

## EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 ABORTUS, NEONATALE STERFTE EN ZENUWSTOORNISSEN GEDIAGNOSTICEERD IN BELGIË IN 1999

Equine herpesvirus type 1 abortion, neonatal foal death and nervous system disorders diagnosed in Belgium in 1999

K.M. van der Meulen, H.J. Nauwynck, M.B. Pensaert

Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

### SAMENVATTING

Een beschrijving wordt gegeven van de diagnostiek van abortus, neonatale sterfte en zenuwstoornissen ten gevolge van het equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in 1999, uitgevoerd in het Laboratorium voor Virologie van de Faculteit Diergeneeskunde te Merelbeke. Achtentwintig gevallen waren afkomstig uit Vlaanderen, 2 uit Wallonië en 1 uit Nederland. Het ging om 22 abortussen, 4 gevallen van neonatale sterfte en 5 gevallen van zenuwstoornissen. De diagnose werd gesteld door middel van virusisotatie. In 29% van de beschreven gevallen was het paard gevaccineerd tegen EHV-1.

### ABSTRACT

A description is made of the diagnosis of cases of abortion, neonatal foal death and nervous system disorders caused by equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in 1999, carried out in the Laboratory of Virology at the Faculty of Veterinary Medicine in Merelbeke, Belgium. Twenty-eight cases originated from Flanders, two from Wallonia and one from the Netherlands. There were 22 abortions, four neonatal foal deaths and five cases of nervous system disorders. The diagnosis was made by means of virus isolation. Twenty-nine percent of the horses involved had been vaccinated against EHV-1.

**Keywords:** equine herpesvirus type 1 - diagnosis - Belgium

### INLEIDING

Het equine herpesvirus type 1 (EHV-1) behoort tot de *Alfaherpesvirussen* en is een belangrijk pathogeen voor paarden. Het is verantwoordelijk voor het optreden van abortus, neonatale sterfte, zenuwstoornissen en eventueel acute respiratoire stoornissen (Allen en Bryans, 1986; Bryans en Allen, 1989). EHV-1 komt enzoëtisch voor in de paardenpopulatie en veroorzaakt wereldwijd economische verliezen voor de paardenhouderij. Tot op heden is er nog geen vaccin ontwikkeld waarmee abortus, neonatale sterfte of zenuwstoornissen ten gevolge van EHV-1 met zekerheid voorkomen kunnen worden (Bryans en Allen, 1982; Burrows *et al.*, 1984; Frymus *et al.*, 1986; Kohn en Fenner, 1987; Bürki *et al.*, 1990). Dit vormt een belangrijk probleem in de preventie van de aandoening.

Deze casuïstiek beschrijft de diagnoses van abortus, neonatale sterfte en zenuwstoornissen ten gevolge van EHV-1, gesteld in het Laboratorium voor Virologie van de Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke, in de periode van januari tot en met december 1999. Tevens

wordt een korte anamnese van de verschillende gevallen gegeven.

### MATERIAAL EN METHODEN

#### Stalen

In de periode van januari tot en met december 1999 werden in totaal 65 stalen verstuurd naar het Laboratorium voor Virologie voor onderzoek naar het EHV-1. Het ging om 2 gevallen van respiratoire stoornissen (neusswab), 32 gevallen van abortus (foetale long, thymus, milt en/of lever), 16 gevallen van neonatale of perinatale sterfte (long, thymus, milt en/of lever) en 15 gevallen van zenuwstoornissen (ongestold bloedstaal op heparine of EDTA).

#### Virusisotatie

Voor isotatie van EHV-1 uit geaborteerde foeti en gestorven veulens werd een 20%-ige suspensie van longweefsel gemaakt in fosfaat gebufferde zoutoplossing. Na centrifugeren van de suspensie werd het su-

pernatans aangebracht op een monolaag van konijnnieren (RK13-cellen) en gedurende 1 uur bij 37°C geplaatst. De monolaag werd vervolgens gewassen, waarna vers medium werd toegevoegd (MEM aangevuld met 5% foetaal kalfserum (FKS), 100 IE/ml penicilline, 0,1 mg/ml streptomycine, 0,1 mg/ml kanamycine en 0,1 mg/ml glutamine).

Voor virusisolatie uit de ongestolde bloedstalen van paarden met zenuwstoornissen werden perifere bloedmononucleaire cellen (PBMC) afgezonderd uit een vers, ongestold bloedstaal met behulp van dichtheitscentrifugatie op Ficoll Paque. De PBMC werden vervolgens geresuspendeerd in medium (gelijke delen MEM en RPMI aangevuld met 10% FKS, 100 IE/ml penicilline, 0,1 mg/ml streptomycine, 0,1 mg/ml kanamycine, 0,1 mg/ml glutamine, 1% niet essentiële aminozuren 100x en 1 mM natrium pyruvaat) en aangebracht op een monolaag van RK13-cellen.

Alle monolagen werden tenslotte in een broedstroof geplaatst bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub> en dagelijks gecontroleerd op het verschijnen van cytopathogeen effect.

### Immunofluorescentie van EHV-1 bevestigde gevallen

Tien stalen van foetaal of neonataal longweefsel, waarvan de etiologische diagnose van een EHV-1 infectie reeds was gesteld door virusisolatie, werden onderzocht met behulp van immunofluorescentie. Daartoe werden vriescoupes gefixeerd in aceton bij -20°C gedurende 20 minuten en gekleurd volgens een indirecte immunofluorescentie techniek. Primair werden daartoe proteïne G-opgezuiverde en gebiotinyleerde paardenantistoffen gericht tegen EHV-1 gebruikt en secundair streptavidine gemerkt met fluoresceïne isothiocyanaat. De preparaten werden geanalyseerd met een fluorescentiemicroscop (DM RBE, Wetzlar, Duitsland).

### Pathologie van EHV-1 bevestigde gevallen

Achttien van de 26 geaborteerde foeti en gestorven veulens, evenals 1 paard met zenuwstoornissen, werden onderworpen aan autopsie bij de afdeling Pathologie van de Huisdieren van de Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke. Histologische coupes van diverse inwendige organen (lever, milt, thymus, long en/of zenuwstelsel) werden onderzocht.

## RESULTATEN

### Anamnese en virologische bevindingen bij EHV-1 positieve gevallen

Een infectie met EHV-1 werd bevestigd bij 22 abortussen en 4 gevallen van neonatale sterfte op een totaal van 22 bedrijven, evenals bij 5 paarden met zenuwstoornissen op 4 bedrijven. De verdeling van deze gevallen in de tijd wordt weergegeven in Figuur 1. In het Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie te Ukkel werd in 1999 één abortus ten gevolge van EHV-1 gediagnosticeerd, afkomstig uit Wallonië (B. Caij, persoonlijke mededeling, 1999). Dit geval wordt hier echter niet nader besproken.

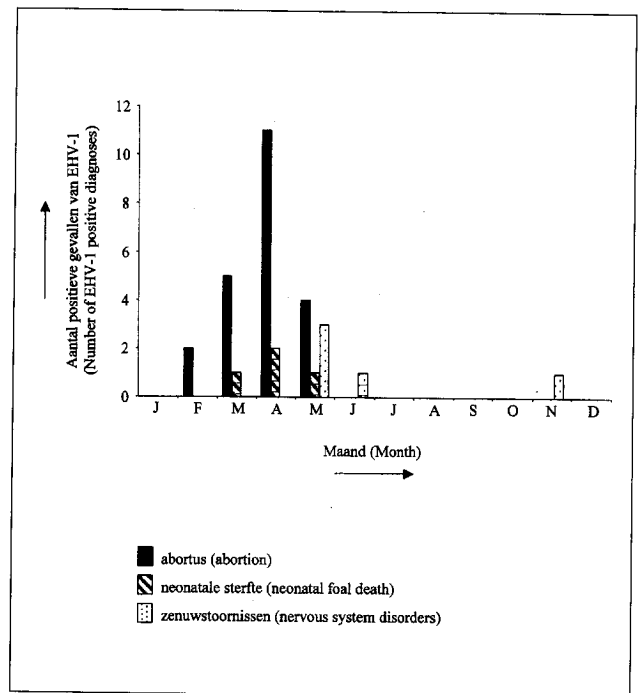


Fig. 1. Verdeling van de EHV-1 positieve diagnoses in het jaar 1999.

*Distribution of EHV-1 positive diagnoses in the year 1999.*

EHV-1 abortus en neonatale sterfte kwamen voor bij zowel paarden als pony's, één geval werd gediagnosticeerd bij een ezel. De symptomen traden op onafhankelijk van de leeftijd van de merries. Op de meeste bedrijven was er contact tussen verschillende leeftijdsgroepen van paarden en/of was er regelmatig in/uitgaande beweging van paarden op het bedrijf. Slechts op 1 bedrijf was er een volledig aparte stalling van de drachtige merries. Vijf van de 26 merries die aborteerden (19%), waren gevaccineerd tegen EHV-1. De vaccinatie werd halfjaarlijks toegediend en daaronder werden deze merries gevaccineerd in de 5de, 7de en 9de maand van de dracht.

Abortus trad op in de 9de maand van de dracht bij 6 van de 22 merries, in de 10de maand bij eveneens 6 merries en in de 11de maand bij 10 merries. De 4 veulens die à terme geboren werden, waren zwak vanaf de geboorte. Drie veulens stierven binnen 24 uur na de geboorte. Eén veulen stierf na 3 dagen ten gevolge van een ernstige dyspnee. Zenuwstoornissen ten gevolge van een EHV-1 infectie werden bevestigd op 4 bedrijven. Op 3 bedrijven was er contact tussen verschillende leeftijdsgroepen en/of regelmatig in/uitgaande beweging van paarden. Op deze bedrijven werd een halfjaarlijkse vaccinatie van alle paarden tegen EHV-1 uitgevoerd en op 2 van de bedrijven werden daarenboven de aanwezige, drachtige merries gevaccineerd in de 5de, 7de en 9de maand van de dracht. Op het eerste bedrijf trad in het begin van 1999 een abortus op, maar het materiaal werd niet nader onderzocht op EHV-1. In mei vertoonden vervolgens talrijke paarden koorts en verminderde eetlust. Vijf paarden ontwikkelden zenuwstoornissen gaande van een milde ataxie, hyperaesthesie en tremor tot een volledige pa-

ralyse. Drie mild aangetaste paarden herstelden binnen 3 dagen, terwijl 2 ernstig aangetaste paarden pas na meerdere maanden volledig hersteld waren. Eveneens in mei vertoonden op het tweede bedrijf 3 paarden koorts en lusteloosheid, een week later gevolgd door een milde ataxie. Bij 2 paarden verergerden de symptomen tot een volledige paralyse en uiteindelijke sterfte. Op het derde bedrijf deden de symptomen zich voor bij één paard, in de laatste week van november. Het paard was aanvankelijk stijf gedurende 3 dagen. Daarna verergerden de symptomen tot een ernstige ataxie en blaasparalyse, gevolgd door sterfte. Op het vierde bedrijf, waar niet gevaccineerd werd tegen EHV-1, deed zich in juni een geval van zenuwstoornissen voor bij een merrie die weinig tot geen contact had met andere paarden. Ze vertoonde een volledige paralyse en stierf kort na het ontstaan van de symptomen.

### Pathologische bevindingen

Van de 18 in utero geïnfecteerde foeti (14 geaborteerde foeti en 4 gevallen van neonatale sterfte) die aan een pathologisch onderzoek onderworpen werden, vertoonde 44% macroscopisch en 78% microscopisch aantoonbare necrosehaardjes op de lever, de long, de thymus en/of de milt. Virale inclusielichaampjes waren aanwezig bij 4 van de 18 gevallen (22%) in de lever, de long, de thymus en/of de milt. De overige letsels waren niet specifiek voor een EHV-1 infectie. Bij één geval van neonatale sterfte was er sprake van een uitgebreide *Streptococcus zoëpidemicus* infectie.

Bij het ene paard gestorven ten gevolge van zenuwstoornissen en pathologisch onderzocht, was er vasculitis ter hoogte van de hersenstam, het ruggenmerg en de lever aanwezig, evenals een nefritis.

### DISCUSSIE

In 1999 werd de diagnose van een EHV-1 infectie 31 maal bevestigd op een totaal van 26 bedrijven. Het ging om gevallen van abortus, neonatale sterfte en zenuwstoornissen. Ook EHV-4 wordt sporadisch in verband gebracht met deze klinische symptomen. EHV-4 vermeerderd echter niet in RK13-cellen, het door ons gebruikte celtipe voor virusisolatie, zodat we kunnen besluiten dat de hier besproken gevallen veroorzaakt werden door EHV-1 (Crabb en Studdert, 1996). Het aantal bevestigde gevallen in 1999 was duidelijk groter dan in de voorgaande jaren. Van 1991 tot en met 1998 werden respectievelijk 11, 0, 3, 3, 4, 2, 7 en 2 diagnosen gesteld. Het grotere aantal positieve diagnosen wordt vermoedelijk veroorzaakt door een beter uitgewerkte diagnosesstelling op het laboratorium, eerder dan door een groter aantal klinische gevallen in dit jaar.

Op de meeste bedrijven werden ofwel abortus/neonatale sterfte, ofwel zenuwstoornissen gezien. Het aantal klinisch aangetaste dieren varieerde per bedrijf. Van de 22 bedrijven waar abortus of neonatale sterfte optraden, waren er 13 met slechts 1 geval van abortus of neonatale sterfte, 4 met 2 gevallen en 5 met 3 tot 6 gevallen. Op de 4 bedrijven waar zich zenuwstoornissen voordeden, waren respectievelijk 5, 3, 1 en 1 paard(en)

aangetast. Op één van deze bedrijven was er een voorgeschiedenis van abortus, maar de betreffende foetus werd niet onderzocht op EHV-1.

Voor alle aangeboden stalen werd virusisolatie gebruikt om de diagnose van een EHV-1 infectie te stellen. Van de 10 infectieve longweefselstalen van geaborteerde foeti en gevallen van neonatale sterfte die eveneens onderzocht werden met een immunofluorescentiekleuring, waren er 9 positief. Er was dus een goede correlatie tussen beide technieken. Immunofluorescentiekleuring kan een bevestiging opleveren binnen 1 dag, terwijl virusisolatie in geval van abortus/neonatale sterfte minimaal 2 tot 3 dagen duurt. Ook histopathologisch onderzoek kan reeds een belangrijke diagnostische bijdrage leveren. Zo konden bij 14 van de 18 onderzochte gevallen (78%) necrosehaardjes in de lever, de long, de thymus en/of de milt teruggevonden worden. Dit is een typisch letsel voor een herpesvirus infectie. Ondanks het feit dat zowel met immunofluorescentie als met histopathologie de diagnose binnen 2 dagen gesteld kan worden, zou bij respectievelijk 10% en 22% van de stalen de diagnose met deze methoden niet gesteld worden. Voor dergelijke stalen dient alsnog virusisolatie uitgevoerd te worden. Aangeraden wordt om sanitaire maatregelen te nemen die passen bij een EHV-1 infectie, zolang de etiologische diagnose niet definitief bevestigd is (Buddaert *et al.*, 1998).

In geval van zenuwstoornissen leverde virusisolatie een diagnose na 5 tot 7 dagen. Ante mortem zou immunofluorescentiekleuring gebruikt kunnen worden op celuitstrijkjes van witte bloedcellen. Een dergelijke toepassing is echter niet aangewezen, aangezien enerzijds tijdens de viraemische fase slechts 1 tot 10 van  $10^5$  witte bloedcellen viraal antigeen tot expressie brengen (Dutta en Myrup, 1983; Scott *et al.*, 1983; Edington *et al.*, 1986; Edington *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1998) en anderzijds de symptomen veelal pas optreden na de viraemische fase (Patel *et al.*, 1982; Edington *et al.*, 1986; Edington *et al.*, 1991). Post mortem kunnen vriescoupes gemaakt worden van centraal zenuwweefsel, maar de kans is groot dat bij het maken van de coupes de aangetaste zones gemist worden, omdat de infectie sterk gelokaliseerd is in het zenuwweefsel (Schultheiss *et al.*, 1997).

De meerderheid van de bevestigde gevallen van EHV-1 in 1999 (71%) was niet gevaccineerd tegen EHV-1, bijna één derde (29%) was wel gevaccineerd. Onze gegevens bevestigen dus dat vaccinatie het optreden van abortus, neonatale sterfte en zenuwstoornissen niet met zekerheid kan voorkomen. Dit werd reeds aangetoond in eerdere studies (Bryans en Allen, 1982; Burrows *et al.*, 1984; Frymus *et al.*, 1986; Kohn en Fenner, 1987; Bürki *et al.*, 1990). Onze beperkte studie, die vooral een diagnostische bedoeling had, liet niet toe te evalueren in hoeverre vaccinatie een reductie van het aantal EHV-1 gevallen van abortus, neonatale sterfte en zenuwstoornissen teweegbracht.

### DANKBETUIGING

De auteurs bedanken de afdeling Pathologie van de Huisdieren van de Faculteit Diergeneeskunde voor het

ter beschikking stellen van autopsieverslagen en histopathologische bevindingen. Mevrouw C. Bracke wordt bedankt voor het uitvoeren van de virusisolaties en de immunofluorescentiekleuringen.

#### LITERATUUR

- Allen G.P., Bryans J.T. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 2, 78-144.
- Bryans J.T., Allen G.P. (1982). Application of a chemically inactivated, adjuvanted vaccine to control abortigenic infection of mares by equine herpesvirus 1. *Developments in Biological Standardization* 52, 493-498.
- Bryans J.T., Allen G.P. (1989). Herpesviral diseases of the horse. In: Wittmann G. (editor). *Herpesviral Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Kluwer, Boston, p. 176-229.
- Buddaert W., Nauwynck H., Pensaert M. (1998). Paardenherpesvirus type 1 en 4 infecties: een overzicht. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 67, 262-271.
- Bürki F., Rossmannith W., Nowotny N., Pallan C., Möstl K., Lussy H. (1990). Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *The Veterinary Quarterly* 12, 80-86.
- Burrows R., Goodridge D., Denyer M.S. (1984). Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: Challenge with a subtype 1 virus. *The Veterinary Record* 14, 369-374.
- Crabb B.S., Studdert M.J. (1996). Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus 4) and equine abortion (equine herpesvirus 1) In: Studdert M.J. (editor). *Virus infections of vertebrates, 6: Virus infections of equines*, Elsevier, Amsterdam, p. 11-37.
- Dutta S.K., Myrup A.C. (1983). Infectious center assay of intracellular virus and infective virus titer for equine mononuclear cells infected *in vivo* and *in vitro* with equine herpesviruses. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47, 64-69.
- Edington N., Bridges C.G., Patel J.R. (1986). Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Archives of Virology* 90, 111-124.
- Edington N., Smyth B., Griffiths L. (1991). The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *Journal of Comparative Pathology* 104, 379-387.
- Frymus T., Kita J., Woyciechowska S., Ganowicz M. (1986). Foetal and neonatal foal losses on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infected farms before and after EHV-1 vaccination was introduced. *Polskie Archiwum Weterynaryjne* 52, 493-498.
- Gibson J.S., Slater J.D., Awan A.R., Field H.J. (1992). Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Archives of Virology* 123, 351-366.
- Kohn C.W., Fenner W.R. (1987). Equine herpes myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 3, 405-419.
- Schultheiss P.C., Collins J.K., Hotaling S.F. (1997). Immunohistochemical demonstration of equine herpesvirus-1 antigen in neurons and astrocytes of horses with acute paralysis. *Veterinary Pathology* 34, 52-54.
- Scott J.C., Dutta S.K., Myrup A.C. (1983). In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *American Journal of Veterinary Research* 44, 1344-1348.
- Smith D.J., Iqbal J., Purewal A., Hamblin A.S., Edington N. (1998). *In vitro* reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5/CD8 leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *Journal of General Virology* 79, 2997-3004.
- Patel J.R., Edington N., Mumford J.A. (1982). Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. *Archives of Virology* 74, 41-51.