

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

ПАТОГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ЗАРАЗЯВАНЕ НА ЯРЕТА С БЪЛГАРСКИ ИЗОЛАТИ НА КОЗИ ХЕРПЕС ВИРУС 1

ИВО СИРАКОВ, ЙОСКО ПЕТКОВ, ПЕНКО ЗУНЕВ*,
РАЙКО ПЕШЕВ, ЛИЛИЯ ПЪРВАНОВА

Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт - София

*Институт по планинско животновъдство и земеделие - Троян

Заболяване, причинено от кози херпес вирус 1 (КХВ 1) е описано през 1974 г. от **Saito et al.** Авторите изолират причинителя и доказват, че се касае за херпес вирус. По-късно подобно заболяване е описано в Швейцария (**Mettler F., M. Engels, P. Wild, A. Bivetti.** 1979., **Plebani, G.F., M. Engels, A. E. Metzler, & R. Wyler.** 1983.), Нова Зеландия (**Horner G. W., R. Hunter, A. M. Day,** 1982), Австралия (**Tisdall D. J., C.B. Bentley, D. M. Collins, G. W. Horner,** 1984), Канада (**Chenier, S., Cl. Montpetit, P. Helie,** 2004), Гърция (**Koptopoulos G., M. Papanastasopoulou, O. Papadopoulos, H. Ludwig,** 1988) и редица средиземноморски страни (**Kao, M., et al.,** 1985). В България заболяването е доказано серологично през 2001 г. от Пешев и Бостанджиева, а първи изолати са получени през 2008 г. (**Пешев Р., И. Сираков, М. Миланов, М. Александров,** 2008).

В зависимост от възрастта на инфектираните животни заболяването протича като ентерит и остро генерализирано заболяване, завършващо най-често със смърт при млади 10-14 дневни ярета (**Saito et al.,** 1974, **Van der Lugt J J., J L. Randles,** 1993). При възрастните може да протече субклинично или със слаби клинични признаци (**Buonavoglia, G., M. et al.,** 1996), засягайки гениталния апарат при кози и пръчове, предизвиквайки аборти (**Chenier, S., Cl. Montpetit, P. Helie,** 2004, **Williams et al.,** 1997) вулвовагинити, баланопостити и

пенопостити, а също така и респираторни симптоми (**Grewal AS, R. Wells,** 1986, **Horner G. W., R. Hunter, A.M. Day,** 1982, **Tarigan S., R. F. Webb, D. Kirkland,** 1987, **Tarigan S., P. Ladds, R.A. Foster,** 1990, **Uzal FA, et al.,** 2004).

Целите на настоящото изследване бяха да се възпроизведе заболяването с български щамове на КХВ 1 върху ярета, да се проследят някои аспекти в патогенезата и да се установи наличието на съпътстващи бактериални инфекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментални животни и щамове на КХВ 1

Заразахме интравенозно и интраназално 4 броя ярета на възраст 3-10 дни и 2 броя ярета на възраст 30 дни с КХВ 1. Използвахме щамове на КХВ 1 - Троян, Сухиндол, Кюстендил и Павел баня, намножени на клетъчна линия МДБК с титри (Кюстендил - $10^{-5.0}$, Павел баня и Сухиндол - $10^{-5.66}$, Троян $10^{-4.5}$ тъканно културални инекциозни дози 50/ml (ТКИД 50/ml).

Хематология и чернодробни ензими

На четири от шестте опитни животни (I, II, III, IV) и едно контролно яре извършихме биохимични и хематологични изследвания.

Биохимично в кръвен серум определяхме активността на ензимите аспартат аминок-

трансфераза (ASAT) и аланин аминотрансфераза (ALAT) на 4^{-тия} и 8^{-мия} ден след заразяването. Анализите извършихме спектрофотометрично чрез готови тестове на Audit Diagnostics.

На 4^{-тия} ден след заразяването изследвахме хематологично стабилизирана с EDTA кръв за пълна кръвна картина (ПКК) чрез автоматичен хематологичен анализатор MS4 Vet.

Среди и разтвори

Като растежни за клетъчните култури използвахме MEM-Eagle, MEM - Hanks с добавка на антибиотици (пеницилин 100 ME/ml, стрептомицин 100 mg/ml) 0.2M L-глутамин, аминокиселини, 0.075% натриев бикарбонат и 10% фетален телешки серум (ФТС). Като поддържащи използвахме същите среди и добавки, но с намалено количество на ФТС - 2%.

Вирius изолация върху клетъчни култури

За изолране на вируса използвахме клетъчна култура МДБК, след промиване на монослоя със стерилен физиологичен разтвор, добавяхме 200 µl от пробата, като за ректални тампони и фекалии инкубирахме на 37°C, 1 h, а за всички останали проби - 2 h.

Вирiusнеутрализираща реакция

МВНР извършихме по метод, описан от **Диловски и съавт.** (1982) с модификация. Серумите разреждахме двукратно с хранителна среда, след което добавяхме 100 ТКИД 50/ml от кози херпес вирус щам "Е/СН" с титър 10^{-7.5} ТКИД50/ml. Смесите серум-вирус инкубирахме на 37°C за 2 h. След това добавяхме индикаторната система-постоянни клетъчни култури МДБК в количество 4x10⁴ клетки/ml. Към МВНР поставяхме контроли на вируса и на клетъчната култура. Като титър на антителата приемахме най-високото разреждане на серума, даващо пълно потискане на размножаването на индикаторния

Микробиологични изследвания

За целите на микробиологичното изследване на 36 броя проби от вътрешни органи (бял дроб, черен дроб, далак, бъбрек, тънко черво и медиастинал лимфен възел) от 6 ярета, извършихме култивиране върху течни

(месопептонен бульон и тароци бульон) и твърди хранителни среди (кръвен агар, фенолрот агар), при 37°C за 24-48 h, следяхме за развитие на условно патогенни аеробни, факултативно анаеробни и облигатно анаеробни микроорганизми. Причинителите диференцирахме морфологично чрез микроскоп Zeiss.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Преди заразяване на яретата с КХВ 1 ги изследвахме чрез МВНР за наличие на серумни антитела (табл. 1).

След заразяването, положителните за КХВ 1 ярета (II и III) бяха с намалени титри на серумните антитела, а при ярета I и IV се установиха такива.

На третия ден след заразяването наблюдавахме повишаване на ректалната температура до 40 - 41°C с продължителност 2 дни за ярета II, III, V и VI, и 6 дни за ярета I и IV. Клиничната картина, която наблюдавахме, беше подобна на описаната от други автори (**Berrios P.E., Mc Kercher D.G., Knight H.D., 1975, Papanastopoulos, M. et al., 1991**) при експериментално заразяване на ярета, характеризираща се с угнетеност, носни и очни изтечения и диария. За разлика от **Berrios et al., 1975**, които наблюдават билатерални очни изтечения, ние наблюдавахме и едностранни такива.

Резултатите от извършените в нашия експеримент биохимични (ASAT и ALAT) и хематологични изследвания (ПКК) в кръвни проби от проследените контроли и опитни животни, са отразени на фиг. 1 и 2.

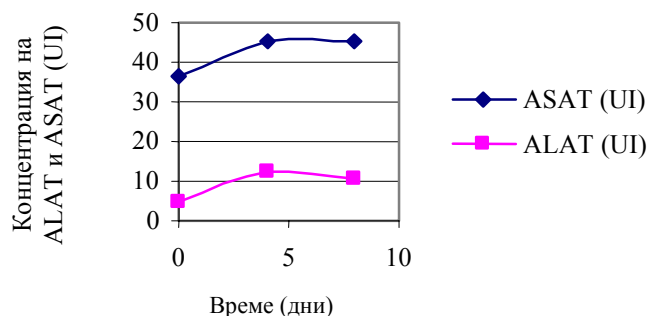
Получените резултати, отразяващи промените в активността на трансаминазните ензими ASAT и ALAT, не показват силен патологичен ефект върху организма при изпитваните от нас три херпес вирусни щама.

На 4^{-тия} ден след заразяването при четирите изследвани опитни ярета (I - IV) се установи повишена активност и при двата проследени ензима. Степента на повишение при ензима ASAT спрямо контролното яре (36.74) е най-

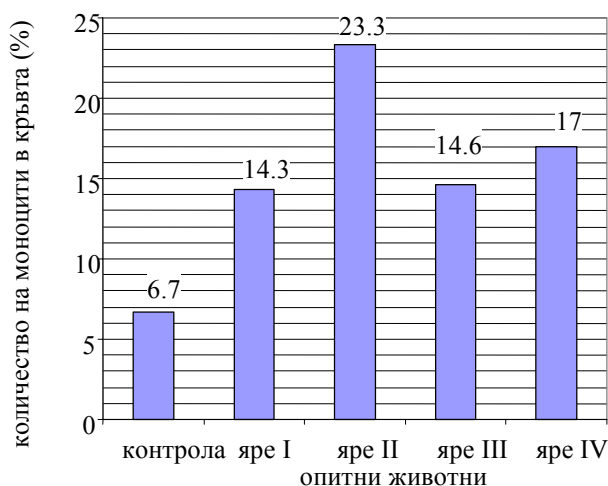
Таблица 1. Начин на инокулиране на различни щамове на КХВ 1 и титри на специфичните антитела преди и след заразяване

| Изследвано животно | Начин на заразяване | Използван щам на КХВ-1 | Титри в МВНР | |
|--------------------|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| | | | 0 ден | 7-ми ден |
| Яре I | Интра венозно | Троян | - | 3 log ₂ |
| Яре II | Интра назално | Сухиндол+ К | 8 log ₂ | 4 log ₂ |
| Яре III | Интра венозно | Кюстендил (К) | 8 log ₂ | 3 log ₂ |
| Яре IV | Интра назално | Сухиндол | - | 1 log ₂ |
| Яре V | Интра назално | Павел баня | - | - |
| Яре VI | Интра назално | Сухиндол | - | - |

Стойности на ALAT и ASAT в кръвта на ярета I - IV



Фиг. 1. Количество на чернодробните трансаминази (ALAT и ASAT) в кръвта на експериментални ярета I, II, III и IV



Фиг. 2. Количество (%) на моноцитите в кръвта на заразените с КХВ 1 ярета

добре изразено при ярета III и IV (съответно 48.21 и 47.80 UI) - заразени съответно интра венозно с щам Кюстендил и интра назално с щам Су-

хиндол, в сравнение с I и II (44.38 и 42.50 UI), като повишената активност се запазва до 8-мия ден след заразяването (фиг. 1).

При всички изследвани опитни ярета активността на ензима ALAT е с повишени стойности както на 4-тия, така също и на 8-мия ден от заразяването в сравнение със стойностите при контролното яре (4.48 UI) и варират от 7.79-13.39 UI (фиг. 1). Промените в активността на трансаминазните ензими вероятно е умерена реакция на организма при изграждане на имуен отговор след заразяване с вирусните щамове.

При хематологичните изследвания най-отчетлива е установената моноцитоза при диференцирането на левкоцитите. При горна референтна граница за моноцити при ярета 4% без проявена левкоцитоза и при четирите изследвани опитни ярета установихме дву- и трикратно повишени стойности на моноцитите спрямо контролното яре. Този ефект може да се приеме като положителна защитна реакция на организма, при която освен доказаното повишение на телесната температура, в периферната кръв се увеличава броят на макрофагеалните левкоцити, каквито са моноцитите (Ангелов и съавт., 1999).

При реизолация на вируса от носни и ректални тампони установихме наличие на КХВ 1 в четирите ярета (I, II, IV и V) между 3 - и 9-ия ден след заразяването. След като ефтанализирахме яре I и IV на 9-ия и 10-ия ден след заразяването установихме наличие на

Таблица 2. Резултати от реизолация на вирус върху клетъчни култури на различни вътрешни органи от заразени ярета с изолати на КХВ 1

| Изследван орган | Номер на изследваното яре | | | | | |
|----------------------|---------------------------|------|-----|------|---|----|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| Бял дроб | - | - | - | + | - | - |
| Черен дроб | - | - | - | + | - | - |
| Слезка | - | - | - | + | - | - |
| Носна лигавица | + | - | - | + | - | - |
| Хранопровод | - | - | - | + | - | - |
| Предстомашие | - | - | - | + | - | - |
| Мез. лимфен възел | - | - | - | + | - | - |
| Тънко и дебело черво | - | н.и. | - | н.и. | - | - |

КХВ 1 при изолация върху клетъчни култури в носната лигавица на яре I, и от всички изследвани вътрешни органи при яре IV. При останалите ярета, умрели в рамките на 2-4 месеца, не успяхме да изолираме КХВ 1 (табл. 2).

Вероятно това се дължи на образуването на неутрализиращи антитела, които елиминират вируса от вътрешните органи (Berrios P.E., Mc Kercher D.G., Knight H.D., 1975, Papanastasiopoulou, M. et al., 1991, Waldvogel, A. et al., 1981).

Наблюдаваната клинична картина, развитието на треска и изолирането на КХВ 1 от носни и ректални тампони след интравенозно заразяване на яре I показва развитие на вирусемия с генерализиране на инфекцията (Berrios P.E., Mc Kercher D.G., Knight H.D., 1975). Въпреки ранната смърт на животното (на 10^{-тия} ден след заразяването) не успяхме да изолираме вируса от вътрешните му органи (табл. 2).

При бактериологичното изследване на вътрешни органи от евтаназираните ярета (I и IV) и яре III от спонтанно умрелите, изолирахме от белите дробове единични колонии - *Pasteurella multocida*, което се различава от изследванията на Buddle et al., (1990), които изолират *P. haemolytica* при смесена респираторна инфекция с кози херпес вирус. В пробите от тънки черва от ярета II и III изолирахме

Escherichia coli. При останалите аутопсирани животни пробите бяха отрицателни за наличие на патогенни микроорганизми.

При микробиологичното изследване на 36 вътрешни органа от общо 6 броя (две от евтаназираните и 4 от умрели) ярета, изолирането на описаните видове условнопатогенни бактерии - *E. coli* от тънките черва на ярета II и III и единични колонии на *P. multocida* от белите дробове на ярета I, III и IV не ни дава основание да смятаме посочените микроорганизми като причина за смъртта. Известно е, че условно патогенната бактерия *P. multocida*, обитаваща нормално лигавицата на фарингса и горните дихателни пътища на здравите кози, се развива при състояния на имunosупресия на макроорганизма и може да предизвика развитие на пневмонични огнища в белия дроб в комбинация и с други причинители (Berge A. C., W. M. Sischo & A. L. Craigmill., 2006, Merck & Company, 2006, Oros, J., A. Fernandez, J. L. Rodriguez, J.B. Poveda, 1997).

Изолирането на *E. coli* от тънките черва на ярета II и III отдаваме вероятно на развитата се дисбактериоза, но без да има основание за поставяне на диагноза Колибактериоза.

ИЗВОДИ

Реизолацията на КХВ 1 при различен начин на инокулация на ярета доказва, че използ-

ваните шамове са кози херпесвирусни изолати.

Промените в клиничната и хематологична картина на инокулираните ярета доказва патогенността на използваните български шамове на КХВ 1.

При нашите изследвания не установихме наличието на съпътстващи бактериални инфекции при заразяване на ярета с КХВ 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангелов, Г., Н. Ибришимов, Ст. Милашки, 1999. Клинично-лабораторни изследвания във ветеринарната медицина, София.
2. Диловски, М., Х. Хараламбиев, П. Текерлеков, Г. Герганов, 1982. Диагностика на вирусните болести по домашните животни. Земиздат, София.
3. Пешев, Р. и Р. Бостанджиева, 2001. Проучвания върху културалните особености на козия херпесвирус, *Вет. Мед.* 7, № 1 - 2.
4. Пешев, Р., И. Сираков, М. Миланов, М. Александров. 2008. Изолация и идентификация на козия херпесвирус в България, *Вет. Мед.* XII, № 3 - 4.
5. Berge, A. C., W. M. Sischo & A. L. Craigmill, 2006. Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory tract pathogens from sheep and goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(8), 1279 - 1281.
6. Berrios, P. E., Mc Kercher D. G., Knight H. D., 1975. Pathogenicity of a caprine herpes virus, *American Journal of Veterinary Research* 36, 1763 - 1769.
7. Buonavoglia, G., M. Tempesta, A. Cavalli, V. Voigt, D. Buonavoglia, A. Conserva & M. Corrente, 1996. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 19, 257 - 281.
8. Buddle, B., A. Pfeffer, D. Cole, H. Pulford, M. Ralston, 1990. A caprine pneumonia outbreak associated with caprine herpesvirus and *Pasteurella haemolytica* respiratory infections. *New Zealand Veterinary Journal*, 38, 28 - 31.
9. Chenier, S., Cl. Montpetit, P. Helie, 2004. Caprine herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec. *Can Vet J*, 45: 241 - 243.
10. Grewal, AS, R. Wells, 1986. Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. *Austral Vet J* 63:79 - 82.
11. Horner, G. W., R. Hunter, A. M. Day, 1982. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpes virus, *New Zealand Veterinary Journal*, 30, 150 - 152.
12. Kao, M., T. Leiskau, G. Koptopoulos, O. Papadopoulos, G. W. Horner, B. Hyllseth, M. Fadel, A. H. Gedi, O. C. Straub, & H. Ludwig, 1985. Goat herpesvirus infections: a survey on specific antibodies in different countries. In *Immunity to Herpesvirus Infections of Domestic Animals*. Report EUR 9737 EN. Eds P-P. Pastorel, E. Thiry, J. Sapliki. Luxemburg, Commission of the European Communities. Agriculture. pp 93 - 97.
13. Koptopoulos, G., M. Papanastasopoulou, O. Papadopoulos, H. Ludwig, 1988. The epizootiology of caprine herpesvirus (BHV-6) infections in goat populations in Greece, 199 - 205.
14. Merck & Company, 2006. Pasteurellosis of Sheep and Goats. Introduction: Merck Manual. Whitehouse Station, NJ: Merck & Company.
15. Mettler, F., M. Engels, P. Wild, A. Bivetti, 1979. Herpesvirus infection bei Zicklein in der Schweiz, *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 121, 655 - 662.
16. Oros, J., A. Fernandez, J. L. Rodriguez, J. B. Poveda, 1997. Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. *Zentralblatt für Veterinarmedizin. Reihe, Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 44 (2), 99 - 104.
17. Papanastasopoulou, M., G. Koptopoulos, S. Lekkas, O. Papadopoulos, H. Ludwig, 1991. An experimental study on the pathogenicity of the caprine herpesvirus type 1 (CHV-1), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 14, № 1, pp. 47 - 53.
18. Plebani, G. F., M. Engels, A. E. Metzler, & R. Wyler, 1983. Caprines Herpesvirus in der Schweiz: Verbreitung, Häufigkeit und Latenz der Infektion. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* (in pres).

19. **Saito J. K., D. H. Gribble, P. E. Berrios, H. D. Knight, D. G. Mc Kercher**, 1974. A new herpes virus isolate from goats: preliminary report, *American Journal of Veterinary Research*, 35, 847 - 848.
20. **Tarigan, S., R. F. Webb, D. Kirkland**, 1987. Caprine herpesvirus from balanopostitis, *Australian Veterinary Journal*, 64, 321.
21. **Tarigan, S., P. Ladds, R. A. Foster**, 1990. Genital pathology of feral male goats *Australian Veterinary Journal*, 67, 286 - 290.
22. **Tisdall, D.J., C.B. Bentley, D.M. Collins, G.W. Horner**, 1984. New Zealand caprine herpes virus: comparison with an Australian isolate and with bovine herpes virus type 1 by restriction endonuclease analysis, *New Zealand Veterinary Journal*, 32, 99 - 100.
23. **Uzal, FA, L. Woods, M. Stillian, R. Nordhausen, D.H. Read, Van Kampel, J. Odani, S. Hietala, E.J. Hurley, M.L. Vickers, S.M. Gard**, 2004. Abortion and ulcerative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goat in California., *J Vet Diagn Invest. Sep*; 16(5): 478 - 84.
24. **Van der Lugt J., L. Randles**, 1993. Systemic herpesvirus infection in neonatal goats. *Journal of the South African Veterinary Association*; 64(4): 169 - 71.
25. **Waldvogel, A., M. Engels, P. Wild, H. Stunzi and R. Wyler**, 1981. Caprine herpesvirus infection in Switzerland: some aspects of its pathogenicity. *Zbl. Vet. Med. (B)* 28, 612 - 623.
26. **Williams, N. M., M. L. Vickers, R. R. Tramontin, M.B. Petrites-Murphy, G.P. Allen**, 1997. Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in a goat herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211, 89 - 91.

PATHOGENETICAL ASPECTS IN EXPERIMENTALLY INFECTED KIDS WITH BULGARIAN CAPRINE HERPES VIRUS 1 ISOLATES

I. Sirakov, Y. Petkov, P. Zunev, R. Peshev, L. Parvanova*
National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute - Sofia
**Institute of Upland Stockbreeding and Agriculture - Trojan*

SUMMARY

Experimental intranasal and intravenous infection in six 3-30 days old kids with Bulgarian isolates of goat herpes virus 1, were performed. Two infected kids were eutanized on 14 and 16 days after the virus inoculation, while the others died from 1 to 6 months post inoculation. Eyes, nose, vaginal and rectal tampons samples from infected kids were collected during the period of examination. Virus was reisolated successfully in cell cultures (Madin Darby Bovine Kidney - MDBK) and Embryonal bovine trachea (EBTR) from nose and rectal tampons.

The disease was developed as local or generalized infection, characterised by stupor, febris, unilateral and bilateral nasal and ocular discharges, diarrhoea, blood monocytosis and high activities of transaminases enzymes (ASAT, ALAT).

Thirty six samples obtained from internal organs were examined by viral (virus isolation in cell cultures) and microbiological (cultural and microscopic) methods.

The virus is reisolated from nose mucosa and internal organs of kids, while the result from bacterial specific diseases is negative.