

Karol Stasiak^{1*}, Jerzy Rola¹, Jan Franciszek Żmudziński¹

¹Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w lutym 2016 r.
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka ogólna rodziny *Herpesviridae*. 3. Rys historyczny. 4. Wirion. 5. Genom. 6. Glikoproteiny. 7. Patogeneza zakażenia. 8. Choroby układu oddechowego. 9. Poronienia. 10. Zakażenia nowo narodzonych źrebiąt. 11. Zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego. 12. Zakażenia innych gatunków zwierząt. 13. Diagnostyka laboratoryjna. 14. Immunoprofilaktyka. 15. Podsumowanie

Equine Herpesvirus type 1 – well known, but still challenging

Abstract: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is a double-stranded DNA virus occurring in all breeds of horses. It belongs to the *Varicellovirus* genus, *Herpesviridae* family and *Alphaherpesvirinae* subfamily. EHV-1 may cause epidemic respiratory disorders, abortions in pregnant mares, neonatal foal death, chorioretinopathy and also neurological disease, termed equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM). The infection spreads by inhalation of the aerosolised infectious virus or close contact with aborted fetuses, fetal membranes and fomites. Lifelong latency has been demonstrated especially in trigeminal ganglion, lymphatic tissues draining the respiratory tract and in peripheral blood leukocytes, from where the virus can be periodically reactivated. Both traditional serologic and virus isolation tests have been available for a long time, however, these assays have disadvantages, interfering with fast and reliable detection of EHV-1. Advances in molecular biology and the use of quantitative PCR system allow for more sensitive detection in a single genome copy range, higher analytical specificity and calculation of EHV-1 viral loads.

1. Introduction. 2. General characteristics of *Herpesviridae* family. 3. Historical background. 4. Virion. 5. Genome. 6. Glycoproteins. 7. Pathogenesis. 8. Respiratory disorders. 9. Abortions. 10. Neonatal foal deaths. 11. Equine herpesvirus myeloencephalopathy. 12. Infections in other species. 13. Laboratory demonstration of EHV-1 infections. 14. Immunoprophylaxis. 15. Conclusion

Słowa kluczowe: Diagnostyka, herpeswirus koni typ 1, mieloencefalopatia, ronienia, szczepionki

Key words: Diagnostic methods, equine herpesvirus type 1, myeloencephalopathy, abortions, vaccines

1. Wstęp

Herpeswirus koni typ 1 (EHV-1), początkowo nazywany wirusem zakaźnego ronienia kłaczy jest jednym z najbardziej powszechnych patogenów występujących w populacji koni, będąc częstą przyczyną poważnych strat ekonomicznych. Wirus ten powoduje zakażenia górnych dróg oddechowych, poronienia u ciężarnych kłaczy, śmierć nowonarodzonych źrebiąt, choroby oczu jak również przypadki zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego w postaci herpeswirusowej mieloencefalopatii (EHM – Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy). U osobników chorych, wirus może umiejscowić się w zwoju nerwu trójdzielnego, węzłach chłonnych zlokalizowanych w obrębie górnych dróg oddechowych i w leukocytach krwi obwodowej przyjmując postać zakażenia latentnego, mogącego utrzymywać się przez wiele lat.

Wyniki szeroko prowadzonych badań nad EHV-1, jednoznacznie potwierdzają występowanie w populacji koni szczepów różniących się wirulencją (wysoko- i słabo-zjadliwe). Jednakże pomimo zdobytej wiedzy i nieustannych wysiłków badaczy na całym świecie, wiele zagadnień dotyczących natury EHV-1 jest nadal słabo poznana.

2. Charakterystyka ogólna rodziny *Herpesviridae*

Wirusy należące do rodziny *Herpesviridae* są szeroko rozpowszechnione w populacji wielu gatunków ssaków, ptaków i gadów. W jej skład zaliczamy trzy podrodziny: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammapherpesvirinae*. Posiadają one liniowy, dwuniciowy DNA (o wielkości 124–230 tys. par zasad), otoczony ikosaedralem zbudowanym ze 162 kapsomerów, które otacza tegument. Zewnętrzną warstwę wirionu stanowi białkowo-lipidowa otoczka na powierzchni której znajdują się glikoproteiny. W skład rodziny *Herpesviridae* zalicza się 14 rodzajów, które ze względu na przynależność gatunkową można podzielić na: wirusy występujące u ludzi, małe człekokształtne, wirusy innych ssaków, a także ptaków, płazów i gadów, ryb kostnoszkieletowych oraz wirusy bezkręgowców [35, 57].

Z biologicznego punktu widzenia, rodzina *Herpesviridae* charakteryzuje się czterema właściwościami. Pierwszą z nich jest możliwość ustanowienia stanu latencji w komórkach gospodarza. Po drugie, zarówno proces syntezy wirusowego DNA jak i formowania się kapsydu ma miejsce w jądrze komórkowym. Kolejną właściwością jest posiadanie dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego, kodującego szereg enzymów

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 31 21, e-mail: karol.stasiak@piwet.pulawy.pl

biorących udział w metabolizmie kwasów nukleinowych, białek i w syntezie DNA. Czwartą cechą jest śmierć komórki gospodarza na skutek uwalniania się wirusów potomnych [57].

3. Rys historyczny

Badania nad czynnikami zakaźnymi o etiologii wirusowej wywołującymi ronienia u kłaczy miały swój początek w latach trzydziestych ubiegłego wieku na Uniwersytecie Rolniczym w stanie Kentucky (USA). Infekcja, za wywołanie której podejrzewano nieznaną współczesnej nauce wirus, została po raz pierwszy opisana w 1933 roku na podstawie zaobserwowanych zmian anatomopatologicznych u poronionego końskiego płodu [16]. Niecałe dwie dekady później w diagnostyce zakaźnego ronienia kłaczy posłużono się metodami serologicznymi z których najszerze zastosowanie znalazł odczyn wiązania dopełniacza [18]. W tym samym czasie podjęto próby wyizolowania i namnożenia w pełni zjadliwego wirusa, początkowo przy użyciu osesków chomików syryjskich [19], zależonych zarodków kurzych [20] jak również i hodowli komórkowych [44].

Kolejne badania dotyczące wyjaśnienia patogenezy poronień na tle EHV-1, przyczyniły się do odkrycia powinowactwa zarazka do układu oddechowego. Inokulowanie ciężarnych kłaczy filtratami pochodzącymi od poronionych płodów końskich ze zmianami anatomopatologicznymi sugerującymi zakażenie wirusem, wykazało pojawienie się u nich objawów chorobowych ze strony górnych dróg oddechowych [40]. Badania dotyczące etiopatogenezy wirusa zakaźnego ronienia kłaczy w odniesieniu do układu oddechowego dotyczyły również koni młodych. Stwierdzono, że u tych osobników wirus także jest odpowiedzialny za występowanie zakażeń w obrębie górnych dróg oddechowych [21]. Fakt ten został potwierdzony, po dokładnym przeanalizowaniu charakteru i umiejscowienia zmian anatomopatologicznych, występujących u zakażonych młodych koni i poronionych płodów. Dlatego też badacze zasugerowali, by wirus odpowiedzialny za przypadki poronień u kłaczy był także brany pod uwagę jako jeden z głównych patogenów układu oddechowego [17].

Do początku lat osiemdziesiątych wyróżniano dwa podtypy wirusa EHV-1. Pierwszy z nich uważany był za czynnik etiologiczny wywołujący ronienia i zaburzenia ze strony układu nerwowego, podczas gdy podtyp drugi miał odpowiadać głównie za infekcje w obrębie górnych dróg oddechowych. Punktem zwrotnym była analiza wyżej wymienionych podtypów z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych, która wykazała szereg różnic w profilach elektroforetycznych, jednoznacznie

wskazując na ich odrębność [65, 78, 82]. Dlatego też zespół badaczy z Australii zasugerował aby oba te podtypy nazywano odpowiednio EHV-1 i EHV-4 [78].

W 2005 roku przeprowadzono szczegółową analizę genetyczną sekwencji nukleotydowych szczepów EHV-1, z których jeden został wyizolowany z przypadku klinicznego, manifestującego się objawami neurologicznymi (Ab4) i drugi będący przyczyną poronień, gdzie nie odnotowano zaburzeń nerwowych (V592). Badacze odkryli mutację punktową (substytucja) w pozycji 2254 genu ORF30. Sekwencja szczepu V592 zawiera w tej pozycji adeninę, natomiast w sekwencji szczepu Ab4 występuje guanina. Mutacja ta określana jest jako polimorfizm pojedynczego nukleotydu i charakteryzuje się zmianą w sekwencji aminokwasowej polimerazy DNA (pozycja 752), czego efektem jest zastąpienie asparaginy kwasem asparaginowym. Po przeanalizowaniu sekwencji nukleotydowej genu ORF30 większej liczby izolatów, autorzy wysunęli hipotezę, na podstawie której uznali, że za wywołanie postaci nerwowej EHV-1 odpowiadają szczepy posiadające genotyp G_{2254} (potencjał neuropatogeny), podczas gdy szczepy o wariancie A_{2254} są nie-neuropatogenne i są zwykle odpowiedzialne za występowanie zakażeń układu oddechowego i poronień [52].

W ostatnich latach pojawiła się znaczna liczba raportów dotyczących ostrych przypadków zachorowań wśród koni w wielu rejonach świata na tle postaci nerwowej EHV-1 [14, 60, 81, 88]. W Polsce odnotowano dwa przypadki poronień u kłaczy, gdzie przyczyną był wirus o wariancie neuropatogeny (G_{2254}), jednakże w naszym kraju ostre kliniczne zakażenie na tle EHM nie zostało do tej pory potwierdzone laboratoryjnie [76]. Warto wspomnieć o pojawianiu się w literaturze dowodów świadczących o istnieniu większej liczby mutacji w genomie EHV-1, które mogą warunkować występowanie herpeswirusowej mieloencefalopatii [24, 60, 61].

4. Wirion

Wirion EHV-1 składa się z dwuniciowego DNA, otoczonego cienkościennym, ikosaedralnym nukleokapsydem o średnicy około 120 nm, wokół którego znajduje się lipoproteinowa otoczka wraz z glikoproteinami. Przestrzeń zlokalizowana pomiędzy nukleokapsydem a otoczką nosi nazwę tegumentu [9]. Dwudziestościenny kapsyd zbudowany jest ze 162 kapsomerów, z których każdy ma cylindryczny kształt i kanał, położony wzdłuż jego osi długiej. Dwanaście z nich określa się mianem pentonów, zlokalizowanych na wierzchołkach, natomiast pozostałe kapsomery – heksony znajdują się na płaszczyznach dwudziestościanu [51]. Pod względem gęstości – wyróżniamy trzy rodzaje nukleokapsydów EHV-1: lekkie ($1,237 \text{ g/cm}^3$), pośrednie ($1,244 \text{ g/cm}^3$) i ciężkie ($1,258 \text{ g/cm}^3$). Wyżej

wymienione nukleokapsydy, różnią się między sobą zawartością DNA, strukturą wewnętrzną, właściwościami chemicznymi i składem białkowym [58].

5. Genom

EHV-1 posiada liniowy, dwuniciowy DNA z ustalonym składem zasad 56,7% G+C [80]. Badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i analizy restrykcyjnej wykazały, że genom wirusa zawiera około 150 tysięcy par zasad (pz) i podzielony jest na dwa połączone ze sobą komponenty: długą – L oraz krótką – S [31, 80]. Komponent L składa się z sekwencji unikatowej U_L zawierającej 112 870 pz, otoczonej końcową sekwencją powtórzoną TR_L (32 pz) i wewnętrzną sekwencją powtórzoną IR_L (32 pz). Podobnie, komponent krótki, zawiera w swoim składzie sekwencję unikatową U_S (11 861 pz) otoczoną dwiema sekwencjami powtórzonymi IR_S i TR_S (obie składają się z 12 714 pz) [80]. Genom EHV-1 posiada 80 otwartych ramek odczytu (ORFs), z czego 4 z nich (ORF 64, 65, 66 i 67) ulega powtórzeniu w sekwencjach TR_S i IR_S i stąd uważa się, że kodowaniu ulega 76 odmiennych genów [80].

6. Glikoproteiny

Na powierzchni otoczki EHV-1 jest zlokalizowanych 12 glikoprotein odgrywających główną rolę w procesach adsorpcji, penetracji, uwalniania cząstek wirusów potomnych, a także rozprzestrzeniania się z komórki do komórki. Jedenaście z nich (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM i gN) swoją nomenklaturę zawdzięcza wysokiej konserwatywności analogicznie do wirusa opryszczki pospolitej (HSV-1). W skład glikoprotein otoczkowych EHV-1 zalicza się również gp2, która obecna jest tylko u dwóch przedstawicieli podrodziny *Alphaherpesvirinae*: herpeswirusa koni typu 4 (EHV-4) i herpeswirusa osłów typu 3 (AHV-3) [56, 62].

Jedną z najważniejszych glikoprotein, niezbędnych do replikacji EHV-1 jest po raz pierwszy opisana w 1985 roku glikoproteina B [49, 73]. Uczestniczy ona w procesie penetracji wirusa i jego rozprzestrzenianiu się między komórkami [49, 92]. Ze względu na wysoką konserwatywność – gen ORF33 (o wielkości około 3000 par zasad), kodujący gB znalazł zastosowanie w diagnostyce jako miejsce przyłączenia wielu starterów i sond molekularnych [15, 34, 36]. Drugą, odgrywającą kluczową rolę w cyklu namnażania herpeswirusa koni typu 1 glikoproteiną jest gD. Jej obecność warunkuje przebieg procesu penetracji [93]. Współdziała ona także w szerzeniu się wirusa pomiędzy komórkami [13, 91]. Dowiedziono, że znajdujący się w jej składzie tripeptyd składający się z argininy, seryny

i kwasu asparaginowego (RSD) ma zdolność wiązania się z αV integrynami komórkowymi, ułatwiając tym samym przenikanie EHV-1 drogą endocytozy [84].

Za początkowe interakcje zachodzące pomiędzy wirusem a siarczanem heparanu znajdującym się na powierzchni błony komórkowej, odpowiada glikoproteina C. Ponadto, współdziała ona w uwalnianiu wirionów potomnych, zwłaszcza w przypadku namnożenia EHV-1 na pierwotnych końskich liniach komórkowych [53]. Glikoproteina C EHV-1 ma zdolność aglutynacji erytrocytów końskich, która jest hamowana jedynie za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-gC. Sytuacja wygląda inaczej w przypadku glikoprotein C występujących u innych herpeswirusów – tam aglutynacja jest blokowana przez heparynę [6]. Glikoproteina G pełni rolę wirusowego białka wiążącego chemokiny np. min. IL8 i CCL3, tym samym mając wpływ na przebieg zapalenia płuc i replikację wirusa podczas zakażenia EHV-1 [11, 83, 85].

Badania nad szczepami w których dokonano delekcji genu kodującego glikoproteinę E i I wykazały, że ułatwiają one rozprzestrzenianie się wirusa między komórkami, jednocześnie nie uczestnicząc w adsorpcji i penetracji, a także w procesach dojrzewania i uwalniania cząstek wirusowych [41]. Wirus, pozbawiony genu kodującego glikoproteinę M wywołuje wyraźnie słabsze zmiany cytopatyczne w hodowlach komórkowych w porównaniu do szczepu macierzystego, tym samym wskazując na fakt, że gM odgrywa ważną rolę zarówno w penetracji EHV-1 jak również w jego szerzeniu się między komórkami [54]. Zbadano również, że jej obecność jest ściśle powiązana z ekspresją genu ORF10 kodującego glikoproteinę N [63].

Funkcjami, jakie pełni glikoproteina K jest oprócz ułatwiania procesu penetracji, także częściowy współudział w powstawaniu syncytiów w dalszych etapach infekcji [50]. Pomimo stwierdzonej obecności gH i gL w zakażonych komórkach, ich funkcja w cyklu namnażania EHV-1 nie jest dokładnie poznana [77]. Jednakże, ostatnio przeprowadzone badania dotyczące glikoproteiny H, wykazały obecność tripeptydu zbudowanego z seryny, kwasu asparaginowego i izoleucyny (SDI), który ma zdolność wiązania się $\alpha 4\beta 1$ integrynami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej. Zasugerowano, że interakcje zachodzące między nimi umożliwiają cząstkom wirusa wybranie odpowiedniej drogi wniknięcia do wnętrza komórki gospodarza (fuzja z błoną komórkową/endocytoza) [8], jak również przyczyniają się do zwiększenia stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytoplazmie, co jest zapoczątkowane aktywowaniem fosfolipazy C i wytwarzaniem trifosforanu 1,4,5-inozytolu, który po połączeniu się z receptorem powoduje uwalnianie Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego. Efektem tego jest aktywacja enzymu – skramblazy fosfolipidowej która transportuje

fosfatydylserynę na zewnątrz błony komórkowej. I dlatego obecnie przyjmuje się, że powyższa zmiana układu lipidów ułatwia wnikanie EHV-1 do komórki [7].

Dokładna rola ostatniej glikoproteiny – gp2, w cyklu namnażania wirusa nadal pozostaje niewyjaśniona. Do tej pory wykazano, że delecja genu ORF71 kodującego gp2 znacząco obniża adsorbcję, penetrację i uwalnianie wirionów, skutkując powstawaniem mniejszych lysinek [79].

7. Patogeneza zakażenia

W środowisku naturalnym, do infekcji EHV-1 dochodzi najczęściej drogą kontaktu bezpośredniego z wydzielinami z górnych dróg oddechowych koni chorych. Źródłem zakażenia może być kontakt z poronionym płodem końskim oraz zawartością pochodzącą z dróg rodných klaczy, która poroniła. Ważną rolę w rozprzestrzenianiu się EHV-1 odgrywa kontakt pośredni, gdzie funkcję wektorów pełnią zanieczyszczone wirusem ręce personelu obsługującego konie czy też niedostatecznie dezynfekowane przyrządy codziennego użytku (żłoby, poidła) [3]. Istnieją dane dotyczące możliwej transmisji wirusa poprzez nasienie ogierów, zarówno podczas krycia naturalnego (przez okres do trzech tygodni od momentu zakażenia) jak i drogą sztucznej inseminacji [29, 89]. U koni, u których zakażenie EHV-1 przyjmie postać latentną (lokalizacja materiału genetycznego wirusa w zwoju nerwu trójdzielnego, tkance limfoidalnej układu oddechowego, leukocytach), pomimo braku widocznych objawów klinicznych wskazujących na infekcję, może nastąpić reaktywacja zakażenia wskutek działania bodźców stresogennych [12, 27, 68].

Na poziomie komórkowym, wirus początkowo ulega adsorbcji dzięki interakcjom pomiędzy glikoproteinami C i B a siarczanem heparanu [53]. Aby cały proces mógł dojść do skutku, niezbędne jest połączenie się glikoproteiny D z cząsteczką MHC klasy I, będącą swoistym receptorem dla gD, która znajduje się na błonie komórkowej komórek gospodarza [37]. Po zapoczątkowaniu adsorbcji, EHV-1 ma zdolność wnikania zarówno poprzez fuzję cząsteczek wirusowych z błoną komórkową jak i drogą endocytozy. Następnie doprowadzając do acetylacji tubuliny, wirus powoduje stabilizację mikrotubul i korzystając z dyneiny transportowany jest do jądra komórkowego. Należy podkreślić, że przemieszczanie się cząstek wirusowych jest uzależnione od aktywowania serynowo/treoninowej kinazy ROCK1 [23].

W odpowiedzi na kontakt cząstek EHV-1 z błoną komórek nabłonka górnych dróg oddechowych dochodzi do zwiększonej ekspresji receptorów błonowych Toll-like 3 i 9 (TLR3 i TLR9), a także cytokin zapalnych

(IL-1, TNF- α , IFN- α , IL-6) i chemokin (IL-8, MCP-1). Ponadto, jako efekt zakażenia obserwuje się znaczące zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I i II oraz spadek wytwarzania interferonu gamma (IFN- γ) [32]. Warto dodać, że decydujące znaczenie w regulowaniu wrodzonej odporności przeciwko zakażeniu EHV-1 ze strony komórek wyścielających górne drogi oddechowe odgrywa gen ORF1 [33].

Naturalną bramą wejścia dla szczepów neuropatogennych jak i nieneuropatogennych jest błona śluzowa górnych dróg oddechowych, gdzie wskutek fuzji cząsteczek wirusowych z błoną komórek nabłonka jednowarstwowego wielorzędownego, a następnie replikacji wirusa dochodzi do ich destrukcji. Zwiększa to ryzyko zakażeń oportunistycznych wywołanych przez inne patogeny górnych dróg oddechowych [38, 42]. Następnie, EHV-1 nie uszkodzając błony podstawnej komórek nabłonkowych, przedostaje się głównie za pomocą komórek CD172a⁺ (uważanych za śluzowe komórki dendrytyczne) i limfocytów T CD5⁺ do lokalnych węzłów chłonnych [28]. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w patogenezie zakażenia istotną rolę "przeośników wirusa" pełnią leukocyty krwi obwodowej (limfocyty T CD8⁺, limfocyty B, monocyty i limfocyty T CD4⁺) [94].

W miarę postępowania zakażenia, EHV-1 wykorzystując zdolność tripeptydu RSD umiejscowionego w gD do wiązania z integrynami błony komórkowej leukocytów krwi obwodowej przenika do ich wnętrza drogą endocytozy [55]. Prowadzi to do powstania ogólnoustrojowej wirerii, której pojawienie się jest powiązane z drugim od momentu zakażenia wzrostem ciepłoty wewnętrznej. Zaistniała sytuacja ma najczęściej miejsce między czwartym a dziesiątym dniem trwania zakażenia [34]. Charakterystyczną cechą infekcji szczepami o potencjale neuropatogennym jest dłuższy czas trwania wirerii i jej znacznie większa skala w porównaniu do zakażenia wirusami o wariacie nieneuropatogennym [4, 52]. Wykazano również, że po przedostaniu się do leukocytów, EHV-1 indukuje znaczny wzrost poziomu ekspresji chemokin: CCL5, CXCL9 i CXCL10 a także spadek ekspresji chemokiny CCL2 oraz CCL3 [95]. W trakcie trwania wirerii, wirus może przedostać się drogą fuzji do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych ciężarnej macicy klaczy oraz do centralnego układu nerwowego, prowadząc do ostrego zapalenia naczyń krwionośnych i rozległej zakrzepicy, czego efektem jest poronienie i herpeswirusowa mieloencefalopatia [22, 71].

8. Zakażenia układu oddechowego

Niepowikłane przypadki zakażeń EHV-1 charakteryzują się ostrym zapaleniem jamy nosowej i gardła z ewentualnym rozprzestrzenieniem się zakażenia

w rejon dolnych dróg oddechowych (zapalenie tchawicy i oskrzeli, zapalenie oskrzelików). Ponadto u koni chorych występuje obfity surowiczy wypływ z nozdrzy, który w miarę nasilenia się procesu zapalnego staje się śluzowo-ropny. Objawami towarzyszącymi są gorączka (38,9–41,1°C), ogólne osłabienie oraz obrzęk węzłów chłonnych podżuchwowych [5, 26, 86]. Objawy kliniczne ze strony układu oddechowego z reguły ustępują po około dwóch tygodniach [67], jednakże przez cały ten okres ma miejsce siewstwo EHV-1 wraz z wydzielinami z górnych dróg oddechowych [26].

9. Poronienia

EHV-1 jest uznawany za jeden z najczęstszych czynników zakaźnych powodujących poronienia u klaczy [70]. W większości przypadków do poronienia dochodzi w III trymestrze ciąży (7–11 miesiąc) u jednej – dwóch klaczy w stadzie, jednakże niekiedy wskaźnik ten może osiągać wartość 50% [5, 86]. Wydalenie płodu może nastąpić w okresie od szóstego dnia [27] do czwartego miesiąca od momentu zakażenia [47]. U ciężarnych klaczy, często nie stwierdza się objawów zwiastunowych świadczących o zbliżającym się poronieniu, natomiast niekiedy obserwowane są słabo wyrażone objawy chorobowe ze strony górnych dróg oddechowych [69]. Płody nie wykazują cech autolizy, w odróżnieniu od przypadków w których poronienie nastąpiło przed 6 miesiącem ciąży. Natomiast w większości przypadków można u nich stwierdzić zmiany anatomopatologiczne, sugerujące zakażenie na tle EHV-1 [5]. U klaczy nie obserwuje się zmian w układzie rozrodczym mających negatywny wpływ na ich przydatność do rozrodu [66].

10. Zakażenia nowo narodzonych źrebiąt

Infekcja płodu może nastąpić w okresie tuż przed porodem. W takich przypadkach, źrebięta rodzą się apatyczne i osłabione z objawami ostrej niewydolności układu oddechowego. Bardzo często dochodzi do wtórnych zakażeń bakteryjnych, co znacznie pogarsza rokowanie. U zakażonych źrebiąt, pomimo szybko podjętej interwencji lekarsko-weterynaryjnej, dochodzi do zejścia śmiertelnego w okresie od kilku do kilkunastu dni [48, 59].

11. Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego

Zespół objawów chorobowych wywołanych przez EHV-1, które swoim zasięgiem obejmują centralny układ nerwowy, nosi nazwę herpeswirusowej mieloencefalopatii. Mogą one występować zarówno u pojedyn-

czych osobników jak również u grupy koni w danym stadzie. Objawy nerwowe pojawiają się nagle i najczęściej są poprzedzone podwyższeniem temperatury wewnętrznej. W większości przypadków klinicznych, odstęp pomiędzy pierwszym pojawieniem się gorączki, a rozwojem objawów neurologicznych trwa od 6 do 10 dni [30, 87, 90]. Natomiast ich rodzaj i nasilenie zależą od lokalizacji oraz rozmiaru uszkodzeń centralnego układu nerwowego. Szczególnie narażone na infekcję są odcinki: piersiowy, lędźwiowy, krzyżowy i ogonowy rdzenia kręgowego. Wśród zaburzeń neurologicznych obserwuje się okresową ataksję, niedowład kończyn miednicznych oraz ich porażenia. Niekiedy porażenia mogą także obejmować kończyny piersiowe. U chorych koni może dochodzić do utraty napięcia mięśni ogona, odbytu i nietrzymania moczu. Rokowanie zależy od postaci choroby. W przypadkach o ciężkim przebiegu, kiedy pomimo intensywnego leczenia konie zalegają dłużej niż 2 dni jest ono nieopomyślne [43, 87].

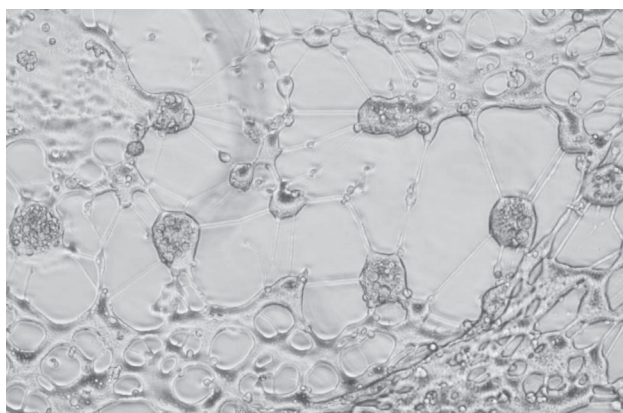
12. Zakażenia u innych gatunków zwierząt

EHV-1 posiada zdolność pokonywania bariery międzygatunkowej, co potwierdzają przypadki zakażeń jakie miały miejsce na terenie ogrodów zoologicznych w Niemczech. Obecność sekwencji DNA charakterystycznych dla EHV-1 stwierdzono w próbkach narządów wewnętrznych pochodzących od niedźwiedzi czarnych, u których rozwinęły się ostre objawy neurologiczne będące przyczyną zejścia śmiertelnego; gazeli Thomsona, także dotkniętych zaburzeniami neurologicznymi i świnek morskich, u których oprócz postaci nerwowej, dodatkowo występowały poronienia [96]. Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego na tle EHV-1, zostało również potwierdzone u nosorożca indyjskiego [1]. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zakażenia wywołane przez herpeswirus koni typu 1 u tych grup zwierząt nie były wcześniej notowane.

13. Diagnostyka laboratoryjna

Zakażenie EHV-1 można stwierdzić zarówno bezpośrednio: drogą wykrycia zjadliwego wirusa w teście izolacji lub jego materiału genetycznego (test PCR i real-time PCR) w narządach wewnętrznych i płynach ustrojowych, a także pośrednio: poprzez wykrycie specyficznych przeciwciał w teście seroneutralizacji, teście immunoenzymatycznym (ELISA), odczynie wiązania dopełniacza oraz od niedawna przy użyciu odczynu immunodiffuzji w żelu agarozowym (AGID) [25, 97].

Pomimo coraz częstszego zastosowania technik biologii molekularnej – za złoty standard uznaje się test izolacji wirusa przy użyciu hodowli komórkowej.



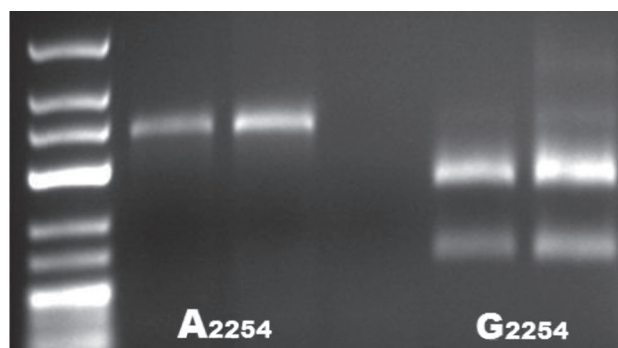
Rys. 1. Efekt cytopatyczny EHV-1 w hodowli komórkowej RK-13 (materiały własne)

Materiałem biologicznym, w którym można wykryć obecność EHV-1 są: wymazy z nozdrzy, popłuczyny z drzewa oskrzelowego, narządy wewnętrzne poronionych płodów końskich (płuca, wątroba, śledziona), leukocyty krwi obwodowej, czy też tkanki pochodzące z centralnego układu nerwowego. W diagnostyce znalazły zastosowanie przede wszystkim linie komórkowe ciągłe: *rabbit kidney-13* (RK-13), *equine dermis* (ED), *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK), *baby hamster kidney-21* (BHK-21), a także *pig kidney-15* (PK-15) [97] (rys. 1).

Metodami, które ze względu na swoją wysoką czułość, specyficzność i szybkość wykonania usprawniły diagnostykę zakażeń na tle EHV-1 są test PCR i real time-PCR. Pozwalają one na różnicowanie zakażeń EHV-1 i EHV-4 [15, 36]. W rutynowej diagnostyce zakażeń, oprócz wysoce konserwatywnego genu ORF33, kodującego glikoproteinę B – nieco mniejsze zastosowanie znalazły startery amplifikujące fragmenty genów takich jak ORF16 (glikoproteina C) oraz ORF72 (glikoproteina D).

Największy współczynnik zmienności genetycznej w genomie EHV-1 posiada gen ORF68. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest obecność pojedynczych substytucji we fragmencie liczącym około 600 nukleotydów. Badania dotyczące polimorfizmu wyżej wspomnianego fragmentu genu pozwoliły na wyodrębnienie pod względem pochodzenia geograficznego – początkowo sześciu, a następnie dziesięciu grup izolatów EHV-1 [52, 39]. Warto dodać, że w jednej z publikacji wyszczególniono dwa izolaty, w przypadku których lokalizacja mutacji uniemożliwia ich sklasyfikowanie do opisanych grup geograficznych, tym samym wskazując na jeszcze większe zróżnicowanie terytorialne szczepów EHV-1 [52].

Kolejną metodą stosowaną w praktyce laboratoryjnej jest analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Dzięki niej istnieje możliwość różnicowania zakażeń wywołanych wariantami



Rys. 2. Wynik testu PCR-RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Sall* (materiały własne)

tem neuropatogennym EHV-1 (G_{2254}) i nie-neuropatogennym (A_{2254}). Metoda RFLP wykorzystuje enzym *Sall* do analizy ampliconu genu ORF30 o wielkości 380 par zasad. W przypadku infekcji wywołanej typem G_{2254} następuje restrykcja ampliconu, czego efektem jest powstanie dwóch produktów o mniejszej wielkości podczas gdy amplicon genotypu A_{2254} nie ulega trawieniu enzymem restrykcyjnym (rys. 2). Inną metodą pozwalającą na różnicowanie zakażeń między poszczególnymi wariantami EHV-1 jest test real-time PCR, gdzie typy wirusa są wykrywane i identyfikowane za pomocą dwóch specyficznych sond molekularnych [2, 72].

W celu wykrycia obecności przeciwciał EHV-1 w surowicy koni, powszechnie stosuje się test seroneutralizacji oraz test immunoenzymatyczny ELISA, którego dodatkową zaletą jest możliwość zróżnicowania przeciwciał powstałych wskutek infekcji wywołanej przez blisko spokrewniony EHV-4. Duże znaczenie w diagnostyce serologicznej ma badanie par surowic, które pobiera się w trakcie trwania fazy ostrej zakażenia i następnie 3–4 tygodnie później t.j. z okresu rekonwalescencji. Co najmniej 4-krotny wzrost miana przeciwciał będzie wskazywał na zakażenie EHV-1 [97]. W praktyce, badanie takie może być przydatne w trakcie monitorowania całego stada wolnego od EHV-1, lub po kontakcie z wirusem. Badanie serologiczne ma jednak ograniczone zastosowanie u klaczy, które poroniły i u osobników z EHM. Dzieje się tak dlatego, że podczas trwania tych epizodów, surowica zawiera już wysokie miano przeciwciał i kolejne jej pobranie w fazie rekonwalescencji nie wykaże znaczącego wzrostu [10].

14. Immunoprofilaktyka

Ze względu na powszechne występowanie wirusa w środowisku, a także na łatwość rozprzestrzeniania się zakażeń zarówno drogą horyzontalną jak i werty-

kalną nie jest możliwa pełna ochrona przed kontaktem z tym patogenem. W profilaktyce stosowane są szczepionki pierwszej generacji zawierające wirusy zabite (szczepionki inaktywowane) lub o osłabionej wirulencji (szczepionki żywe, atenuowane). Prowadzenie immunoprofilaktyki przeciwko zakażeniom EHV-1 przy użyciu wyżej wymienionych preparatów, pomimo indukowania przez nie stosunkowo wysokiego miana specyficznych przeciwciał nie prowadzi do całkowitego wyeliminowania siewstwa, nie zapobiega wirerii, która może prowadzić do poronienia a także EHM. Szczepionki inaktywowane słabo stymulują odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, wymagają częstych rewakcytacji i mogą przyczynić się do wystąpienia lokalnych odczynów zapalnych [45].

Stosowanie szczepionek żywych, atenuowanych powoduje, że po ich jednokrotnym użyciu odporność pojawia się szybciej i utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Jednak w przypadku ich zastosowania, istnieje ryzyko rewersji wirusa szczepionkowego do pełnej zjadliwości [45, 56].

W profilaktyce zakażeń na tle EHV-1, oprócz ograniczania siewstwa zarazka, niezwykle ważne jest zapobieganie powstawaniu wirerii i dlatego też kluczową rolę w procesie infekcji odgrywa odpowiedź typu komórkowego ze strony limfocytów T cytotoksycznych (Tc). Badania nad potencjalną słusnością tej hipotezy dowiodły, że limfocyty Tc występujące u koni wykazujących ekspresję haplotypu MHC I-A3/B2 (ELA-A3/B2) wykrywają komponenty bezpośrednio wczesnego transkryptu (Immediate Early) EHV-1, który jako pierwszy ulega ekspresji w cyklu replikacyjnym wirusa [75, 74]. Mając na uwadze ten istotny fakt, udowodniono że u tej grupy koni, immunizacja szczepionką wektorową zawierającą gen ORF64, kodujący wyżej wymieniony transkrypt (IE) EHV-1 spowodowała znaczące obniżenie poziomu wirerii [74].

Należy podkreślić, że opracowanie złożonych szczepionek wektorowych w przypadku których, obiecującymi kandydatami oprócz genu IE mogłyby także być geny kodujące poszczególne glikoproteiny. Szczepionki takie stymulując indukcję zarówno silnej odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej mogłyby przyczynić się do eliminacji siewstwa EHV-1, ograniczenia zainfekowanych leukocytów, a także do zapobiegania poronieniom u klaczy i występowania przypadków mieloencefalopatii.

Dla potrzeb immunoprofilaktyki zakażeń EHV-1 opracowano również szczepionki tzw. drugiej generacji, jednakże w chwili obecnej pozostają w sferze badań i nie są dostępne komercyjnie. W tej grupie szczepionek znajdują się oprócz wyżej wymienionych szczepionek wektorowych także szczepionki delecyjne i szczepionki DNA [41, 46, 64].

15. Podsumowanie

Wzrost zainteresowania zakażeniami wywołanymi przez herpeswirus koni typu 1 nastąpił w pierwszej połowie XX wieku co miało ścisły związek z częstymi przypadkami masowych poronień u klaczy rejestrowanych w Stanach Zjednoczonych, jak i pozostałych częściach świata. Infekcje u koni, stosunkowo często ograniczające się do zapalenia górnych dróg oddechowych mogą mieć znacznie poważniejsze następstwa, do których zalicza się: poronienia, śmierć nowonarodzonych źrebiąt oraz zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego. Zakażenia na tle EHV-1, nierzadko o ciężkim przebiegu kończącym się zejściem śmiertelnym mogą wystąpić u innych gatunków zwierząt niż konie.

Diagnostyka laboratoryjna oparta jest zazwyczaj na izolacji wirusa przy użyciu hodowli komórkowych, stwierdzeniu obecności przeciwciał w teście seroneutralizacji lub immunoenzymatycznym ELISA. Ponadto do wykrywania zakażenia na tle EHV-1 stosuje się testy PCR i real-time PCR.

Prowadzenie regularnych szczepień za pomocą preparatów komercyjnych nie jest w stanie wyeliminować siewstwa wirusa ani zapobiec wirerii, dlatego też celem zapewnienia możliwie jak największej ochrony przeciwko zakażeniom EHV-1 konieczne jest wdrożenie i przestrzeganie zasad bioasekuracji, dezynfekcja sprzętu i pomieszczeń.

Piśmiennictwo

1. Abdelgawad A., Azab W., Damiani A.M., Baumgartner K., Will H., Osterrieder N., Greenwood A.D.: Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Vet. Microbiol.* **169**, 102–106 (2014)
2. Allen G.P.: Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, 69–72 (2007)
3. Allen G.P.: Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet. Educ.* **177**, 136–142 (2002)
4. Allen G.P., Breathnach C.C.: Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* **38**, 252–257 (2006)
5. Allen G.P., Bryans J.T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* **2**, 78–144 (1986)
6. Andoh K., Hattori S., Mahmoud H.Y., Takasugi M., Shimoda H., Bannai H., Maeda K.: The haemagglutination activity of equine herpesvirus type 1 glycoprotein C. *Virus Res.* **195**, 172–176 (2015)
7. Azab W., Gramatica A., Herrmann A., Osterrieder N.: Binding of alphaherpesvirus glycoprotein H to surface $\alpha 4\beta 1$ -integrins activates calcium-signaling pathways and induces phosphatidylserine exposure on the plasma membrane. *mBio*, **6**, e01552–15 (2015)
8. Azab W., Lehmann M.J., Osterrieder N.: Glycoprotein H and $\alpha 4\beta 1$ integrins determine the entry pathway of alphaherpesviruses. *J. Virol.* **87**, 5937–5948 (2013)

9. Baker T.S., Newcomb W.W., Booy F.P., Brown J.C., Steven A.C.: Three-dimensional structures of maturable and abortive capsids of equine herpesvirus 1 from cryoelectron microscopy. *J. Virol.* **64**, 563–573 (1990)
10. Balasuriya U.B.R., Crossley B.M., Timoney P.J.: A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of equid herpesvirus 1 in clinical samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* **27**, 673–687 (2015)
11. Bryant N.A., Davis-Poynter N., Vanderplassen A., Alcami A.: Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* **22**, 833–846 (2003)
12. Chesters P.M., Allsop R., Purewal A., Edington N.: Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J. Virol.* **71**, 3437–3443 (1997)
13. Csellner H., Walker C., Wellington J.E., McLure L.E., Love D.N., Whalley J.M.: EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch. Virol.* **145**, 2371–2385 (2000)
14. Damiani A.M., de Vries M., Reimers G., Winkler S., Osterrieder N.: A severe equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion outbreak caused by a neuropathogenic strain at a breeding farm in northern Germany. *Vet. Microbiol.* **172**, 555–562 (2014)
15. Diallo I.S., Hewitson G., Wright L.L., Kelly M.A., Rodwell B.J., Corney B.G.: Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.* **123**, 93–103 (2007)
16. Dimock W.W., Edwards P.R.: Is there a filterable virus of abortion in mares. *Bulletin: Kentucky Agriculture Experiment Station*, **333**, 291–301 (1933)
17. Doll E.R., Bryans J.T., McCollum W.H.: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* **47**, 3–41 (1957)
18. Doll E.R., McCollum W.H., Wallace M.E., Bryans J.T., Richards M.G.: Complement-fixation reactions in equine virus abortion. *Am. J. Vet. Res.* **14**, 40–45 (1953)
19. Doll E.R., Richards M.G., Wallace M.E.: Adaptation of the equine abortion virus to suckling Syrian hamsters. *Cornell Vet.* **43**, 551–558 (1953)
20. Doll E.R., Wallace M.E.: Cultivation of equine abortion and equine influenza viruses on the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Cornell Vet.* **44**, 453–461 (1954)
21. Doll E.R., Wallace E., Richards M.G.: Thermal, hematological, and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. *Cornell Vet.* **44**, 181–190 (1954)
22. Edington N., Bridges C.G., Patel J.R.: Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch. Virol.* **90**, 111–124 (1986)
23. Frampton A.R., Uchida H., Von Einem J., Goins W.F., Grandi P., Cohen J.B., Glorioso J.C.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) utilizes microtubules, dynein, and ROCK1 to productively infect cells. *Vet. Microbiol.* **141**, 12–21 (2010)
24. Fritsche A.K., Borchers K.: Detection of neuropathogenic strains of equid herpesvirus 1 (EHV1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.* **147**, 176–180 (2011)
25. Fuentealba N., Sguazza G., Scrochi M., Bravi M., Zanuzzi C., Corva S., Galosi C.: Production of equine herpesvirus 1 recombinant glycoprotein D and development of an agar gel immunodiffusion test for serological diagnosis. *J. Virol. Methods.* **202**, 15–18 (2014)
26. Gibson J.S., Slater J.D., Awan A.R., Field H.J.: Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch. Virol.* **123**, 351–366 (1992)
27. Gleeson L.J., Coggins L.: Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV1). *Cornell Vet.* **70**, 391–400 (1980)
28. Gryspeerdt A.C., Vandekerckhove A.P., Garré B., Barbé F., Van de Walle G.R., Nauwynck H.J.: Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Vet. Microbiol.* **142**, 242–253 (2010)
29. Hebia-Fellah I., Bruyas J.F. i wsp.: Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology*, **71**, 1381–1389 (2009)
30. Henninger R.W., Reed S.M., Saville W.J., Allen G.P., Hass G.F., Kohn C.W., Sofaly C.: Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 157–165 (2007)
31. Henry B.E., Robinson R.A., Dauenhauer S.A., Atherton S.S., Hayward G.S., O'Callaghan D. J.: Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology*, **115**, 97–114 (1981)
32. Hussey G.S., Ashton L.V., Quintana A.M., Lunn D.P., Goehring L.S., Annis K., Landolt G.: Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with equine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* **170**, 28–38 (2014)
33. Hussey G.S., Ashton L.V., Quintana A.M., Van de Walle G.R., Osterrieder N., Lunn D.P.: Equine herpesvirus type 1 pUL56 modulates innate responses of airway epithelial cells. *Virology*, **464**, 76–86 (2014)
34. Hussey S.B., Clark R., Lunn K.F., Breathnach C., Soboll G., Whalley J.M., Lunn D.P.: Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 335–342 (2006)
35. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Masters Species List 2014 v4, http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208.aspx (29.11.2015)
36. Kirisawa R., Endo A., Iwai H., Kawakami Y.: Detection and identification of equine herpesvirus-1 and-4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **36**, 57–67 (1993)
37. Kurtz B.M., Singletary L.B., Kelly S.D., Frampton A.R.: Equus caballus major histocompatibility complex class I is an entry receptor for equine herpesvirus type 1. *J. Virol.* **84**, 9027–9034 (2010)
38. Kydd J.H., Smith K.C., Hannant D., Livesay G.J., Mumford J.A.: Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet. J.* **26**, 466–469 (1994)
39. Malik P., Balint A., Dan A., Palfi V.: Molecular characterisation of the ORF68 region of equine herpesvirus-1 strains isolated from aborted fetuses in Hungary between 1977 and 2008. *Acta Vet. Hung.* **60**, 175–187 (2012)
40. Manninger R., Csontos J.: Virusabortus der Stuten. *Deutsche Tierärztlich Wochenschrift*, **49**, 105–111 (1941)
41. Matsumura T., Kondo T., Sugita S., Damiani A.M., O'Callaghan D.J., Imagawa H.: An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horses. *Virology*, **242**, 68–79 (1998)
42. McBrearty K.A., Murray A., Dunowska M.: A survey of respiratory viruses in New Zealand horses. *New Zeal. Vet J.* **61**, 254–261 (2013)
43. McCartan C.G., Russell M.M., Wood J.L., Mumford J.A.: Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet. Rec.* **136**, 7–12 (1995)

44. McCollum W.H., Doll E.R., Wilson J.C., Johnson C.B.: Isolation and propagation of equine rhinopneumonitis virus in primary monolayer kidney cell cultures of domestic animals. *Cornell Vet.* **52**, 164–173 (1962)
45. Minke J.M., Audonnet J.C., Fisher L.: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* **35**, 425–443 (2004)
46. Minke J.M., Fischer L., Baudu P., Guigal P.M., Sindle T., Mumford J.A., Audonnet J.C.: Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Vet. Immun. Immunopathol.* **111**, 47–57 (2006)
47. Mumford J.A., Rosedale P.D., Jessett D.M., Gann S.J., Ousey J., Cook R.F.: Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fertil. Sup.*, **35**, 509–518 (1986)
48. Murray M.J., Piero F., Jeffrey S.C., Davis M.S., Furr M.O., Dubovi E.J., Mayo J.A.: Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J. Vet. Intern. Med.* **12**, 36–41 (1998)
49. Neubauer A., Braun B., Brandmüller C., Kaaden O. R., Osterrieder N.: Analysis of the contributions of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology*, **227**, 281–294 (1997)
50. Neubauer A., Osterrieder N.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology*, **329**, 18–32 (2004)
51. Newcomb W.W., Brown J.C., Booy F.P., Steven A.C.: Nucleocapsid mass and capsomer protein stoichiometry in equine herpesvirus 1: scanning transmission electron microscopic study. *J. Virol.* **63**, 3777–3783 (1989)
52. Nugent J., Birch-Machin I., Smith K.C., Mumford J.A., Swann Z., Newton J. R., Davis-Poynter N.: Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.* **80**, 4047–4060 (2006)
53. Osterrieder N.: Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res.* **59**, 165–177 (1999)
54. Osterrieder N., Neubauer A., Brandmüller C., Braun B., Kaaden O.R., Baines J.D.: The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J. Virol.* **70**, 4110–4115 (1996)
55. Osterrieder N., Van de Walle G.R.: Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: the importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet. Microbiol.* **143**, 21–28 (2010)
56. Paillot R., Case R., Ross J., Newton R., Nugent J.: Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *Open Vet. Sci. J.* **2**, 68–91 (2008)
57. Pellett P.E., Roizman, B.: The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields virology*, **2**, 2479–2497 (2001)
58. Perdue M.L., Cohen J.C., Kemp M.C., Randall C.C., O'Callaghan D.J.: Characterization of three species of nucleocapsids of equine herpesvirus type-1 (EHV-1). *Virology*, **64**, 187–204 (1975)
59. Perkins G., Ainsworth D.M., Erb H.N., Piero F., Miller M., Wilkins P.A., Frazer M.: Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal Equine herpesvirus-1 infection compared with septic and premature foals. *Equine Vet. J.* **31**, 422–426 (1999)
60. Perkins G.A., Goodman L.B., Tsujimura K., Van de Walle G.R., Kim S.G., Dubovi E.J., Osterrieder N.: Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 3-year retrospective analysis (1984–2007). *Vet. Microbiol.* **139**, 375–378 (2009)
61. Pronost S., Cook R.F., Fortier G., Timoney P.J., Balasuriya U.B.R.: Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Vet. J.* **42**, 672–674 (2010)
62. Rudolph J., Osterrieder N.: Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology*, **293**, 356–367 (2002)
63. Rudolph J., Seyboldt C., Granzow H., Osterrieder N.: The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J. Virol.* **76**, 2952–2963 (2002)
64. Ruitenbergh K.M., Walker C., Wellington J.E., Love D.N., Whalley J.M.: DNA – mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine*, **17**, 237–244 (1999)
65. Sabine M., Robertson G.R., Whalley J.M.: Differentiation of sub-types of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. *Aust. Vet. J.* **57**, 148–149 (1981)
66. Schulman M.L., Kass P.H., Becker A., Van der Merwe B.: A predictive model for reproductive performance following abortion in Thoroughbred mares. *Vet. Rec.* **172**, doi: 10.1136/vr.100670 (2013)
67. Slater J.: Equine herpesviruses. *Equine Infectious Diseases. St. Louis: Saunders Elsevier*, 134–152 (2007)
68. Slater J.D., Borchers K., Thackray A.M., Field H.J.: The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* **75**, 2007–2016 (1994)
69. Smith K.C.: Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* **153**, 253–268 (1997)
70. Smith K.C., Blunden A.S., Whitwell K.E., Dunn K.A., Wales A.D.: A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet. J.* **35**, 496–501 (2003)
71. Smith K.C., Borchers K.: A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* **125**, 304–310 (2001)
72. Smith K.L., Li Y., Breheny P., Cook R.F., Henney P.J., Sells S., Balasuriya U.B.: New real-time PCR assay using allelic discrimination for detection and differentiation of equine herpesvirus-1 strains with A2254 and G2254 polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1981–1988 (2012)
73. Snowden B.W., Kinchington P.R., Powell K.L., Halliburton I.W.: Antigenic and biochemical analysis of gB of herpes simplex virus type 1 and type 2 and of cross-reacting glycoproteins induced by bovine mammillitis virus and equine herpesvirus type 1. *J. Gen. Virol.* **66**, 231–247 (1985)
74. Soboll G., Breathnach C.C., Kydd J.H., Hussey S.B., Mealey R.M., Lunn D.P.: Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Vet. Immun. Immunopathol.* **135**, 108–117 (2010)
75. Soboll G., Whalley J.M., Koen M.T., Allen G.P., Fraser D.G., Macklin M.D., Lunn D.P.: Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **84**, 2625–2634 (2003)
76. Stasiak K., Rola J., Ploszay G., Socha W., Zmudzinski J.F.: Detection of the neuropathogenic variant of equine herpesvirus 1 associated with abortions in mares in Poland. *BMC Vet. Res.* **11**, doi:10.1186/s12917-015-0416-7 (2015)
77. Stokes A., Alber D.G., Greensill J., Amellal B., Carvalho R., Taylor L.A., Meredith D.M.: The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* **40**, 91–107 (1996)
78. Studdert M.J., Simpson T., Roizman B.: Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, **214**, 562–564 (1981)

79. Sun Y., MacLean A.R., Aitken J.D., Brown S.M.: The role of the gene 71 product in the life cycle of equine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* **77**, 493–500 (1996)
80. Telford E.A., Watson M.S., McBride K., Davison A.J.: The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316 (1992)
81. Tsujimura K., Oyama T., Katayama Y., Muranaka M., Bannai H., Nemoto M., Matsumura T.: Prevalence of equine herpesvirus type 1 strains of neuropathogenic genotype in a major breeding area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **73**, 1663–1667 (2011)
82. Turtinen L.W., Allen G.P., Darlington R.W., Bryans J.T.: Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 2099–2104 (1981)
83. Van de Walle G.R., May M.L., Sukhumavasi W., von Einem J., Osterrieder N.: Herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **179**, 4161–4169 (2007)
84. Van de Walle G.R., Peters S.T., Van der Ven B.C., O'Callaghan D.J., Osterrieder N.: Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by α V integrins and an RSD motif in glycoprotein D. *J. Virol.* **82**, 11859–11868 (2008)
85. Van de Walle G.R., Sakamoto K., Osterrieder N.: CCL3 and viral chemokine-binding protein gG modulate pulmonary inflammation and virus replication during equine herpesvirus 1 infection. *J. Virol.* **82**, 1714–1722 (2008)
86. Van Maanen C.: Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.* **24**, 57–78 (2002)
87. Van Maanen C.V., Oldruitenborgh-Oosterbaan M.S., Damen E.A., Derksen A.G.P. Neurological disease associated with EHV-1 infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* **33**, 191–196 (2001)
88. Vissani M.A., Becerra M.L., Perglione C.O., Tordoya M.S., Miño S., Barrandeguy M.: Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of equid herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **139**, 361–364 (2009)
89. Walter J., Balzer H.J., Seeh C., Fey K., Bleul U., Osterrieder N.: Venereal shedding of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions. *J. Vet. Intern. Med.* **26**, 1500–1504 (2012)
90. Walter J., Seeh C., Fey K., Bleul U., Osterrieder N.: Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Vet. Scand.* **55**, 19 (2013)
91. Wellington J.E., Lawrence G.L., Love D.N., Whalley J.M.: Expression and characterization of equine herpesvirus 1 glycoprotein D in mammalian cell lines. *Arch. Virol.* **141**, 1785–1793 (1996)
92. Wellington J.E., Love D.N., Whalley J.M.: Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Arch. Virol.* **141**, 167–175 (1996)
93. Whittaker G.R., Taylor L.A., Elton D.M., Giles L.E., Bonass W.A., Halliburton I.W., Meredith D.M.: Glycoprotein 60 of equine herpesvirus type 1 is a homologue of herpes simplex virus glycoprotein D and plays a major role in penetration of cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 801–809 (1992)
94. Wilsterman S., Soboll-Hussey G., Lunn D.P., Ashton L.V., Callan R.J., Hussey S.B., Goehring L.S.: Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet. Microbiol.* **149**, 40–47 (2011)
95. Wimer C.L., Damiani A., Osterrieder N., Wagner B.: Equine herpesvirus type-1 modulates CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, and CXCL10 chemokine expression. *Vet. Immun. Immunopathol.* **140**, 266–274 (2011)
96. Wohlsein P., Lehmbecker A., Spitzbarth I., Algermissen D., Baumgärtner W., Böer M., Grummer B.: Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Vet. Microbiol.* **149**, 456–460 (2011)
97. World Organization for animal Health (OIE), Chapter 2.5.9. Equine rhinopneumonitis(w) OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf (21.03.2016)