

Porcine myocarditis syndrome (PMC) – a new viral disease of swine

Pejsak Z., Truszczyński M. • National Veterinary Research Institute, Puławy.

This article presents a new swine infectious disease first identified in 2003 in Australia and occurring only there, until now. Porcine myocarditis syndrome (PMC) is associated with a small virus. Clinical symptoms of the disease are related to the increase of stillbirths and sudden death of newborn piglets. The major sign of this syndrome is four or more affected piglets, some mummified, born dead in a litter. Alive littermates show significantly decreased viability with up to 35% mortality in preweaning period. At necropsy major finding is hydropericardium. Histopathological lesions demonstrate acute to sub-acute nonsuppurative myocarditis with myonecrosis. The Australian researchers using virologic and genetic methods have identified the pestivirus as a causative agent of PMC. Genetic analyses have shown a low degree of identity with the currently recognized pestivirus species (BVDV-2, BDV and CSFV). The new porcine virus is also antigenically different from other representatives of the genus *Pestivirus*.

Keywords: porcine myocarditis syndrome (PMC), mummified fetuses, weak suckling piglets.

W latach 2004 (1) i 2007 (2) wyjaśniono na podstawie badań laboratoryjnych przyczynę zaobserwowanej w 2003 r. w Australii nowej choroby cechującej się rodzeniem martwych, często zмумifikowanych płodów oraz zwiększoną śmiertelnością, przy nagłych zejściach śmiertelnych prosiąt w okresie przedodsadzeniowym. Nazwano ją zespołem zapalenia mięśnia sercowego prosiąt (porcine myocarditis syndrome – PMCS; 1, 2).

Badania mające na celu określenie etiologii choroby przedstawiały się następująco. W surowicach loch, które rodziły martwe płody lub od których pochodziły padłe niebawem po porodzie prosięta, nie wykazano przeciwciał swoistych dla wirusów: *encephalomyocarditis* (EMC), Menangle, Hendra, Nipah, PRRS, pryszczycy, choroby pęcherzykowej i choroby Aujeszkyowej oraz klasycznego pomoru świń. W surowicach pierwiastek przed pokryciem stwierdzono natomiast przeciwciała swoiste dla parwowirusa prosiąt (PPV), cirkowirusa prosiąt typu 2 (PCV-2) i w mniejszym odsetku dla cirkowirusa prosiąt typu 1 (PCV-1).

W płynie osierdziowym płodów lub padłych prosiąt, w którym poziom IgG był podwyższony, nie wykryto przeciwciał dla wymienionych drobnoustrojów, w tym również dla PPV i cirkowirusów oraz wirusa wirusowej biegunki bydła (BVDV), *To-*

Zespół zapalenia mięśnia sercowego prosiąt ssących – nowa wirusowa choroba świń*

Zygmunt Pejsak, Marian Truszczyński

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

xoplasma gondii, jak też serowarów *Leptospira interrogans: pomona, tarraovi* i *gripotyphosa*. Tkanki padłych prosiąt okazały się ujemne w teście PCR w kierunku: PPV, PCV-1 i PCV-2 oraz w zakażonej materią padłych prosiąt hodowli komórkowej, badanej na obecność wirusów: PCV-1 i PCV-2. W badanych narządach nie wykryto też chorobotwórczych bakterii.

Szczególnie istotne w określaniu czynnika etiologicznego zespołu zapalenia mięśnia sercowego prosiąt było wykluczenie jako przyczyny rodzenia się martwych płodów parwowirusa świń (PPV), gdyż wywołuje on podobny obraz chorobowy. Analogenicznie, ważne ze względu na powodowanie zapalenia mięśnia sercowego u prosiąt przez cirkowirus PCV-2 i wirus *encephalomyocarditis*, było niewykrycie tych drobnoustrojów w badanym materiale (2). Ponadto ani badanie kliniczne, ani histopatologiczne nie potwierdziło podłożeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego.

Mikroskopia elektronowa utrwalonych skrawków mięśnia sercowego martwych płodów lub padłych prosiąt uwidoczniła bliżej nieokreślony wirus, o średnicy około 20 nm, w śródłonku naczyń krwionośnych.

Materiałem do badań genetycznych był kwas nukleinowy uzyskany ze zmieszanych surowic pochodzących od płodów miotu, w którym prawdopodobieństwo wirerii było wysokie (2). Poddano go amplifikacji przy użyciu metody SISPA (sequence independent single primer amplification). Metoda ta polega na amplifikacji nieznanego DNA przy użyciu pojedynczego nieswoistego startera. Powstałe produkty były następnie klonowane i sekwencjonowane, a wyniki porównywane z innymi sekwencjami, znajdującymi się w bazie Banku Genów (GenBank). Do badania wyciągów tkankowych padłych prosiąt z podejrzeniem PMCS, w tym materiału (*inoculum*), który podawano w celu ewentualnego przeniesienia zakażenia na zdrowe prosięta zastosowano testy PCR oparte na sekwencjach SISPA (2).

Po określeniu sekwencji RNA nowego wirusa wykonano próby jego izolacji w hodowli komórek PK-15A. Replikację wirusa stwierdzano początkowo metodą PCR przy użyciu starterów opartych na sekwencjach zidentyfikowanych za pomocą SISPA. Antygeny wirusa wykrywano też w hodowli komórkowej metodą z zastosowaniem przeciwciał znakowanych peroksydazą (peroxidase-labeled antibody method – PLA) z użyciem surowicy świń ozdrowieńców. W oznaczeniach tych wykorzystano także przeciwciała monoklonalne przeciw znanemu pestiwirowi.

W wyniku wykonanych przy użyciu przedstawionej metody badań genetycznych i wirusologicznych uzyskano dowody na wykrycie w tkankach padłych prosiąt nowego wirusa RNA. Równocześnie nie wykazano przy zastosowaniu SISPA żadnej charakterystycznej dla DNA sekwencji. Zidentyfikowane segmenty RNA obejmowały regiony kodujące 5'UTR, Npro i E2 pestiwirusa. Wykazano też ograniczoną sekwencję z regionów pestiwirusa: p7, Erns, NS5A i NS5B. Analizy genetyczne i konstrukcja dendrogramów wykazały, że nowy wirus, będąc pestiwirowem, różni się znacznie właściwościami genetycznymi od wszystkich dotychczas poznanych pestiwirusów. Wykonane opracowanym testem PCR badania wykryły sekwencje charakterystyczne dla nowego wirusa w tkankach 7 z 9 prosiąt z zespołem zapalenia mięśnia sercowego. Po zidentyfikowaniu pestiwirusa podjęto dalsze badania nad jego izolacją i potwierdzono replikację wirusa w komórkach PK-15A, metodą PLA, z użyciem surowicy świń ozdrowieńców. Wykazano gromadzenie się antygenów wirusowych w cytoplazmie, co jest typowe dla pestiwirusów. Nie zaobserwowano jednak seroneutralizacji krzyżowej, gdy w teście z użyciem antygenów szczepów referencyjnych wirusa biegunki wirusowej bydła (BVDV), wirusa choroby granicznej (BDV) i wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV) stosowano surowicę ozdrowieńców po przebyciu zespołu zapalenia mięśnia sercowego. Nowy pestiwirus cechował się zatem ni-

* Zmieniona wersja artykułu opublikowanego w miesięczniku „Trzoda Chlewna”.

skiego stopnia pokrewieństwem antygenowym ze znanymi pestiwirusami. Znacznie trudniej uzyskiwano też jego replikację w hodowli komórkowej, w tym w linii PK-15 niż wymienionych gatunków rodzaju *Pestivirus*. Jednak właściwe mu antygeny można było zidentyfikować metodą z zastosowaniem przeciwciał znakowanych peroksydazą w hodowli komórkowej za pomocą surowicy poliwalentnej od prosiąt, które przebyły zespół zapalenia mięśnia sercowego.

W podsumowaniu obecnych badań autorzy przedstawionych wyników uważają (2), że mimo dowodów spełniających odnośnie do nowego wirusa triadę Kocha (włącznie z udanym eksperymentalnym zakażeniem prosiąt wyciągiem tkankowym z chorych lub padłych prosiąt), niezbędne są dodatkowe prace, zmierzające do zajęcia jednoznacznego stanowiska, że jest on czynnikiem etiologicznym zespołu zapalenia mięśnia sercowego prosiąt.

Na immunogenność nowego patogenu wskazały wyniki rozrodu w kolejnych miotach. Stwierdzono bowiem średnio znaczący spadek (oceniany statystycznie testem chi-kwadrat) liczby martwo urodzonych prosiąt i zмумifikowanych płodów w miotach następnym w porównaniu do poprzednich, kiedy zespół chorobowy wystąpił po raz pierwszy. Uważa się (2), że do zakażenia płodów dochodzi w okresie późnej ciąży od lochy, która jest bezobjawowym nosicielem wirusa zespołu zapalenia mięśnia sercowego. Czynniki chorobowe zakaża wtedy różniące się komórki mięśnia sercowego i naczyń płodu. Natomiast do zakażenia loch dochodzi drogą kontaktu bezpośredniego lub za pośrednictwem kału lub innych wydaliny zakażonych loch.

Wśród objawów klinicznych nasuwających podejrzenie zespołu zapalenia mięśnia sercowego prosiąt (1) na uwagę zasługuje rodzenie się prosiąt martwych (ryc. 1) bądź płodów zмумifikowanych przy pozostałych żywych noworodkach. Spośród nich niektóre nie wykazują normalnej żywotności i padają w pierwszych dniach życia, a pozostałe przechorowują. Z danych badaczy australijskich wynika (1), że średnio z miotu liczącego na ogół ponad 10 płodów średnio 5,2 rodzi się martwo. Jednak całkowita liczba prosiąt urodzonych w okresie trwania choroby w obserwowanym stadzie rodzących loch kształtuje się we względnej normie, wahając się od 5 do 18 żywych noworodków.

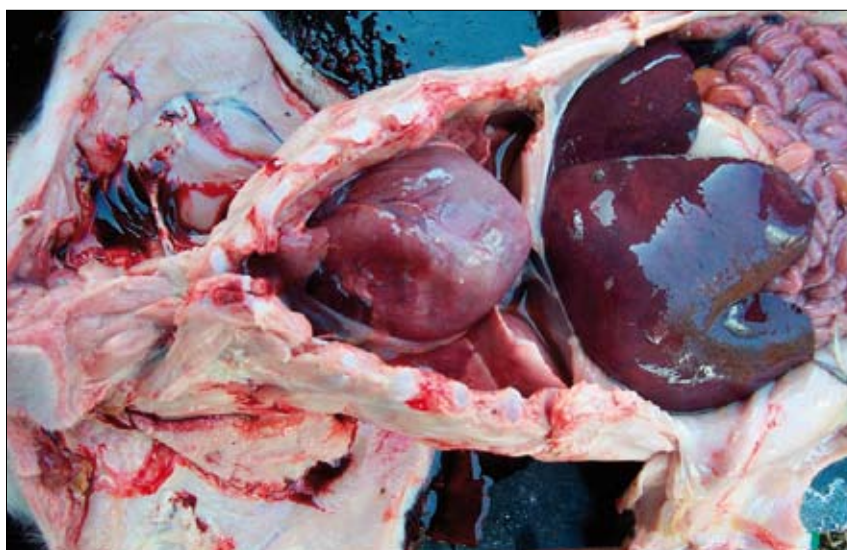
U martwo urodzonych prosiąt występuje obrzęk podskórny w okolicy głowy i klatki piersiowej (ryc. 2), który przy ucisku ma charakter galaretowaty, stąd określenie „jelly piglet”, czyli galaretowate prosię. W worku osierdziowym stwierdza się większą niż normalnie ilość płynu, co okre-



Ryc. 1. Jednym z objawów zespołu zapalenia mięśnia sercowego są poronienia w trzecim miesiącu ciąży



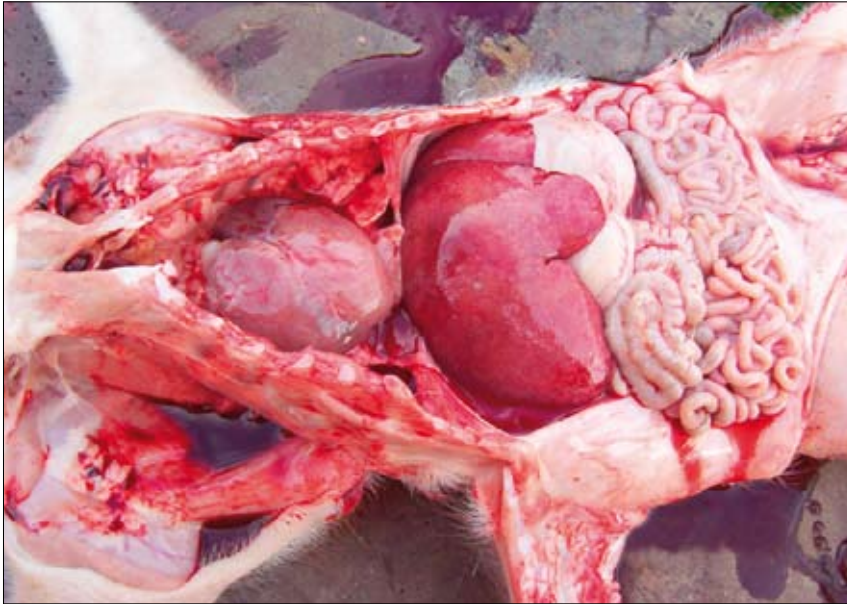
Ryc. 2. Galaretowaty obrzęk tkanki podskórnej głowy



Ryc. 3. Powiększenie mięśnia sercowego, obecność płynu w klatce piersiowej oraz jamie brzusznej oraz powiększenie wątroby u prosięcia padłego z powodu zespołu zapalenia mięśnia sercowego

śla się jako puchlina osierdzia (*hydropericardium*) oraz zwiększenie ilości płynu w jamach opłucnej i otrzewnej. Charakterystyczne jest powiększenie i przekrwienie wątroby (ryc. 3). Obserwuje się nieregularne obszary błądoci (*pallor*) mięśnia sercowego oraz nici lub siatkę włóknika na otrzewnej i opłucnej (ryc. 4). Niekiedy ob-

serwuje się nadmierne nastrożenie naczyń krwionośnych serca (ryc. 5). Można też stwierdzić wybroczyny w błonie śluzowej żołądka. Histopatologicznie wykazuje się ostre do podostrego wieloogniskowe nieropne zapalenie mięśnia sercowego z ogniskami martwicy (*myonecrosis*). Zapalenie ma często charakter łagodny i zło-



Ryc. 4. Niekiedy u padłych prosiąt stwierdza się błądź mięśnia sercowego oraz obecność włókniaka na powierzchni jelit



Ryc. 5. Nastrzykanie naczyń krwionośnych mięśnia sercowego oraz nieregularne obszary błądź

kalizowany, różniący się od miokardiopatii na tle niedoborów żywieniowych. Niekiedy występuje śródrazikowe zapalenie płuc, zapalenie mózgu, wątroby i węzłów chłonnych. Łożyska nie wykazują zmian chorobowych. Rodzące lochy są w normie, przy zachowanym ilościowym spożyciu paszy i fizjologicznej temperaturze ciała. Liczba zakażonych miotów wzrasta szybko w ciągu 2 do 3 tygodni, do 20 lub 35%, w każdej grupie rodzących macior. Sytuacja taka utrzymuje się przez 12 do 20 tygodni w danej chlewni loch, po czym następuje szybki powrót do normy, w ciągu 2–3 tygodni. Choroba może przenosić się do sąsiedniej grupy produkcyjnej loch w okresie 3-miesięcznym.

Prosięta miotu zakażonego urodzone jako żywe wykazują przeważnie zmniejszoną żywotność i zwiększoną śmiertelność, wynoszącą w momencie odsadzenia

do 35%. W ciągu 3 tygodni życia następują u nich nagle, niepoprzedzone objawami klinicznymi, zejścia śmiertelne. W niektórych przypadkach u chorych prosiąt stwierdza się sinicę tarczy ryjowej i małżowin usznych oraz tuż przed śmiercią kwiczenie i intensywne oddychanie.

Prosięta ze zmianami wskazującymi na PMCS stanowią 23–26% padnięć w stosunku do innych przyczyn zejść śmiertelnych okresu przedodsadzeniowego.

Przyrosty masy ciała u warchlaków i tuczników pochodzących z miotów, w których były prosięta padłe z powodu PMCS, są podobne do wyników uzyskanych w przypadku prosiąt, z miotów nie zakażonych. Personel obsługujący lochy, które rodzą prosięta zakażone, nie wykazuje zaburzeń w zdrowiu, co wskazuje na niechorobotwórczość wirusa dla człowieka.

Materiałami do badań są płody i padłe prosięta lub mięsień sercowy w worku osierdziowym oraz surowica spulowana od prosiąt z miotu. Służą one do badań biologicznych (zakażenia nimi wrażliwych prosiąt osesków) i wirusologicznego (hodowla komórkowa i wykrywanie wirusa w surowicy prosiąt ozdrowieńców) oraz do ekstrakcji kwasów nukleinowych wirusa w celu wykonania badań genetycznych (PCR, sekwencjonowanie RNA).

Po wykluczeniu innych, wchodzących w grę czynników chorobowych, identyfikację wirusa zespołu zapalenia mięśnia sercowego umożliwia sekwencjonowanie RNA z oczyszczonego ekstraktu surowicy, uzyskany za pomocą PCR charakterystyczny dla tego wirusa wynik oraz wykrycie wirusa metodą PLA w hodowli komórkowej z surowicą prosiąt, które przeżyły zakażenie. W diagnostyce różnicowej uwzględnić należy przede wszystkim parwowirusę, poodсадzeniowy wielonarządowy zespół wyniszczający, *encephalomyocarditis*, klasyczny pomór świń, leptospirozę, chorobę Aujeszkyego i zatrucia mykotoksynami. W Polsce, jak na razie, nie prowadzi się badań laboratoryjnych w kierunku tego zespołu chorobowego.

Brak danych na temat zwalczania zespołu zapalenia mięśnia sercowego prosiąt. Wydaje się, że przydatne jest postępowanie analogiczne do zalecanego w przypadkach innych chorób wirusowych, powodujących ronicenie i zwiększoną śmiertelność prosiąt osesków. Nie wolno dopuszczać do wprowadzenia do chlewni wolnych od zespołu zapalenia mięśnia sercowego świń z obiektów dotkniętych tą chorobą.

Jak dotychczas nie spotkano informacji, że ta nowa choroba występuje poza Australią. Jednakże może być również tak, że nie została ona gdzie indziej rozpoznana z powodu olbrzymich trudności w izolacji, a w konsekwencji identyfikacji czynnika etiologicznego tej choroby.

Zdjęcia zamieszczone w artykule udostępnił dr Robyn Smith, dr Eric Thorton i dr Amanda Lee z Australii, za co serdecznie im dziękujemy.

Piśmiennictwo

1. McOrist S. A., Thornton E., Peake A., Walker R., Robson S., Finlaison D., Kirkland P., Reece R., Ross A., Walker K., Hyatt A., Morrissy C.: An infectious myocarditis syndrome affecting late-term and neonatal piglets. *Austr. Vet. J.* 2004, **82**, 509–511.
2. Finlaison D. S., Kirkland P. D., Frost M. J., Cook R., Sriwastawa M., King K. R., Ridpath J. F., Gu X.: Identification of a novel Pestivirus in an outbreak of stillbirth and preweaning disease in pigs due to myocarditis. *5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kraków, Poland 24–27 June 2007.

Prof. dr hab. Z. Pejsak, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: zpejsak@piwet.pulawy.pl