

# Występowanie grypy koni na świecie w aspekcie zmienności wirusa

MAŁGORZATA PURZYCKA, WOJCIECH ROŻEK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Purzycka M., Rożek W., Żmudziński J. F.  
**Global distribution of Equine Influenza**

Summary

The Equine Influenza virus is represented by two different serotypes: H7N7 (which was last isolated in 1980) and H3N8 (which circulates within the equine population throughout most of the world). H3N8 strains have diverged into two distinct evolutionary lineages: American and European. However, intercontinental exchanges of horses have prompted the transfer of American strains to other regions of the world, namely to UK and Scandinavia. Despite vaccination, Equine Influenza exists in an endemic form in many European countries. The genetic drift (the accumulation of point mutations) of gene coding for hemagglutinin is responsible for a decreased level of protection, or its lack following vaccination. Hemagglutinin (HA), the major surface of glycoprotein, has 5 antibody binding sites (A-E) and is incorporated into vaccines. The molecular basis for variations equine H3N8 viruses is defined by investigating the nucleotide and amino acid sequencing of the HA molecule. The results of the study suggest that the antigenic composition of equine influenza vaccines should be updated regularly.

**Keywords:** Equine Influenza, genetic drift, hemagglutinin

Jednym z głównych czynników etiologicznych wywołujących schorzenia układu oddechowego u koni jest wirus grypy. Choroba przebiega wśród objawów kaszlu, gorączki oraz ogólnego osłabienia. Wirus grypy koni należy do typu A i reprezentują go dwa serotypy: H7N7 (podtyp A1) oraz H3N8 (podtyp A2). Ostatnia izolacja wirusa H7N7 miała miejsce w 1980 r. w Jugosławii (30), natomiast wirus H3N8 krąży obecnie w populacji koni na całym świecie (4), z wyjątkiem Australii, Nowej Zelandii oraz Islandii (23).

## Ewolucyjne linie grypy koni

Wirus grypy koni H3N8 dzieli się na dwie linie ewolucyjne, a mianowicie: linię szczepów amerykańskich, reprezentowaną przez prototypowy szczep Mia/63 oraz linię szczepów europejskich ze szczepem Fon/79. Źródłem podziału jest lokalizacja geograficzna dwóch puli genowych wirusa grypy. Różnice między tymi dwiema liniami występują w genach kodujących: białka kompleksu polimerazy (PB1, PB2 i PA), hemagglutyninę (HA), neuraminidazę (NA) oraz białka NS. Ogromna liczba różnic w genach PB1, PB2 i PA jest najprawdopodobniej spowodowana reasortacją genetyczną (11). Homologia pomiędzy genami HA Mia/63 oraz Fon/79 osiąga 96%, co pociąga za sobą 25 różnic aminokwasowych (6). Antygen NA wydaje się wyjątkowo stabilną strukturą (12), jednak dowiedziono istnienia różnych jego wariantów (1). Dowo-

dem na istnienie odmiennych form antygeny NA wirusa grypy pomiędzy szczepami H3N8 są badania elektroforetyczne (1). Na ich podstawie szacuje się, że różnice między szczepami Mia/63 oraz Fon/79 osiąga liczbę 27 zmian na 1000 nukleotydów (6).

Ewolucja wirusa grypy może być wynikiem mutacji punktowych, reasortacji genetycznej, wpływu cząstek defektywno-interferujących oraz rekombinacji RNA (24, 29). Największe znaczenie mają mutacje punktowe. Występują one często, powodują dryft antygenowy i są przyczyną nieskuteczności stosowanych szczepionek. Poprzez mutacje punktowe genu kodującego HA1 może zostać zmodyfikowane powinowactwo wirusa do receptorów komórkowych.

W celu określenia zmienności i pokrewieństwa izolatów grypy koni H3N8, stosuje się sekwencjonowanie genu hemagglutyniny (a dokładnie fragmentu odpowiedzialnego za syntezę domeny HA1) oraz analizę serologiczną, która przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych lub poliklonalnych wykazuje różnice w budowie antygenów.

## Epidemie

Wirus grypy koni może występować endemicznie albo wywoływać epidemie o dużym zasięgu geograficznym. Obecnie, epidemie grypy zazwyczaj występują poza Europą (26). Epidemie, których czynnikiem zakaźnym stanowił wirus grypy koni H7N7 (A1)

Tab. 1. Najgroźniejsze epidemie grypy koni na świecie

Występowanie	Rok	Typ wirusa
Singapur	1977	H7N7
Malezja	1977	H7N7
Wielka Brytania	1977	H7N7
Irlandia	1977	H7N7
Stany Zjednoczone	1963	H3N8
Europa Zachodnia	1965	H3N8
Afryka Południowa	1986	H3N8
Indie	1987	H3N8
Chiny	1989	H3N8
Hongkong	1992	H3N8

miały miejsce w Singapurze i Malezji oraz w Anglii i Irlandii w 1977 r. Pozostałe epidemie spowodowane były przez wirus o serotypie H3N8 (tab. 1).

Źródłem epidemii jest najczęściej import zainfekowanych koni. W przypadku wybuchu grypy w Afryce Południowej, wywołanego przez szczep Joh/86, chore konie pochodziły z Kentucky, USA (10). Epidemia w Indiach była spowodowana sprowadzeniem zakażonych koni z Francji. Współczynnik zachorowań wynosił 80%, a zejść śmiertelnych 1%. Badania izolatów występujących w Indiach, prowadzone przez Binnsa, dowiodły koegzystowania obok siebie dwóch różnych szczepów. Izolat Lud/87 przypominał szczep Fon/79, natomiast Bhi/87 był prawie identyczny z Mia/63. Zatem epidemia była wywołana szczepami z dwóch odrębnych linii, amerykańskiej oraz europejskiej (20). Bardzo specyficzna okazała się epidemia grypy w Chinach, która dotknęła aż 80% populacji koni, w tym 20% doprowadziła do zejścia śmiertelnego. Badania polegające na zsekwencjonowaniu genów HA, NP, NA, M i NS z użyciem sklonowanego cDNA oraz analiza genów PA, PB1, PB2 poprzez zsekwencjonowanie RNA dowiodły, że wyizolowany wirus grypy Jil/89 nie był spokrewniony z żadnym wcześniejszym szczepem końskim ani ludzkim H3, natomiast wykazywał bliskie pokrewieństwo z ptasiem wirusem grypy H3 (9, 20, 26). Szczep Jil/89 i szczepy mu pokrewne nie pojawiły się więcej w populacji koni, zatem nie było konieczności wprowadzania go jako antygeny do szczepionki (20). Epidemia w 1992 r. w Hongkongu spowodowała zachorowanie 37% populacji szczepionych koni. Wyizolowany szczep wykazał 99,4% homologii z izolatem Suf/89 (który występował na rozległych obszarach Europy). Różnice pomiędzy dwoma szczepami ograniczały się do 4 substytucji aminokwasowych w białku HA (14). Sporadyczne epidemie zanotowano w Kentucky w latach 1988-1992, w Filadelfii i na Florydzie w 1991 r. oraz kilka na Alasce.

W Europie konie w większości są szczepione przeciwko grypie, w związku z tym ma ona zazwyczaj łagodny przebieg. Taka sytuacja ma miejsce we Fran-

cji oraz w Niemczech, gdzie począwszy od 1979 r. prawie corocznie konie wykazują przemijające objawy grypy. We Włoszech nie stosowano profilaktycznych szczepień i w okresie 1979-1991 miało miejsce 5 epidemii. Szczególnie dotkliwa była epidemia w północnych regionach Włoch w 1991 r. W Skandynawii na przestrzeni 12 lat (1980-1992) 7-krotnie odnotowano zachorowania na grypę (20). Badania izolatów wirusa grypy w Szwecji z lat: 1993, 1994 i 1996 wykazały, że szczepy z 1993 r. są pokrewne z izolatem Tab/91 i należą do linii europejskiej, natomiast szczepy z lat 1994 i 1996 należą do linii amerykańskiej (22). Występowanie grypy miało zdecydowanie endemiczny charakter. Epidemie grypy na terenie Wielkiej Brytanii i Irlandii występują regularnie i dotyczą koni szczepionych. Większość szczepów izolowanych w Europie wykazuje podobieństwo do izolatu Fon/79, jednak szczepy pochodzące od Mia/63 były również zdiagnozowane m.in. w Szwajcarii w 1979 i 1990 r. oraz Wielkiej Brytanii w 1981 r. (20). Podczas epidemii grypy w szkole konnej w Holandii, w 1995 r., zakażonych zostało 11 koni. Dwa konie nie były wcześniej szczepione, jeden miał nieznaną status immunologiczny, natomiast pozostałe były kilkakrotnie poddawane immunizacji, a ostatnie szczepienie miało miejsce do 3 miesięcy przed zachorowaniem. Dwa szczepy wyizolowane podczas epidemii: H/1/95 i H/2/95 poddano analizie genetycznej i antygenowej. Szczepy te wykazały pokrewieństwo z izolatami Osg/92, Brl/91 oraz innymi izolatami europejskimi. Szczepionka zawierająca oczyszczone antygeny (hemaglutynina, neuraminidaza) izolatów A/eq/Prague/56 (H7N7), Mia/63 (H3N8) i Fon/79 z dodatkiem saponiny jako adjuwantu okazała się nieskuteczna (19). Badania prowadzone w krajach stosujących regularne szczepienia dowodzą, że obecne szczepionki łagodzą objawy choroby, ale jej nie zapobiegają (20).

### Charakterystyka hemaglutyniny

Hemaglutynina jest głównym białkiem powierzchniowym wirusa grypy. Stanowi ona 25% wszystkich białek wirionu. Znacząca rola tej glikoproteiny wynika z faktu, że przeciwciała skierowane przeciwko jej antygenom neutralizują infekcyjność wirusa (3). Gen hemaglutyniny ulega zjawisku dryftu genetycznego i izolowane w różnym okresie oraz miejscu szczepów wykazują zmienność. W związku z tym znajomość budowy antygenowej hemaglutyniny obecnie występujących szczepów ma zasadnicze znaczenie dla produkcji skutecznych szczepionek, chroniących konie przed grypią.

Hemaglutynina (HA) kodowana jest przez czwarty segment RNA genomu wirusa grypy. Gen hemaglutyniny stanowi 1762 nukleotydy z pojedynczą otwartą ramką odczytu na 1650 nukleotydów (7). Hemaglutynina jest syntetyzowana w postaci polipeptydu HA0. Podczas transportu do błony komórkowej jest

on cięty proteolitycznie i powstają dwa polipeptydy HA1 oraz HA2 (15, 25). Pierwotny polipeptyd zbudowany jest z 569 aminokwasów, w tym 15 aminokwasów stanowi peptyd sygnałowy, 329 aminokwasów to domena HA1 i 221 aminokwasów to domena HA2 (4).

Główną funkcją hemaglutyniny jest wiązanie się z odpowiednimi receptorami komórkowymi. Analiza antygenowa wirusów ptasiej oraz końskiej grypy izolowanych przed 1968 r. potwierdza bliskie pokrewieństwo szczepów A/duck/Ukraine/63 i A/equi/Miami/63 z izolatami H3 grypy ludzkiej z 1963 r. (2, 27). Na podstawie stwierdzonej analogii pomiędzy wirusami końskimi a ludzkimi H3, które wynikają zapewne z istnienia wspólnego przodka (6), można zakładać występowanie 5 miejsc antygenowych hemaglutyniny H3 wirusa grypy koni. Stanowią je powierzchniowe fragmenty domeny dystalnej HA i oznaczone są one jako A, B, C, D oraz E (31). Region A stanowi środkową część wystającej pętli i zawiera aminokwasy od pozycji 140 do 146. Miejsca 138, 139, 147 oraz 148 są niezmienną, konserwatywną podstawą całej struktury. Miejsce B stanowi najbardziej wysunięty na zewnątrz fragment pętli HA1. Zawiera aminokwasy w pozycjach od 155 do 160. Kolejne miejsce C jest usytuowane przy podstawie globularnej domeny na prostopadłej nici HA1. Antygenowe miejsce D znajduje się pomiędzy globularnymi domenami HA1 na szczycie trimery. Miejsce E jest zlokalizowane blisko podstawy dystalnej, globularnej domeny pomiędzy miejscami C i A. Antygenowe znaczenie wyżej opisanych pięciu miejsc A, B, C, D i E potwierdzają badania z użyciem monoklonalnych mysich przeciwciał, neutralizujących mutanty wirusa grypy H3. W obu przypadkach substytucje aminokwasowe występowały w tych samych miejscach (5, 16, 17, 21, 28). Badania krystalograficzne dwóch mutantów z substytucją w miejscach HA1 Gly 146 Asp i HA1 Asn 188 Asp potwierdziły znaczenie pięciu miejsc antygenowych w wiązaniu przeciwciał (13). Regionami wykazującymi największą zmienność są antygenowe miejsca A, B oraz D (8).

Badania oparte na sekwencjonowaniu genów kodujących HA, które pochodzą z różnych izolatów wirusa grypy wskazują, że fragmentem najbardziej narażonym na pojedyncze zmiany nukleotydowe, jest odcinek kodujący fragment pomiędzy pozycją 137 a 257 łańcucha aminokwasowego. Występuje ogólna tendencja nasilania się mutacji punktowych proporcjonalnie do długości okresu między kolejnymi izolacjami wirusa. Nie stanowi to jednak ścisłej reguły, gdyż czasami daje o sobie znać zjawisko tzw. „zamrożenia” określonego szczepu. Przykładem tego są szczepy BRA/87 i LPL/88 wyizolowane w Brazylii i Argentynie, które różniły się tylko pojedynczym nukleotydem od szcze-

Tab. 2. Wykaz skrótów szczepów H3 grypy koni cytowanych w niniejszym opracowaniu

Skrót	Pełna nazwa	Źródło	Kraj pochodzenia
Mia/63	Miami/1/63	Kawaoka i wsp. (1989)	USA
T/2/71	Tokyo/2/71	Kawaoka i wsp. (1989)	Japonia
T/3/71	Tokyo/3/71	Endo i wsp. (1992)	Japonia
Fon/79	Fontainebleau/79	Kawaoka i wsp. (1989)	Francja
Ken/81	Kentucky/1/81	Endo i wsp. (1992)	USA
Ten/86	Tennessee/5/86	Kawaoka i wsp. (1989)	USA
Joh/86	Johannesburg/86	Kawaoka i Webster (1989)	Rep. Południowej Afryki
Bhi/87	Bhiwani/87	Gupta i wsp. (1993)	Indie
Lud/87	Ludhiana/87	Gupta i wsp. (1993)	Indie
Bra/87	Brazil/87	Endo i wsp. (1992)	Brazylia
LP/88	La Plata/88	Endo i wsp. (1992)	Argentyna
Jil/89	Jilin/89	Guo i wsp. (1992)	Chiny
Suf/89	Suffolk/89	Binns i wsp. (1993)	Wielka Brytania
Sx/89	Sussex/89	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
Ell/89	Ella/89	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
Aru/91	Arundel/91	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
Brl/91	Borlänge/91	Oxburgh i wsp. (1993)	Szwecja
Tab/91	Täby/91	Oxburgh i wsp. (1993)	Szwecja
Lam/92	Lambourn/92	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
HK/92	Hong Kong/J/92	Lai i wsp. (1994)	Hongkong
Ken/92	Kentucky/92	Chabers i wsp. (1994)	USA
Osg/92	Osgodsby/92	van Maanen i wsp. (2003)	Wielka Brytania
N/1/93	Newmarket/1/93	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
N/2/93	Newmarket/2/93	Daly i wsp. (1996)	Wielka Brytania
Ken/94	Kentucky/94	Daly i wsp. (1996)	USA
H/1/95	Holland/1/95	van Maanen i wsp. (2003)	Holandia
H/2/95	Holland/2/95	van Maanen i wsp. (2003)	Holandia

pu T/3/71 wyizolowanego podczas epidemii grypy koni w Japonii (7).

### Analiza w oparciu o sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe

Metody serologiczne oraz analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych pozwalają na określenie drogi ewolucyjnej wirusa grypy koni. Faktem jest, że raz zmieniony aminokwas nie podlega kolejnym wymianom. Zmiany aminokwasów zaobserwowano na odcinkach odpowiadających antygenowym miejscom B (159, 189, 199) i D (172, 260), które zostały opisane również dla grypy ludzkiej H3 (31) oraz w pozycji 264 (nieдалеко miejsca D) i w pozycji 312. Lokalizację najliczniejszych zmian w miejscach antygenowych D i B potwierdzają wcześniejsze badania (6). Zjawisko nasilenia się zmian na danym obszarze można uzasadniać wpływem dużej presji selekcyjnej. Miejsce antygenowe B, które jest fragmen-

tem zmiennym, znajduje się na szczycie domeny HA1. Analogicznie w szczepie grypy ludzkiej H3, miejscem na wierzchołku HA1 jest fragment antygenowy A, który również ulega dużej presji selekcyjnej i liczne zmiany jego sekwencji aminokwasowej mają swoje odzwierciedlenie w badanych izolatach. Czasami ma miejsce rewersja do pierwotnej formy sekwencji aminokwasowej. Przykładem tego jest substytucja aminokwasu w szczepie Suf/89 w pozycji 244, spowodowana zmianą drugiego nukleotydu kodonu, która nie pojawiła się później, w izolatach wyosobnionych na terenie Wielkiej Brytanii, czego przykładem jest szczep Lam/92. Na podstawie sekwencji aminokwasów izolatów Ell/89 oraz Sx/89 wykazano jednak, że warianty szczepów, u których nie nastąpiła substytucja w pozycji 244, występowały w tym samym czasie, co izolat Suf/89.

Czasami dodatkową konsekwencją zmian występujących na skutek mutacji punktowych są nowo powstałe miejsca glikozylacji. Mogą one być przyczyną maskowania regionów antygenowych. Wszystkie badane izolaty wykazały obecność sześciu potencjalnych miejsc glikozylacji asparaginy w domenie HA w pozycjach: 8, 22, 38, 63, 165 i 285. Dodatkowe miejsce glikozylacji formowane jest dzięki substytucji seryny przez prolinę w pozycji 55, co miało miejsce w izolacie T/2/71 i Ten/85, a obecnie stało się udziałem wszystkich sekwencjonowanych izolatów z wyjątkiem Lud/87 (4).

Analiza ewolucji genu HA1 potwierdza istnienie dwóch głównych gałęzi rozwojowych, do których należą współczesne izolaty, a mianowicie gałęzi amerykańskiej oraz europejskiej. Do amerykańskiej linii szczepów zalicza się izolaty zachodniej półkuli (USA, Argentyna). Drugą gałąź reprezentują izolaty europejskie oraz szczep HK/92, który wystąpił w Hongkongu, co jest najprawdopodobniej wynikiem importu zakażonych koni z Wielkiej Brytanii lub Irlandii (14). Różnice między współczesnymi izolatami amerykańskimi oraz europejskimi ograniczają się zaledwie do kilku aminokwasowych substytucji w regionach antygenowych. Dane dotyczące liczby i tempa występowania zmian nukleotydowych i aminokwasowych, począwszy od szczepu Mia/63 i oparte na corocznych badaniach izolatów, wykazały występowanie 2,5 nukleotydowej substytucji, co odpowiada 0,8 aminokwasowej substytucji każdego roku.

Porównanie wyników sekwencjonowania oraz serologicznych analiz antygenów wskazuje, że kluczową rolę w determinowaniu różnic antygenowych między izolatami odgrywa nie liczba podstawień aminokwasowych, ale ich lokalizacja. Występowanie dodatkowej glikozylacji w pozycji 55 (antygenowy region C), która ma miejsce w szczepach izolowanych po 1987 r., może być źródłem ich antygenowej różnorodności w zestawieniu z wcześniejszymi izolatami. Surowice koni zakażanych szczepami wirusa grypy po 1987 r. nie hamują właściwości hemaglutynacyjnych szczepów takich, jak: Mia/63, Fon/79, Ken/81 (4).

Antygenowe różnice nie zawsze są bezpośrednio skorelowane ze zmianami sekwencji aminokwasowej domeny HA1. Szczepy z identycznym zapisem aminokwasowym domeny HA1 mogą różnić się antygenowo. Zjawisko to ma swoje przyczyny w potranslacyjnej modyfikacji HA1.

Drzewo filogenetyczne obrazujące drogę ewolucyjną wirusa grypy wykazuje wielorakość linii. Dwie oddzielne linie: amerykańska oraz europejska podlegają ciągłym zmianom (18). Zsekwencjonowanie genu HA1 szczepów N/1/93 oraz N/2/93 ujawniło molekularną podstawę antygenowych różnic obserwowanych pomiędzy tymi dwoma szczepami izolowanymi w tym samym czasie i w tej samej okolicy. Wyjaśnieniem egzystowania obok siebie genetycznie i antygenowo odmiennych szczepów, jest występowanie w populacji zwierząt więcej niż jednego szczepu przed wybuchem epidemii. Oba izolaty uaktywniły się prawdopodobnie w tym samym czasie. Izolat N/2/93 okazał się zarówno pod względem genetycznym, jak i antygenowym spokrewniony ze szczepami europejskimi, np. ze szczepem Lam/92. Natomiast szczep N/1/93 charakteryzował się kilkoma podstawieniami aminokwasowymi unikalnymi dla szczepów linii amerykańskiej, izolowanych w tym samym czasie. Szczep N/1/93 potwierdził swoje amerykańskie pochodzenie poprzez reaktywność w testach hamowania hemaglutynacji (HI) z surowicami fretek zakażonych wzorcowymi szczepami wirusa grypy. Okazało się że, źródłem epidemii były konie importowane do Newmarket (Wielka Brytania) ze Stanów Zjednoczonych na początku listopada 1993 r. Również szczep Aru/91 izolowany w Wielkiej Brytanii posiadał sekwencję aminokwasową HA1 wskazującą na pokrewieństwo z izolatami Ken/92 (18). Podobna sytuacja miała miejsce w Szwecji. Przeprowadzono analizę szczepów wirusa grypy koni izolowanych podczas epidemii w przedziale czasowym czterech lat. Wykorzystano przeciwciała monoklonalne oraz przeprowadzono sekwencjonowanie genu HA. Wykazano, że izolaty z 1993 r. były blisko spokrewnione ze szczepami należącymi do linii europejskiej, natomiast izolaty z 1994 i 1996 r. zaliczono do linii amerykańskiej (22). Badania nad wirusami grypy koni H3N8 krążącymi w Szwecji, potwierdziły obecność szczepów zarówno linii amerykańskiej, jak i europejskiej oraz wykazały duże znaczenie zmiany aminokwasowej w pozycji 190 łańcucha aminokwasowego hemaglutyniny. Modyfikacje tego miejsca są przyczyną znaczącej różnicy w budowie antygenowej hemaglutyniny, ponieważ pozycja 190 jest zlokalizowana w centralnej części antygenowego regionu B. Stanowi ona dystalną część miejsca wiążącego receptor komórkowy wirusa grypy H3N2 i ma znaczenie tak w determinowaniu pokrewieństwa, jak również specyficzności wiązania się z receptorami komórkowymi (23). Brak skuteczności szczepionek wiąże się z częstymi zmianami aminokwasowymi w pozycji 190 HA.

Koegzystowanie na tym samym terenie heterogenicznych wirusów grypy koni H3N8, potwierdza konieczność użycia szczepionki chroniącej przed wirusami należącymi tak do linii amerykańskiej, jak i europejskiej. Jak dowodzą wyniki badań, wskazane jest regularne wprowadzanie do szczepionek nowych szczepów (20).

### Piśmiennictwo

1. *Abusugra I. A., Linné T., Klingeborn B., Dinter Z.*: Influenza equi 2: Patterns of RNA and protein in variant strains. *Zentbl. Vet. Med.* 1985, 32, 567-574.
2. *Coleman M. T., Dowdle W. R., Pereira H. G., Schild G. C., Chang W. K.*: The Hong Kong/68 influenza A2 variant, *Lancet* 1968, 2, 1384-1413.
3. *Dale B., Brown R., Miller J., White R. T., Air G. M., Cordell B.*: Nucleotide and deduced amino acid sequence of the influenza neuraminidase genes of two equine serotypes. *Virology* 1986, 155, 460-468.
4. *Daly J. M., Lai A. C. K., Binns M. M., Chambers T. M., Barrandegui M., Mumford J. A.*: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J. Gen. Vir.* 1996, 77, 661-671.
5. *Daniels R. S., Douglas A. R., Skehel J. J., Wiley D. C.*: Analyses of the antigenicity of influenza hemagglutinin at the pH optimum for virus-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 1983, 64, 1657-1661.
6. *Daniels R. S., Skehel J. J., Wiley D. C.*: Amino acid sequences of influenza viruses of the H3 subtype isolated from horses. *J. Gen. Virol.* 1985, 66, 457-464.
7. *Endo A., Pecoraro R., Sogita S., Nerome K.*: Evolutionary pattern of the H3 hemagglutinin of equine influenza viruses: multiple evolutionary lineages and frozen replication. *Arch. Virol.* 1992, 123, 73-87.
8. *Gorman O. T., Bean W. J., Kawaoka Y., Donatelli I., Guo Y. J., Webster R. G.*: Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J. Virol.* 1991, 65, 3704-3714.
9. *Guo Y., Wang M., Kawaoka Y., Gorman O., Ito T., Saito T., Webster R. G.*: Characterisation of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology* 1992, 188, 245-255.
10. *Guthrie A. J., Stevens K. B., Bosman P. P.*: The circumstances surrounding the outbreak and spread of equine influenza in South Africa. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1999, 18, 179-185.
11. *Hyashida H., Toh H., Kikuno R., Miyata T.*: Evolution of influenza virus genes. *Mol. Biol. Evol.* 1985, 2, 289-303.
12. *Hindshaw V. S., Naeye C. W., Webster R. G., Douglas A., Skehel J. J., Bryans J.*: Analysis of antigenic variation in equine 2 influenza A viruses. *Bull. WHO.* 1983, 61, 153-158.
13. *Knossow M., Daniels R. S., Douglas A. R., Skehel J. J., Wiley D. C.*: Three-dimensional structure of an antigenic mutant of the influenza virus hemagglutinin. *Nature* 1984, 311, 678-680.
14. *Lai A. C. K., Lin Y. P., Powell D. G., Shortridge K. F., Webster R. G., Daly J., Chambers T. M.*: Genetic and antigenetic analysis of the influenza virus responsible for the 1992 Hong Kong equine influenza epizootic. *Virology* 1994, 204, 673-679.
15. *Lamb R. A., Choppin P. W.*: Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology* 1976, 74, 504-519.
16. *Laver W. G., Air G. M., Webster R. G., Gerhard W., Ward C. W., Doppeide T. A.*: Antigenic drift in type A influenza virus: Sequence differences in the hemagglutinin of Hong Kong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Virology* 1979, 98, 226-237.
17. *Laver W. G., Air G. M., Webster R. G.*: Mechanism of antigenic drift in influenza virus. Amino and sequence changes in an antigenically active region of Hong Kong (H3N3) influenza virus hemagglutinin. *J. Mol. Biol.* 1981, 145, 339-361.
18. *Lindstrom S., Endo A., Pecoraro R., Sugita S., Hiromoto Y., Nerome K.*: Genetic divergence of equine (H3N8) influenza viruses: cocirculation of earliest and recent strains, [w:] *Proc. 7<sup>th</sup> Internat. Conf. Equine Infectious Diseases.* Tokyo 1994, s. 307.
19. *van Maanen C., van Essen G. J., Minke J., Daly J. M., Yates P. J.*: Diagnostic methods applied to analysis of an outbreak of equine influenza in a riding school in which vaccine failure occurred. *Vet. Microbiol.* 2003, 93, 291-306.
20. *Mumford J., Wood J.*: WHO/OIE Meeting: Consultation on Newly Emerging Strains of Equine Influenza. *Newmarket 1992, Vaccine* 1993, 11, 1172-1175.
21. *Newton S. E., Air G. M., Webster R. G., Laver W. G.*: Sequence of the hemagglutinin gene of influenza virus A/Memphis/1/71 and previously uncharacterized monoclonal antibody derived variants. *Virology* 1983, 128, 495-501.
22. *Oxburgh L., Åkerblom L., Friedberger T., Klingeborn B., Linné T.*: Identification of two antigenically and genetically distinct lineages of two H3N8 equine influenza virus in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 1998, 120, 61-70.
23. *Oxburgh L., Klingeborn B.*: Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 3005-3009.
24. *Shaw M. W., Arden N. H., Maassab H. F.*: New aspects of influenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992, 5, 74-92.
25. *Skehel J. J., Schild G. C.*: The polypeptide composition of influenza A viruses. *Virology* 1971, 44, 396-408.
26. *Timoney P. J.*: Equine influenza. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, 19, 205-211.
27. *Waddell G. H., Tiegland M. B., Sigel M. M.*: A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1963, 143, 587-590.
28. *Webster R. G., Brown L. E., Jackson D. C.*: Changes in the antigenicity of the hemagglutinin molecule of H3 influenza virus at acidic pH. *Virology* 1983, 126, 587-599.
29. *Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y.*: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992, 56, 152-179.
30. *Webster R. G.*: Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *E. Vet. J.* 1993, 25, 537-538.
31. *Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J.*: Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature (Lond.)* 1981, 289, 373-378.

Adres autora: mgr Małgorzata Purzycka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: malgorzata.purzycka@piwet.pulawy.pl

**WALTER I., HELMEREICH M., HANDLER J., AURICH C.: Zmineralizowane złoży w gruczołach macicznych u klaczy z przewlekłym zwyrodnieniem endometrium. (Mineralized deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration). Vet. Rec. 153, 708-710, 2003 (23)**

Przewlekłą zwyrodniającą chorobę endometrium klaczy charakteryzują zmiany w gruczołach macicy, takie jak: tworzenie cyst, hiperplazja i wokólnaczyniowe zwłóknienie. Biopsaty do badań pochodziły od klaczy w wieku od 7 do 23 lat z różnego stopnia zwyrodnieniem endometrium. Zwarte zmineralizowane złoży występowały w gruczołach śluzówki macicy. Większość z nich nie miała jednolitej struktury i była zbudowana z substancji organicznych i nieorganicznych. Zawierały one osteopontynę, osteonektynę i sialoproteiny kości. Osteopontyna i sialoproteina wewnątrz złoży tworzyły koncentryczne warstwy. Nie stwierdzono obecności osteokalcyny ani w skamieniałych strukturach wypełniających gruczoły śluzówki, ani w komórkach nabłonka gruczołów.

G.

**PUSTERLA N., PESAVENTO P. A., SMITH P., DURANDO M. M., MAGDESIAN K. G., WILSON D.: Idiopatyczne ziarniniakowate zapalenie płuc u 7 koni. (Idiopathic granulomatous pneumonia in seven horses). Vet. Rec. 153, 653-655, 2003 (21)**

Opisano objawy kliniczne i zmiany sekcyjne u 7 koni w wieku od 8 do 21 lat (średni wiek 17,7 lat) z pierwotnym idiopatycznym ziarniniakowatym zapaleniem płuc. Rozpoznanie choroby potwierdzono badaniem histopatologicznym. Na czoło objawów klinicznych wysuwało się postępujące chudnięcie, powysiłkowe męczenie i duszność, która nie ustępowała po stosowaniu konwencjonalnego leczenia, depresja, utrata łaknienia, przyspieszenie akcji serca i oddechów, głośny oddech. Badaniem radiograficznym klatki piersiowej stwierdzono śródmiąższowe zapalenie płuc. Za istnieniem chronicznego procesu zapalnego przemawiały badania hematologiczne, a w popłuczynie z oskrzeli występował materiał charakterystyczny dla krwotocznego zapalenia płuc. Antybiotykoterapia nie dała zadowalających wyników. U dwóch koni nie stwierdzono też poprawy po podaniu niesterydowych leków przeciwzapalnych.

G.