

Equine infectious anemia virus infections

Dzieciatkowski T.¹, Golke A.², Słońska A.²,
Department and Division of Medical Microbiology,
Medical University of Warsaw¹, Division of Virology,
Department of Preclinical Sciences, Faculty of
Veterinary Medicine, Warsaw University of Life
Sciences – SGGW²

The purpose of this article was to present a novel diagnostic approach to equine infectious anemia virus (EIAV), infections in animals of target species. Equine infectious anemia (EIA), is a reportable, eradicable epizootic disease caused by the equine lentivirus, which affects equids only and occurs worldwide. The virus is transmitted by blood, mainly by sanguivorous insects. The main clinical signs of the disease are pyrexia, apathy, anemia, loss of weight and deterioration of animal condition. However, infected horses can also be inapparent carriers without any overt symptoms. The disease is usually diagnosed by serological methods like Coggins test and ELISA. At present, Poland is officially free from EIAV but there is a permanent risk of recurrent introducing the virus as cases of EIA have been recently reported in other European countries. It is therefore a strong need for sensitive, fast and reliable methods of EIAV carriers identification. An overview of novel diagnostic procedures for EIA was presented.

Keywords: equine infectious anemia, lentivirus, diagnostic procedures, vaccine.

Niedokrwistość zakaźna koni (equine infectious anemia – EIA) jako jednostka chorobowa została po raz pierwszy opisana we Francji w 1843 r. przez Ligné, jednak do początku XX wieku uważano, że jej główną przyczyną są problemy żywieniowe, takie jak nieodpowiednia dieta

Zakażenia wirusem niedokrwistości zakaźnej koni

Tomasz Dzieciatkowski¹, Anna Golke², Anna Słońska²

z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego¹ oraz Zakładu Wirusologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie²

(1, 2). W 1888 r. choroba została rozpoznana u koni w Stanach Zjednoczonych, gdzie wciąż stanowi poważny problem w hodowlach koni. W 1904 r. stwierdzono, że choroba ta wywoływana jest przez tzw. czynnik przesączalny (filterable agent), dzięki czemu niedokrwistość zakaźną koni uważa się za pierwszą chorobę zwierzęcą o potwierdzonej etiologii wirusowej. Niedokrwistość zakaźna koni była również pierwszą chorobą wywoływaną przez lentiwirusy, dla której zatwierdzono test diagnostyczny oraz pierwszą, w stosunku do której potwierdzono, iż jest przenoszona przez owady (2).

Choroba ta wywoływana jest przez wirusy należące do rodziny *Retroviridae*, podrodziny *Lentivirinae*, rodzaju *Lentivirus*. Genom wirusa niedokrwistości zakaźnej koni (equine infectious anemia virus – EIAV) należy do najmniejszych i genetycznie najprostszycy genomów w obrębie tego rodzaju. Zbudowany jest z jednoniciowego RNA i ma długość 8,2 kb (3, 4).

EIAV powoduje u koni zakażenia przetrwałe, charakteryzujące się nawracającymi cyklami wirerii, w trakcie których obserwuje się objawy kliniczne, takie jak: gorączka, niedokrwistość, małopłytkowość oraz oznaki ogólnego wyniszczenia organizmu

(2, 3). Wirus niedokrwistości zakaźnej koni był również pierwszym wirusem wywołującym zakażenia przetrwałe, u którego potwierdzono występowanie zjawiska przesunięcia antygenowego (2).

Objawy i patogeneza

Przebieg choroby, odpowiedź immunologiczna i replikacja wirusa niedokrwistości zakaźnej koni zostały dobrze poznane, zarówno u koni, jak i u kuców (*Equus caballus*). Istnieją również doniesienia dotyczące przebiegu eksperymentalnego zakażenia EIAV u osłów i mułów (2). Osły, chociaż są wrażliwe na zakażenie, nie wykazują klinicznych objawów choroby, z wyjątkiem zmniejszenia liczby płytek krwi. Natomiast poziom wirusowego RNA w surowicy tych zwierząt 20 dni po zakażeniu był nawet 10 000 razy niższy niż u kuców zakażonych tym samym szczepem wirusa. Zaobserwowano jednak, że w hodowlach komórkowych makrofagów końskich i osłów replikacja EIAV zachodziła na porównywalnym poziomie, co może wskazywać na ścisły związek pomiędzy poziomem replikacji a przebiegiem zakażenia (5). Sugeruje się więc, że replikacja musi osiągnąć pewien krytyczny

poziom, aby mogły wystąpić kliniczne objawy choroby.

W oparciu o obserwacje poczynione w trakcie zakażeń doświadczalnych w przebiegu choroby rozróżnia się trzy fazy: ostrą, przewlekłą i bezobjawową, przy czym choroba może ponownie przejść z fazy bezobjawowej do przewlekłej, m.in. w wyniku wystąpienia immunosupresji (2).

W początkowych etapach zakażenia, w ostrej fazie choroby, pojawia się wysoka gorączka (do 40°C), która utrzymuje się przez cały okres trwania tego stadium. Dodatkowo towarzyszy jej znaczny spadek liczby płytek krwi. Ostra faza choroby może trwać od kilku dni do kilku tygodni (najczęściej 3–4 tygodnie) i w niektórych przypadkach kończy się śmiercią zwierzęcia. Z wysoką gorączką związane są objawy, takie jak osłabienie, nadmierne pragnienie i pocenie się. Niekiedy obserwuje się również zaburzenia neurologiczne – chwiejny chód, częściowe lub zupełne porażenie warg, małżowin usznych, ogona, a niekiedy i kończyn. Występuje także gwałtowne bicie serca, które nieraz można zauważyć po wstrząsach na zewnętrznej stronie klatki piersiowej. Ze względu na istniejącą w przebiegu zakażenia trombocytopenię często mogą występować krwawienia z nosa oraz błony śluzowej sromu. Wynikająca z małopłytkowości skłonność do krwawień jest jednym z pierwszych i występujących niemal we wszystkich przypadkach objawem choroby. Niekiedy zdarza się jednak, że w pierwszych etapach choroby objawy nie są nasilone i mogą zostać przeoczone (2,3).

Objawy ostrej fazy choroby zazwyczaj ustępują po kilku, kilkunastu dniach i przechodzi ona w fazę przewlekłą (niekiedy nazywaną fazą podostrą), z okresowo nawracającymi objawami klinicznymi. Taki stan może trwać od kilku tygodni do kilku miesięcy. Częstość nawrotów ciężkich objawów klinicznych może być różna u różnych osobników, nawet w przypadku zakażenia tym samym szczepem wirusa (6, 7). W tym stadium choroby zaczynają być widoczne objawy niedokrwistości. W miarę postępowania choroby śluzówki oczu, nosa i jamy ustnej stają się blade z odcieniem żółtawym, występuje osłabienie mięśni i utrata apetytu, przyspieszony oddech i nieregularny rytm serca. W odróżnieniu od innych zakażeń lentiwirusowych, które zazwyczaj powodują wolno postępujące choroby prowadzące po pewnym czasie do śmierci, u zwierząt zakażonych EIAV po fazie przewlekłej następuje najczęściej bezobjawowa faza choroby. Zwierzęta nie wykazują objawów klinicznych, jednak pozostają zakażone do końca życia i mogą stanowić źródło zakażenia dla innych osobników. Niekiedy choroba może

postępować, co objawia się stopniowym wycieńczeniem zwierzęcia (2).

Intrygującą cechą zakażenia wirusem niedokrwistości zakaźnej koni jest fakt, iż układ immunologiczny większości zwierząt jest w stanie kontrolować replikację wirusa (6, 8). W odróżnieniu od innych retrovirusów długoterminowe zakażenie EIAV związane jest z ograniczoną replikacją wirusa i brakiem objawów klinicznych. Mechanizmy układu odpornościowego odpowiedzialne za tę kontrolę mogą mieć znaczenie podczas opracowywania szczepionek przeciwko innym zakażeniom retrowirusowym (2).

W zakażeniach eksperymentalnych potwierdzono replikację wirusa niedokrwistości zakaźnej koni w różnych narządach, m.in. w śledzionie, wątrobie, płucach, węzłach chłonnych oraz w szpiku kostnym. Podobnie jak w przypadku innych lentiwirusów, EIAV zakaża głównie monocyty i makrofagi. Stanowią one także miejsce integracji prowirusowego DNA (9). U eksperymentalnie zakażonych koni stwierdzono występowanie wirusowego RNA również w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, jednak wyłącznie w ostrej fazie choroby. Istnieje przypuszczenie, że małopłytkowość pojawiająca się w pierwszych stadiach choroby może być związana z zakażeniem komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, co przyczynia się do agregacji płytek krwi. Monocyty krwi obwodowej są wrażliwe na zakażenie EIAV, jednak dochodzi w nich jedynie do odwrotnej transkrypcji wirusowego RNA, a pełna replikacja wirusa zachodzi dopiero w makrofagach tkankowych. Określone jest to niekiedy zjawiskiem „konia trojańskiego”, gdyż wirus niezauważony przedostaje się do tkanek w zakażonych monocytach (2, 10).

Epidemiologia i transmisja

Uważa się, że niedokrwistość zakaźna koni jest chorobą o ogólnoświatowym zasięgu, jednak ze względu na to, iż wirus przenoszony jest przez owady, najczęściej występuje ona w krajach o ciepłym klimacie, na nisko położonych, obfitujących w opady obszarach (2, 3). Do zakażeń dochodzi najczęściej w okresie letnim. Największy problem choroba stanowi w podmokłych rejonach Stanów Zjednoczonych, w Ameryce Środkowej, Afryce Południowej oraz w północnej Australii. W Europie niedokrwistość zakaźna koni występuje sporadycznie. Ze względu na brak powszechnych badań epizootologicznych bardzo trudno jest oszacować jaki procent populacji koni na świecie zakażonych jest obecnie tym wirusem. Aby ograniczyć rozprzestrzenianie się EIAV, w Stanach Zjednoczonych konie są rutynowo badane przed

dopuszczeniem do startów w wyścigach, przed uczestnictwem w pokazach, kryciem bądź przekraczaniem granicy. Zwierzęta seropozytywne w zależności od lokalnych regulacji prawnych są poddawane eutanazji bądź podlegają kwarantannie do końca życia (2).

Do zakażenia wirusem niedokrwistości zakaźnej koni dochodzi poprzez jego mechaniczne przeniesienie wraz z krwią zakażonych zwierząt przez owady lub niesterylne narzędzia, takie jak igły, tarniki do zębów czy sondy (2). Obecność wirionów EIAV stwierdzono także w nasieniu ogierów, nie ma jednak potwierdzonych danych o przenoszeniu wirusa drogą kontaktów płciowych (11). Główną drogę transmisji stanowią owady z rodziny *Tabanidae* (bąkowate), zwłaszcza gzy końskie (12).

Diagnostyka

Diagnostyka niedokrwistości zakaźnej koni opiera się na testach serologicznych, wśród których najpowszechniej wykorzystuje się test immunodyfuzyjny w żelu agarozowym (AGID) oraz kompetycyjny test immunoenzymatyczny (c-ELISA; 13).

Test immunodyfuzyjny w żelu agarozowym (AGID) został opracowany przez Cogginsa w 1970 r. i do dziś określane jest jako „złoty standard” w diagnostyce niedokrwistości zakaźnej koni (14). W teście tym do wykrywania obecności swoistych przeciwciał przeciwko wirusowemu białku p26 w surowicy koni wykorzystywany jest oczyszczony antygen EIAV, który początkowo pozyskiwano ze śledziony zakażonych koni, a obecnie jest otrzymywany z zakażonych hodowli komórkowych. Antygen i przeciwciała dyfundują w głąb żelu i migrują w kierunku od jednej studzienki do drugiej, co prowadzi do powstania charakterystycznych łuków precypitacyjnych. Zastosowanie wysoce oczyszczonego antygenu EIAV prawie całkowicie eliminuje występowanie nieswoistych łuków precypitacyjnych, które mogą fałszować wyniki. W przypadku wysoce dodatnich surowic łuki precypitacyjne widoczne są jako linie ciągle między surowicą kontrolną a antygenem, zaś nisko dodatnie surowice tworzą łuki zakrzywione, biegnące od surowicy kontrolnej w kierunku studzienki z antygenem. Wynik negatywny, czyli brak występowania łuków precypitacyjnych, dotyczy surowic bez swoistych przeciwciał przeciwko EIAV (13, 14).

Pomimo że test Cogginsa pozwala na wykrycie obecności swoistych przeciwciał w 10 do 30 dni od zakażenia EIAV, występują pewne ograniczenia mogące doprowadzić do uzyskania fałszywego wyniku. Ma to miejsce w przypadku koni, które miały kontakt z EIAV po raz pierwszy i u których nie rozwinęła się jeszcze pierwotna

odpowieź immunologiczna. Taki osobnik jest nosicielem wirusa, jednakże w teście Cogginsa nie stwierdza się obecności swoistych przeciwciał (13). Otrzymany wynik może być uznany za fałszywie ujemny, w związku z tym należy powtórzyć badanie po 10–14 dniach w celu jego potwierdzenia. Innym przypadkiem są źrebięta, u których dodatni wynik testu Cogginsa pojawia się wówczas, gdy wraz z siarą otrzymały od matki przeciwciała przeciwko EIAV. Znaczna większość źrebiąt klaczy AGID dodatnich serologicznie nie jest zakażona wirusem, zatem zła interpretacja prowadzi do uzyskania wyniku fałszywie dodatniego. W takiej sytuacji należy powtórzyć badanie po 6–8 miesiącach lub zastosować inną technikę wykrywania zakażenia EIAV (13, 14).

Kolejnym testem serologicznym, stosowanym rutynowo w diagnostyce niedokrwistości zakaźnej koni, jest kompetycyjny test immunoenzymatyczny (c-ELISA),

9. Rasty S., Dhruva B.R., R. Schiltz L., Shih D.S., Issel C.J., Montelaro R.C.: Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine infectious anemia virus during persistent and cytopathic infections. *J. Virol.* 1990, **64**, 86-95.
10. Haase A.T.: Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 1986, **322**, 130-136.
11. Metcalf E.S.: The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, **68**, 229-237.
12. Issel C.J., Foil L.D.: Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984, **184**, 293-297.
13. Issel C.J., Cook R.F.: A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, **5**, 137-141.
14. Coggins L., Norcross N.L., Nusbaum S.R.: Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet.* 1972, **33**, 11-18.
15. Shane B.S., Issel C.J., Montelaro R.C.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1984, **19**, 351-355.
16. Pearson J.E., Gipson C.A.: Standardization of equine infectious anemia immunodiffusion and CELISA tests and their application to control of the disease in the United States. *Equine Vet. Sci.* 1988, **8**, 60-61.
17. Rossmanith W., Horvath E.: A western blot test for the serological diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Med.* 1989, **36**, 49-56.
18. Langemeier J.L., Cook S.J., Cook R.F., Rushlow K.E., Montelaro R.C., Issel C.J.: Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **343**, 1481-1487.
19. Quinlivan M., Cook R.F., Cullinane A.: Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet. Rec.* 2007, **160**, 611-618.
20. Issel C.J., Horohov D.W., Lea D.F., Adams W.V.J., Hagius S.D., McManus J.M., Allison A.C., Montelaro R.C.: Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus, *J. Virol.* 1992, **66**, 3398-3408.
21. Meng Q., Lin Y., Ma J., Ma Y., Zhao L., Li S., Liang H., Zhou J., Shen R., Zhang X., Shao Y.: A pilot study on an attenuated Chinese EIAV vaccine inducing broadly neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* 2011, **156**, 1455-1462.
22. Li F., Craig J.K., Howe L., Steckbeck J.D., Cook S., Issel C., Montelaro R.C.: A live attenuated equine infectious anemia virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *J. Virol.* 2003, **77**, 7244-7253.

Mgr biol. Anna Golke, Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa