

## Streszczenie

Spośród herpeswirusów występujących u koni najważniejsze znaczenie, zarówno z klinicznego jak i ekonomicznego punktu widzenia posiada EHV-1. Wirus ten powoduje zapalenie górnych dróg oddechowych i płuc, poronienia i upadki nowonarodzonych źrebiąt oraz zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego określane jako herpeswirusowa mieloencefalopatia (EHM). W ostatnich latach odnotowano wyraźny wzrost zachorowań koni na EHM, których przyczyną było bardzo często zakażenie neuropatogennymi szczepami EHV-1. Ze względu na brak danych dotyczących występowania w populacji koni w naszym kraju szczepów neuropatogennych, postanowiono poddać analizie genetycznej terenowe izolaty EHV-1, wyizolowane w Zakładzie Wirusologii z przypadków poronień u klaczy odnotowanych w latach 1999 – 2012. Do badań użyto test PCR-RFLP, który dzięki zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *SalI* umożliwił określenie przynależności szczepów EHV-1 do genotypu neuropatogennego lub nieneuropatogennego wirusa. Dodatkowo, celem potwierdzenia obecności mutacji niesynonimicznej w pozycji 2254 genu ORF30 wykorzystano technikę sekwencjonowania metodą Sanger. Stwierdzono, że dwa izolaty spośród 20 zbadanych wykazywały obecność guaniny, podczas gdy u pozostałych 18 izolatów stwierdzono w tej pozycji adeninę. Uzyskane dane potwierdziły obecność neuropatogennych (genotyp G<sub>2254</sub>) szczepów EHV-1 w populacji koni w Polsce – tym samym wskazując na zwiększone ryzyko wystąpienia postaci nerwowej zakażenia EHV-1. Są to pierwsze opisane przypadki występowania neuropatogennych szczepów EHV-1 w populacji koni w Polsce.

Powyższe badania rozszerzono o izolaty, wyizolowane w latach 2012 – 2016, jak również o homogenaty, w których stwierdzono obecność materiału genetycznego EHV-1. We wszystkich próbkach pochodzących z tego okresu wykryto obecność szczepów o genotypie nieneuropatogennym (genotyp A<sub>2254</sub>).

Ocenie poddano także przydatność genu ORF68 wirusa EHV-1 jako markera genetycznego umożliwiającego klasyfikowanie szczepów do ustanowionych w 2006 roku grup genetycznych. Gen ten charakteryzuje się najwyższym współczynnikiem zmienności genetycznej w całym genomie EHV-1, co wynika z obecności licznych

pojedynczych mutacji punktowych, lokalizujących się we fragmencie genu o wielkości około 600 pz. Uważa się, że poszczególne układy mutacji są specyficzne dla wirusów izolowanych od koni z poszczególnych krajów/kontynentów, co pozwala na określenie ich pochodzenia geograficznego. W związku z tym badaniami objęto 38 sekwencji krajowych szczepów EHV-1, wykrytych z dotychczasowych przypadków poronień u klaczy w latach 1999 – 2016. Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej genu ORF68 wykazano, że trzy szczepy (7,9%) należały do III grupy genetycznej, cztery (10,5%) do IV grupy genetycznej (obie typowe dla izolatów zachodnioeuropejskich), podczas gdy pozostałe 31 szczepów EHV-1 (81,6%) nie zostało zaklasyfikowane do żadnej z sześciu ustanowionych grup genetycznych.

Przeprowadzone badania obejmowały także aspekt praktyczny, który polegał na zastosowaniu testu real-time PCR w diagnostyce poronień u klaczy wywoływanych przez EHV-1. W badaniach użyto starterów komplementarnych do sekwencji nukleotydowej genu kodującego glikoproteinę B wirusa. Wykazano, że najniższe wartości C<sub>q</sub>, które jednocześnie wskazują na najwyższą zawartość wirusowego DNA, występują w próbkach płuc, wątroby i śledziony. Dlatego też, w przypadkach podejrzenia wystąpienia poronienia na tle EHV-1, narządy te powinny być w pierwszej kolejności pobrane przez lekarzy weterynarii do diagnostyki laboratoryjnej poronień u klaczy.

W ostatnich kilkunastu latach obserwuje się wzmożone zainteresowanie tematyką związaną z zakażeniami wywoływanymi przez gammaherpeswirusy u koni. Badania te dotyczyły w głównej mierze określenia występowania wirusów u różnych ras koni, mniej uwagi poświęcano z kolei ich charakterystyce molekularnej. Dlatego też kolejnym celem badań było określenie aktualnej sytuacji epizootycznej zakażeń powodowanych zarówno przez alfa- jak i gammaherpeswirusy, u koni należących do dziewięciu różnych ras użytkowych hodowanych w Polsce. Dodatkowo, przeprowadzone badania umożliwiły poznanie zmienności genetycznej wśród krajowych izolatów EHV-2 i EHV-5. Wykazano, że prewalencja EHV-2 i EHV-5 wynosiła odpowiednio 77,2% i 47%. Wskaźnik wykrywalności aktywnych zakażeń, a także zawartość wirusa w wydzielinie z górnych dróg oddechowych były najwyższe u młodych koni. U źrebiąt dominowały zakażenia powodowane przez EHV-2, a u koni rocznych przez EHV-5. Spośród wszystkich zbadanych ras koni, konie czystej krwi

arabskiej i konie rasy małopolskiej były najbardziej podatne na zakażenie EHV-5, podczas gdy u Konika Polskiego i koni rasy śląskiej stwierdzono najmniejszy odsetek wyników EHV-2/5 dodatnich. Analiza filogenetyczna sekwencji fragmentu genu ORF8 kodującego glikoproteinę B wykazała, że większość krajowych izolatów EHV-2 należy do I i II grupy genetycznej opisanych w 2007 roku. Wykazano także, że cztery izolaty utworzyły dwie odrębne grupy. Ponadto, stwierdzono że dwa krajowe izolaty EHV-5 należą do dwóch różnych grup genetycznych.

## Summary

Of the five currently described equine herpesviruses, EHV-1 remains particularly important, due to its high clinical and economic impact. The virus can cause respiratory disease, abortion, neonatal foal death and the neurological disease called equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM). The number of reported cases of infection caused by neuropathogenic strains of EHV-1 has markedly increased especially in Western countries over the last decades. Due to the lack of data regarding the occurrence of neuropathogenic strains among horses in Poland, an investigation of the prevalence of the neuropathogenic and non-neuropathogenic variants was carried out. The study of neuropathogenic markers concerned field isolates of the virus associated with abortions that occurred in Polish studs between 1999 and 2012. For that purpose a PCR–RFLP neuropathogenic/non-neuropathogenic discrimination assay with *SalI* enzyme was used. In addition, the presence of nonsynonymous substitution at position 2254 of the ORF30 gene was analysed using sequence analysis. The results of the study clearly indicated that two of the 20 EHV-1 isolates belonged to the G<sub>2254</sub> neuropathogenic variant, whereas all remaining 18 isolates were non-neuropathogenic (A<sub>2254</sub>). Therefore, the presence of the neuropathogenic genotype of EHV-1 in the horse population in Poland may indicate an increase in the risk of EHM outbreaks.

These studies were further extended by testing new field isolates propagated at the Department of Virology between 2012 and 2016, as well as field tissue samples positive for DNA of EHV-1, which failed to be detected in the isolation test. Using the same methodology as in the previous study, all viruses in this group were allocated to the non-neuropathogenic genotype (A<sub>2254</sub>).

Additionally, the usefulness of the ORF68 gene as a putative genetic marker for the grouping of EHV-1 isolates into genetic groups (as described in 2006) was assessed. According to the previous studies, a 600 bp region of this gene is characterized by the presence of multiple single nucleotide polymorphism sites (SNPs), unique for the viral strains isolated from horses from particular geographical regions of the world. To test this assumption sequences of 38 EHV-1 viruses obtained from cases of abortions in Poland between 1999 and 2016 were investigated. Comparative nucleotide sequence analysis of the SNPs within the ORF68 gene revealed that three (7.9%) EHV-1 strains

belonged to group III, four (10.5%) belonged to group IV (both groups were typical for West European isolates), and the remaining 31 of them (81.6%) could not be classified.

In addition, the application of a quantitative PCR for rapid detection of EHV-1 in the tissues of aborted fetuses was described. The primers used in that study were based on the highly conserved region, encompassing the glycoprotein B gene. It has been shown that the lowest mean C<sub>q</sub> (indicating the highest mean load of viral DNA) was obtained in samples taken from lung, liver and spleen tissues. Therefore, those tissues should be considered primarily as diagnostic material when aborted fetuses are tested for the presence of EHV-1 infection.

In recent years equine herpesvirus infections caused by EHV-2 and EHV-5 have become the topic of interest of many research groups. The majority of scientific reports have analysed the occurrence of equid gammaherpesviruses in horses, whereas investigation of the genetic characteristics of those viruses has rarely been undertaken. Hence, the aim was to estimate the prevalence of infections with alpha- and gammaherpesviruses among Polish horses belonging to nine different breeds and to determine genetic variability within EHV-2 and EHV-5 isolates. It was shown that the prevalence of EHV-2 and EHV-5 was 77.2% and 47%, respectively. The detection rate of active EHV-2/5 infections and the viral load in nasal secretions were the highest in young horses, which was particularly evident for EHV-2-infected foals and EHV-5-infected yearlings. Arabians and Malopolska horses were more likely to be positive for EHV-5 than horses from other breeds, while Silesian and Polish Konik horses were less likely to be positive for either EHV-2 or EHV-5. Phylogenetic analysis of the sequences of the ORF8 region encoding glycoprotein B gene has shown that the majority of Polish EHV-2 isolates clustered within two genetic groups (I and II), originally described in 2007, whereas the remaining four isolates formed two separate clusters. Two Polish EHV-5 isolates appeared to be genetically different and clustered within two different groups.