed S. M., Toribio R. E.: Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 2004, 20, 631-642.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, New York 1989.
- Slater J. D.: Equine herpesviruses. [w:] Sellon D. C. (red.): *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA 2007, 134-153.
- Slater J. D., Borchers K., Field H. J.: Equine herpesvirus-1: a neurotropic alphaherpesvirus. *Vet. Rec.* 1994, 135, 239-240.
- Smith K. C.: Herpesviral Abortion in Domestic Animals. *Vet. J.* 1997, 153, 253-268.
- Studdert M. J.: Equine herpesvirus 2 and disease. *Eq. Vet. J.* 1996a, 28, 426-428.
- Studdert M. J.: Herpesviridae. [w:] *Virus infections of Vertebrates*. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands 1996, 6, 9-31.
- Verheyen K., Newton J. R., Wood J. L. N., Birch-Machin L., Hannant D., Humberstone R. W.: Possible case of EHV4 ataxia in warmblood mare. *Vet. Rec.* 1998, 143, 456.
- Verrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C. A., Studdert M. J., Drummer H. E.: Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 2001, 79, 563-569.
- Wang L., Raidal S. L., Pizzirani A., Wilcox G. E.: Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Vet. Microbiol.* 2007, 121, 18-28.
- Whitwell K. E., Blunden A. S.: Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Eq. Vet. J.* 1992, 24, 13-19.