

Zróżnicowanie genetyczne szczepów EAV wśród trwale zakażonych ogierów w stadach ogierów w Polsce

MAGDALENA LARSKA, JERZY ROLA

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

Larska M., Rola J.

Genetic diversity of equine arteritis virus strains among permanently infected stallions in stallion depots in Poland

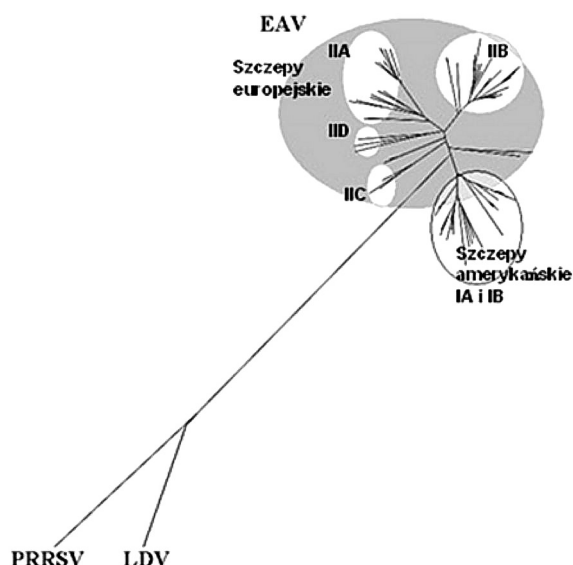
Summary

The purpose of the study was to analyse the genetic diversity of Polish EAV isolates. Genetic variability can lead to increased virulence of isolates and to significant changes in EAV antigen properties influencing the results of laboratory testing. Studies on genetic modifications of viral genomes as well as on the phylogenetic affinity of strains have facilitated the investigation of viral evolution. Phylogenetic analysis was performed on 32 isolates that were isolated from the semen of asymptomatic virus-shedding stallions originating from 8 national studs. These isolates were compared with 15 reference EAV strains commonly used in phylogenesis. On the basis of the nucleotide sequence analysis of ORF5 gene encoding GP5 glycoprotein it was shown that Polish EAV isolates belonged to two subgroups and demonstrated the closest relationship to the European strains. None of these strains had any relationship to the first Polish strain Wrocław-2 isolated in 1976. The homology of ORF5 nucleotide and predicted GP5 amino-acid sequences of Polish isolates attained a level of 81.2-99.0% and 90.1-99.4% respectively. Analyzing the genetic diversity of ORF5 facilitated the conducting of retrospective epizootic investigations.

Keywords: equine arteritis virus, ORF5

Wirusowe zapalenie tętnic koni (equine viral arteritis – EVA) jest zakaźną chorobą koniowatych, szeroko rozpowszechnioną na całym świecie. Najważniejszą konsekwencją zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni (equine arteritis virus – EAV) u koni jest występowanie zakażeń trwałych u ogierów i siewstwo wirusa z nasieniem, trwające niejednokrotnie do końca życia zwierzęcia (2). Ogierzy takie są rezerwuarem wirusa w populacji koni. Wirus utrzymuje się w dodatkowych gruczołach płciowych ogiera, a proces siewstwa zależy prawdopodobnie od poziomu testosteronu. EAV powoduje duże straty ekonomiczne w hodowli koni poprzez wywoływanie poronień, upadków nowo narodzonych źrebiąt, resorpcji zarodków i jałowienia klaczy. Straty związane są również z restrykcjami w obrocie międzynarodowym ogierami trwale zakażonymi EAV i ich nasieniem oraz z eliminacją ogierów jako reproduktorów z hodowli. EAV wraz z wirusem m.in. zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRSV) i wirusem podnoszącym poziom dehydrogenazy mleczanowej u myszy (LDV) należy do rodziny *Arteriviridae*, rzędu *Nidovirales* (5). Materiał genetyczny wirusa stanowi jednoniciowy RNA o dodatniej polarności. Genom wirusa ma długość około 12,7 tysięcy nukleotydów i zawiera 9 otwartych ramek odczytu

(ORF). Największą zmiennością w genomie EAV odznacza się gen ORF5 kodujący glikoproteinę GP5. Białko to odpowiedzialne jest za reakcję z przeciwciałami neutralizującymi, co ma znaczenie w przebiegu zakażenia, procesach immunologicznych, skuteczności szczepień i diagnostyce choroby (6). Sekwencja GP5 charakteryzuje się dużą zmiennością wśród szczepów terenowych i laboratoryjnych EAV. Na drodze selekcji i adaptacji kolejnych, odmiennych genotypowo i fenotypowo kopii wirusa może dojść do utraty zdolności układu immunologicznego ogiera do rozpoznawania nowych wariantów wirusa, czyli do tzw. ucieczki antygenowej (escape mutants) (8). Zmiany w sekwencji genu ORF5 kodującego białko GP5 są podstawą do analizy pokrewieństwa wirusów należących do rodziny *Arteriviridae* (ryc. 1). W 1995 r. na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej glikoproteiny GP5 izolaty terenowe i szczepy laboratoryjne zostały podzielone na 4 grupy filogenetyczne, w których dwie stanowiły wirusy północnoamerykańskie (NA1 i NA2), a dwie kolejne – szczepy europejskie (E1 i E2) (4). Stadejek i wsp. (16), analizując podobieństwo sekwencji nukleotydowej ORF5 z 65 różnych izolatów, uściślili wcześniejszą klasyfikację szczepów EAV. Grupę I stanowiły głównie szczepy po-



Ryc. 1. Schematyczne drzewo filogenetyczne obrazujące ewolucyjne pokrewieństwo 75 wybranych izolatów EAV oraz innych arteriowirusów skonstruowane na podstawie algorytmu najmniejszych kwadratów w programie FITCH z pakietu PHYLIP (9)

chodzące z Ameryki Północnej, grupę II z Europy. Dodatkowo w obrębie każdej z grup autorzy wyodrębnili podgrupy, dwie wśród szczepów amerykańskich (IA i IB) i trzy wśród europejskich (IIA, IIB i IIC). Stwierdzono również, że w przypadkach, gdy pochodzenie geograficzne nie miało związku z podobieństwem genetycznym izolatów, konie, od których wirus był izolowany, transportowane były pomiędzy Europą a Ameryką Północną i na odwrót. Ostatnio Mittelholzer i wsp. (15) na podstawie analizy zmienności w obrębie genu ORF5 dla 201 europejskich i amerykańskich szczepów EAV zaproponowali nowy podział (15). Autorzy zaobserwowali, że w drzewie filogenetycznym szczepów z dużym prawdopodobieństwem bootstrap tworzą się trzy odrębne genetycznie podgrupy, które oznaczono jako EAV-1, EAV-2 i EAV-3. Grupy EAV-1 i EAV-3 odpowiadały wcześniej opisanym podgrupom „typu europejskiego” IIA i IIB, natomiast szczepy poprzednio tworzące podgrupy IA i IB zaliczono do jednej wspólnej podgrupy EAV-2.

Analiza sekwencji aminokwasowej GP5 izolatów EAV pozwoliła na wyróżnienie 3 fragmentów o wysokiej zmienności (V1: 61-121 aa, V2: 141-178 aa, V3: 202-222 aa), 4 fragmentów konserwatywnych (C1-C4) znajdujących się między nimi oraz jednej przypuszczalnej sekwencji sygnałowej o długości 18 aa (S) (4). Na podstawie badań z przeciwciałami neutralizującymi w ektodomenie GP5 wyróżniono również cztery główne miejsca neutralizacji (3). Odpowiadają one aminokwasom w pozycjach 49 (A), 61 (B), 67-90 (C), 99-106 (D).

Pierwsze przypadki EVA w Polsce przebiegały w postaci poronień u ciężarnych klaczy i upadków nowo narodzonych źrebiąt (11). Z tkanek poronionych płodów

Tab. 1. Polskie szczepy EAV poddane analizie filogenetycznej

Lp.	Skrót zastosowany w drzewie filogenetycznym ¹	Rok izolacji	Dane ogiera			
			wiek ogiera	rasa ²	województwo	oznaczenie stada
1.	K1	2002	7	xo	lubel.	K
2.	K2	2002	3	xo	lubel.	K
3.	K3	2002	3	xo	lubel.	K
4.	K4	2002	4	xo	lubel.	K
5.	K5	2002	6	z	lubel.	K
6.	K6	2002	13	xo	lubel.	K
7.	K7	2002	13	x	lubel.	K
8.	K8	2002	5	xo	lubel.	K
9.	K9	2002	17	z	lubel.	K
10.	L1	2001	7	włkp	k-pom.	L
11.	L2	2001	3	śl	k-pom.	L
12.	L3	2001	–	włkp	k-pom.	L
13.	L4	2001	15	włkp	k-pom.	L
14.	L5	2001	10	z	k-pom.	L
15.	L6	2001	6	xo	k-pom.	L
16.	L7	2001	14	włkp	k-pom.	L
17.	L8	2001	13	włkp	k-pom.	L
18.	L9	2001	8	włkp	k-pom.	L
19.	N1	2002	10	z	w-m.	N
20.	N2	2002	13	włkp	w-m.	N
21.	N3	2002	16	włkp	w-m.	N
22.	P1	2000	9	oo	mał.	P
23.	P2	2001	10	śl	mał.	P
24.	P3	2001	8	xo	mał.	P
25.	P4	2002	5	xx	mał.	P
26.	R1	2004	11	KWPN	maz.	R
27.	R2	2005	11	KWPN	maz.	R
28.	S1	2001	6	włkp	z-pom.	S
29.	S2	2001	15	sp	z-pom.	S
30.	S3	2001	8	z	z-pom.	S
31.	X1	2003	7	włkp	włkpol.	X
32.	Z1	2003	5	z	pom.	Z

Objaśnienia: 1 – nr dostępu do GenBank: EF102356-EF102373, EF102376-EF102387, EF102390-EF102391; 2 – Rasy: xo – półkrew angloarabska (również małopolski), z – zimnokrwista, x – półkrew angielskiej, włkp – wielkopolska, śl – śląska, oo – czysta krew arabska, xx – pełna krew angielska, KWPN – holenderski koń gorącokrwisty, sp – szlachetna półkrew

i padłych źrebiąt wyizolowano pierwszy polski szczep EAV, Wrocław-2. W Polsce dotychczas nie wykonywano badań dotyczących zróżnicowania genetycznego wirusa zapalenia tętnic koni. Dlatego celem przeprowadzonych badań była charakterystyka molekularna polskich szczepów EAV wyizolowanych od ogierów w dużych stadach państwowych i analiza ich pokrewieństwa filogenetycznego ze szczepami zagranicznymi.

Materiał i metody

Polskie szczepy EAV. Do badań wykorzystano 32 szczepy EAV wyizolowane z nasienia klinicznie zdrowych ogierów pochodzących z 8 stad ogierów z różnych regionów Polski (tab. 1).

Szczepy referencyjne. W badaniach porównawczych wykorzystano sekwencje genu kodującego białko GP5 15 szczepów referencyjnych EAV pochodzących z GenBank NCBI.

Ekstrakcja wirusowego RNA i amplifikacja fragmentu ORF5. Całkowite RNA ekstrahowano z plazmy nasienia ogierów przy użyciu odczynnika TRI (Sigma) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Do odwrotnej transkrypcji wirusowego RNA i amplifikacji genu ORF5 użyto zaprojektowanych primerów: MLEAV1 (5'TCTTTTACGACTGGTACGTTGG 3') i MLEAV2 (5' AAAATCCCGTCACCACAAA3') oraz odczynników z jednoprobówkowego zestawu Access RT-PCR System (Promega). Reakcję przeprowadzono w opisanych poprzednio warunkach (14), jednak ze względu na zastosowanie nowych starterów, po optymalizacji RT-PCR temperatura ich przyłączania uległa zmianie do 50°C.

Sekwencjonowanie. Sekwencjonowanie wykonano techniką opartą na zmodyfikowanej metodzie Sangera, polegającej na terminacji syntezy kwasów nukleinowych poprzez przyłączenie dideoksynukleotydów znakowanych różnymi fluorochromami (dye terminator sequencing). Produkty amplifikacji fragmentów genu ORF5 poddawane były reakcji sekwencjonowania obu nici DNA przy użyciu zestawu BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) zgodnie z instrukcją producenta i oczyszczano z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Produkty analizowane były w 16-kapilarnym automacie ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analiza komputerowa sekwencji ORF5. Sekwencje sprawdzano przy pomocy programu SeqMan, pakietu Lasergene v. 7.0 (DNASTar, Inc.). Jako referencyjnych w analizie filogenetycznej użyto sekwencji genów ORF5 innych szczepów EAV wybranych z GenBank NCBI na podstawie homologii i biorąc pod uwagę dane literaturowe. Do analizy podobieństwa sekwencji DNA między szczepami wykorzystano metodę największego prawdopodobieństwa (ML – maximum likelihood) z programu DNAML z pakietu PHYLIP v. 3.6 (9). Analizę wiarygodności topologii drzewa filogenetycznego (bootstrap) przeprowadzono w liczbie 1000 powtórzeń przy użyciu programu Seqboot z pakietu PHYLIP. Wartość bootstrap $\geq 70\%$ przyjęto jako wiarygodną dla stworzenia podgrup. Przyjęty współczynnik transycja/transwersja wynosił 2,0. Do rysowania drzewa użyto programu PhyloDraw v. 0.8 (7). Analizę profilu antygenowego (antigenicity plot) wykonano w oparciu o algorytm Jamesona i Wolfa (13) w programie Protean z pakietu Lasergene.

Wyniki i omówienie

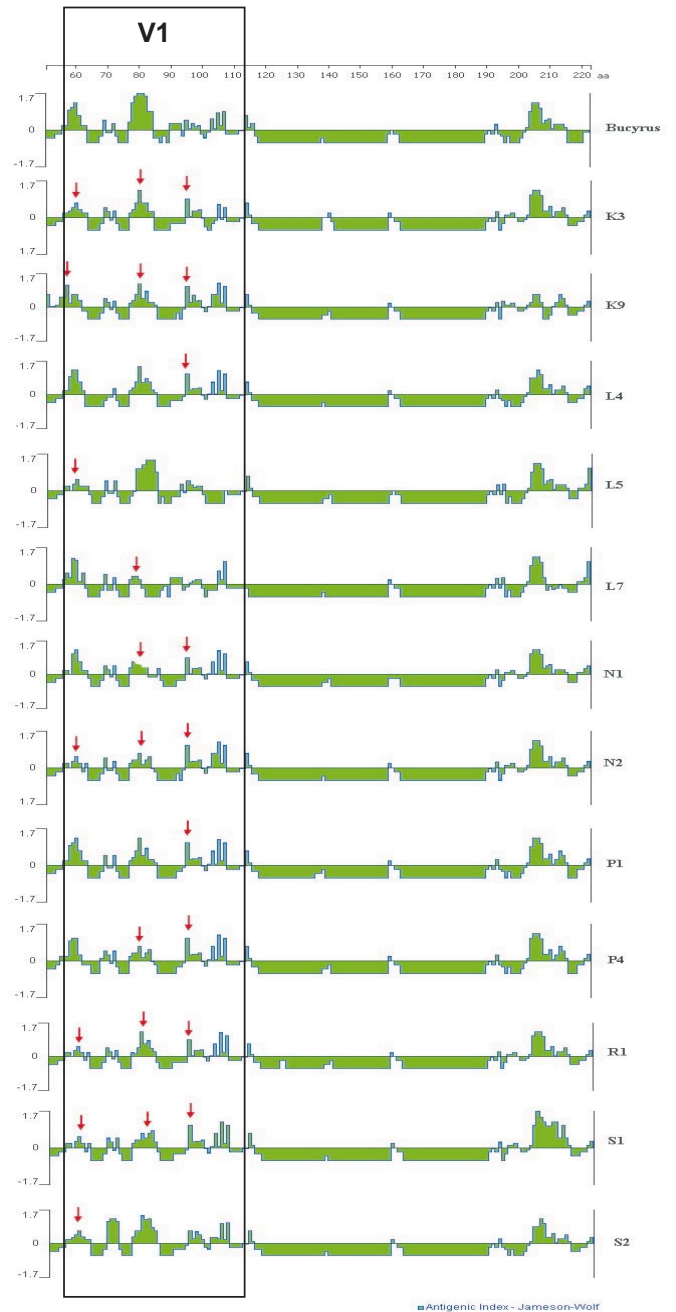
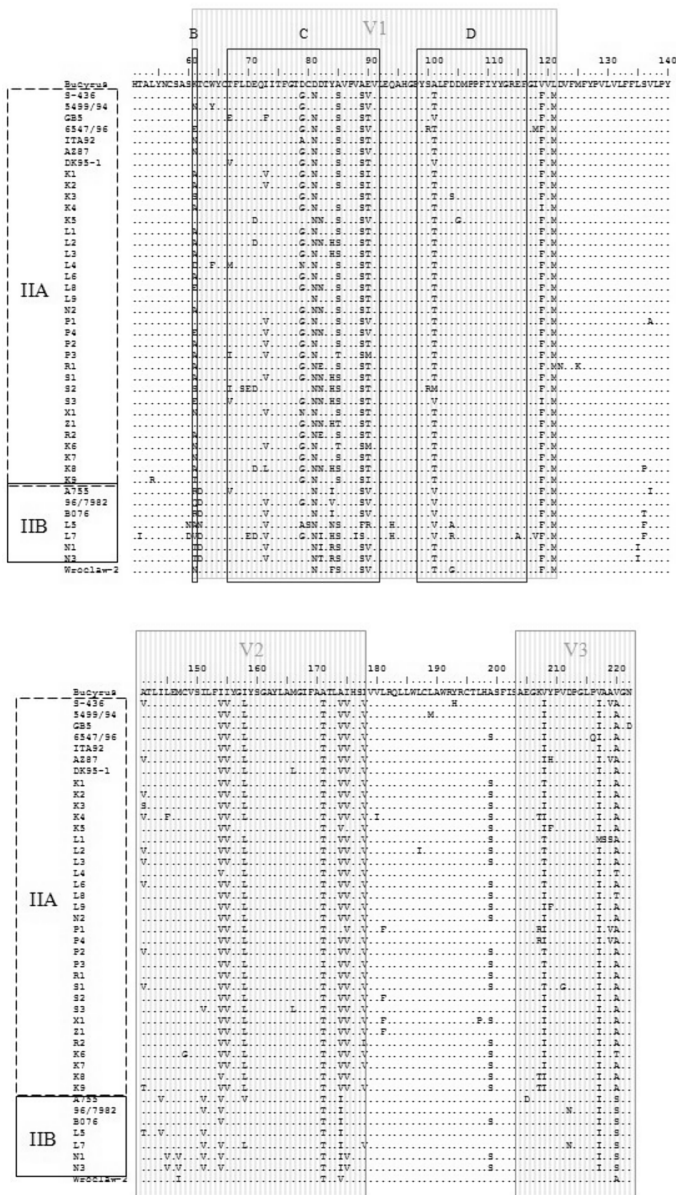
Wszystkie sekwencje nukleotydowe ORF5 badanych izolatów, podobnie jak i szczepów referencyjnych zawierały 768 nukleotydów, którym odpowiadało 255 aminokwasów. Ponieważ wiele z homologicznych sekwencji ORF5 wybranych z GeneBank zawierało fragment 519 nukleotydów (od 151 do 670), dlatego do określenia podobieństwa genetycznego izolowanych wirusów i szczepów zagranicznych użyto właśnie tego fragmentu. Sekwencje nukleotydowe ORF5 i aminokwasowe GP5 polskich izolatów porównano z sekwencją wirusa referencyjnego Bucyrus. W obrębie analizowanego genu nie stwierdzono żadnej delecji ani insercji, a zmienność wśród szczepów polegała jedynie na substytucji mniejszej lub większej liczby nukleotydów. Analiza całego genu ORF5

Tab. 2. Stopień podobieństwa sekwencji ORF5 i GP5 polskich szczepów EAV od ogierów w wybranych stadach

Stado ogierów	Liczba izolatów	Podobieństwo %	
		ORF5	GP5
K	9	92,8-98,6	91,8-98,0
L	9	81,2-98,8	93,7-99,4
N	3	85,1-99,0	90,1-99,4
P	4	91,1-97,6	93,0-97,0
R	2	98,8	98,2
S	3	91,5-93,6	91,8-93,6

(768 nt) wykazała podobieństwo sekwencji nukleotydowych pomiędzy polskimi izolatami a szczepem referencyjnym Bucyrus na poziomie od 69,1% do 88,1%. Z kolei w wybranym fragmencie ORF5 o długości 519 nukleotydów podobieństwo sekwencji badanych izolatów EAV i wirusa Bucyrus wynosiło od 79,7% do 85,7%. Oznaczało to, że sekwencje ORF5 izolatów polskich i szczepu referencyjnego Bucyrus różniły się 74-105 nukleotydam. Porównując sekwencje nukleotydowe ORF5 polskich izolatów między sobą stwierdzono homologię na poziomie 81,2-99,0% (tab. 2). Tak więc szczepy polskie w obrębie analizowanego genu różniły się 5-97 nukleotydam. Porównanie sekwencji aminokwasowych obejmujących fragmenty białka GP5 o najwyższej zmienności (regiony V1-V3) (4) przedstawiono na ryc. 2. Wiele substytucji nukleotydowych w genie ORF5 było niesynonimicznych i lokalizowały się one głównie w miejscach neutralizacji B i C fragmentu V1 białka GP5 (3). Największe zróżnicowanie na poziomie sekwencji ORF5 i białka GP5 zaobserwowano wśród izolatów pochodzących ze stad N i L. Sekwencje nukleotydowe dwóch izolatów N1 i N3, pochodzących od ogierów z pierwszego z gospodarstw wykazały 99% podobieństwo, natomiast izolat N2 różnił się od nich w 14,9%. Wśród 9 izolatów ze stada L sekwencja nukleotydowa ORF5 izolatów L5 i L7 pokrywała się w 91%, natomiast wyraźnie różniła się od sekwencji pozostałych izolatów tego stada. Analiza sekwencji nukleotydowych izolatów od czterech ogierów ze stada P wyizolowanych pomiędzy 2000 a 2002 r. wykazała największe podobieństwo pomiędzy izolatami P1 i P4 (97,6%). Podobieństwo sekwencji ORF5 izolatów P2 i P3 wyizolowanych w tym samym roku od dwóch różnych ogierów było nieco niższe i wynosiło 95,9%. Izolaty ze stada R były natomiast niemal identyczne. Sekwencje nukleotydowe obu izolatów pokrywały się w 98,8%, a aminokwasowe w 98,2%.

Porównując sekwencję nukleotydową genu ORF5 polskich izolatów i szczepu referencyjnego Bucyrus, dokonano oceny wpływu stwierdzonych mutacji na antygenowość białka GP5 (ryc. 3). Analizę tę wykonano teoretycznie przy pomocy algorytmu Jamesona i Wolfa (13). Prowadzone badania oparto na wynikach analizy determinanty antygenowej wirusa przeprowadzonej przez Chirnsida'a i wsp. (6), Glasera i wsp., (10) oraz Balasurię i wsp. (4). Ostatni wymieniony zespół na podstawie reakcji neutralizacji z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla GP5 określił w ektodomenie cztery główne (A-D) miejsca neutralizacji glikoproteiny GP5 (3).



Ryc. 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych fragmentu białka GP5 szczepów badanych i wybranych szczepów referencyjnych EAV. Kropkami oznaczono identyczne aminokwasy. Cyfry odpowiadają pozycji aminokwasu w łańcuchu białka GP5 dla szczepu Bucyrus (nr dostępu w GeneBank NP_65659).

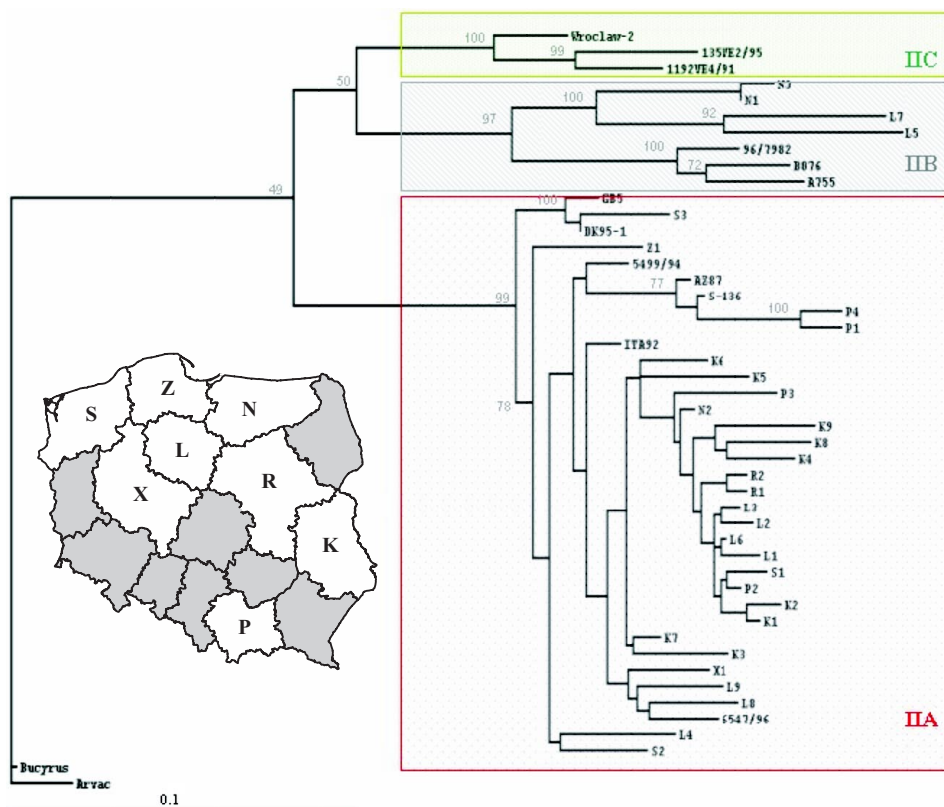
Ryc. 3. Profile antygenowe (antigenic index) fragmentu między 60-222 aa glikoproteiny GP5 szczepu referencyjnego Bucyrus i wybranych izolatów polskich wyznaczone według metody Jamesona i Wolfa (13) w programie Protean pakietu Lasergene v. 7.0 (DNASTAR, Inc.) Strzałkami zaznaczono wyraźne zmiany w profilu antygenowym w stosunku do białka GP5 szczepu Bucyrus obserwowane głównie w fragmencie zmiennym V1

Zmiany profili antygenowych białka GP5 badanych szczepów stwierdzono głównie w obrębie regionu zmiennego V1 i były one odbiciem zachodzących w tym fragmencie substytucji niesynonimicznych. Na wykresach antygenowości białka GP5 polskich izolatów stwierdzono obecność trzech zmiennych miejsc położonych w fragmencie V1 ORF5 pomiędzy 61 a 101 aa, leżących dokładnie w miejscach neutralizacji B, C, D. Wszystkie polskie izolaty wykazały 100% homologię w miejscu neutralizacji A (niezaznaczone w ryc. 3) z wirusem referencyjnym Bucyrus. W profilu antygenowym polskich izolatów w miejscu 61 aminokwasu obserwowany był spadek antygenowości w stosunku do wartości wykresu dla wirusa Bucyrus w wyniku substytucji silnie hydrofilnej lizyny (Lys) na neutralne lub hydrofobowe aminokwasy, tj. serynę (Ser), alaninę (Ala) i tyrozynę (Thr), a w przypadku izolatu L7

nawet na silnie hydrofobową walinę (Val). W sekwencjach GP5, gdzie doszło do zastąpienia lizyny przez hydrofilny kwas glutarowy (Glu) i asparaginę (Asp), profil antygenowy nie uległ zmianie. Porównanie sekwencji aminokwasowych szczególnie tego fragmentu pokazuje dużą jego zmienność również między wysoce homologicznymi izolatami EAV od ogierów pochodzących z tych samych stad. Wśród blisko spokrewnionych izolatów ze stada K stwierdzono cztery możliwe substytucje w pozycji 61 aa glikoproteiny GP5. Podobne obserwacje dotyczyły izolatów ze stada P i S, które również charakteryzowała

duża zmienność w obrębie miejsca neutralizacji B. Do zmian antygenowych większości polskich izolatów doszło również we fragmencie pomiędzy 79 a 83 aa miejsca neutralizacji C. Podobnie jak Balasuriya i wsp. (4), w większości badanych izolatów w miejscu 82 aminokwasu stwierdzono zamianę asparaginy (Asp) na kwas asparaginowy, co może wskazywać na kolejne, potencjalne miejsce glikozylacji białka GP5 i prowadzić do powstania odmiennych fenotypowo wariantów wirusa. W większości sekwencji polskich izolatów stwierdzono substitucję alaniny (Ala) na treoninę (Thr) w pozycji 101 łańcucha aminokwasowego GP5, co spowodowało wzrost indeksu antygenowego w miejscu neutralizacji D. Balasuriya i wsp. (3) stwierdzili, że substitucje aminokwasowe w obrębie miejsc neutralizacji A-D glikoproteiny GP5 wpływają na proces neutralizacji wirusa. Zatem zmienność w obrębie miejsc krytycznych ekto-domeny neutralizującej wśród izolatów terenowych powinna być brana pod uwagę w diagnostyce EVA. Zmienność ta może być także przyczyną małej skuteczności szczepień w kierunku EVA, ponieważ wszystkie dostępne szczepionki oparte są na wirusie Bucyrus.

Heterogenność sekwencji ORF5 prowadząca do zmian w antygenowości białka GP5 nie jest prawdopodobnie jedynym mechanizmem, który wpływa na reakcję neutralizacji wirusa przez przeciwciała. Chociaż obserwuje się różnice w reaktywności odmiennych genetycznie wariantów EAV z przeciwciałami monoklonalnymi, to należy zaznaczyć, że specyficzne surowice poliklonalne neutralizują większość dzikich typów wirusa (1). Na podstawie metody największej wiarygodności określono przynależność badanych szczepów polskich do dwóch podgrup filogenetycznych IIA i IIB (ryc. 4). Większość szczepów polskich znalazła się w podgrupie IIA. W drzewie filogenetycznym część izolatów wykazywała większe podobieństwo do szczepów referencyjnych, inne, jak na przykład izolaty ze stada K i L położone były blisko siebie, wskazując na posiadanie wspólnego przodka. Trzy izolaty L8, L9 i X1 wykazywały wspólne pochodzenie z szczepem 6547/96 wyizolowanym z tkanek poronionego płodu z Polski. Wiele z polskich szczepów było blisko spokrewnionych z szczepem włoskim ITA92. Jeden z izolatów ze stada ogierów w woj. zachodnio-pomorskim (S3) wyewoluował od wspólnego przodka razem z szczepem angielskim GB5 oraz szczepem DK95-1 wyizolowanym w Danii od ogiera przywiezionego z Niemiec. Podobieństwo filogenetyczne szczepów AZ87, S-436 oraz dwóch polskich izolatów (P1 i P4) tworzących drugą gałąź w obrębie podgrupy IIA wskazuje, że są one wirusami potomnymi wywodzącymi się z jednego



Ryc. 4. Dendrogram opracowany w oparciu o 32 sekwencje nukleotydowe genu ORF5 polskich szczepów izolowanych od ogierów ze stad, których położenie geograficzne przedstawiono na mapie oraz 15 szczepów referencyjnych EAV. Do konstrukcji drzewa wykorzystano metodę największego prawdopodobieństwa. Wartości bootstrap, które przedstawiono w procentach, obliczono dla 1000 generowanych drzew. Odcinek skali odpowiada 0,1 substitucji/nukleotydy

źródła. Szczep AZ87 został zidentyfikowany u ogiera w stanie Arizona, w USA w 1987 r. i w toku dochodzenia epizootycznego ustalono, że koń ten pochodził z Polski. Szczep S-436 wyizolowany został w 1988 r. od ogiera półkrowi angloarabskiej w jednej z polskich stadnin. Szczepy P1 i P4 pochodziły od dwóch różnych ogierów z tego samego stada ogierów w woj. śląskim. Różnica czasu dzieląca izolację szczepów P1 i P4 wynosiła 2 lata. Ponieważ homologia sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych tych wirusów była wysoka i wynosiła odpowiednio 97,6% i 97,0%, ogier zakażony szczepem P1 był przypuszczalnie źródłem zakażenia dla ogiera, od którego wyizolowano izolat P4. Jest to dowodem na możliwość transmisji EAV pomiędzy ogierami pochodzącymi z jednego stada drogą oddechową lub poprzez sprzęt zanieczyszczony wirusem (12). Porównując sekwencje izolatów P1 i P4 stwierdzono różnice w miejscu 12 nt i 5 aa. Analogiczny dystans genetyczny zaobserwowano porównując szczepy AZ87 i S-436. Wysokie podobieństwo tych szczepów, pochodzenie oraz rok izolacji wskazują, że ewoluowały one z tego samego wirusa. Dane te sugerują, że tempo ewolucji wirusa przypadające na rok wynosiło 6 nt (1,2%) w fragmencie ORF5 i 2,5-3 aa (1,4-1,7%) w łańcuchu aminokwasowym białka GP5. Z drugiej jednak strony, różnice pomiędzy izolatami P1 i P4 i szczepami AZ87 i S-436 były znacznie mniejsze niż można by oczekiwać, bowiem izolację szczepów dzielił okres 13 lat. Sekwencje nukleotydowe izolatów ze stada P i szczepów referencyjnych różniły się jedynie 22 nt, co oznaczałoby,

Tab. 3. Zmienność miejsca neutralizacji B białka GP5 polskich szczepów EAV w zależności od stada ogierów

Stado	Izolaty EAV	Aminokwas w 61. pozycji glikoproteiny GP5*
K	K1, K2, K4, K8	Ala (A)
	K3	Ser (S)
	K6, K7	Asn (N)
	K5	Lys (K)
	K9	Thr (T)
L	L1, L9	Lys (K)
	L2, L3, L5, L6	Ala (A)
	L4	Asp (D)
	L7	Val (V)
	L8	Glu (E)
Dodatkowo w przypadku L5 i L7 doszło do zmian niesynonimicznych w 3 kodonach powodujących substytucje w pozycjach 60-62 aa (SKT→NAN, SKT→DVD)		
N	N1, N3	Thr (T)
	N2	Ala (A)
P	P1	Lys (K)
	P2, P4	Ala (A)
	P3	Glu (E)
R	R1, R2	Ala (A)
S	S1	Ala (A)
	S2	Ser (S)
	S3	Glu (E)

Objaśnienia: * – miejsce neutralizacji B ektodomeny białka GP5

że tempo zachodzących zmian wynosiło około 1,7 substytucji nukleotydowej na rok we fragmencie o długości 519 nt (0,33%). Dane te sugerują, że zmiany sekwencji nukleotydowej nie kumulują się liniowo i są odwracalne. Potwierdzają to otrzymane wyniki, gdyż wiele najwcześniej wyizolowanych szczepów znajdowało się w takiej samej odległości od przypuszczalnego korzenia i węzłów drzewa, jak ostatnio izolowane polskie izolaty. Do podobnych wniosków doszli również inni autorzy (15, 16). Filogenetyczną przynależność EAV warunkują zatem dwa oddziałujące na siebie procesy, tj. ewolucja od wirusa – przodka (dryft genetyczny) i duża zmienność w obrębie populacji szczepów rzekomych (selekcja) (4).

Sekwencje nukleotydowe izolatów polskich i szczepów referencyjnych zgrupowane w drzewie filogenetycznym w klasteryze IIB wykazywały znacznie większą heterogenność (84,9-88,6%) niż blisko ze sobą spokrewnione szczepy podgrupy IIA (powyżej 90%). Szczepy należące do podgrupy IIB wyizolowano z nasienia ogierów pochodzących z państwowego stada ogierów z województw zachodniopomorskiego (L5 i L7) i z warmińsko-mazurskiego (N1 i N3). Szczepy te łączyło głównie to, że pochodziły one od ogierów ras lokalnych (wielkopolska i zimnokrwista) o podobnym użytkowaniu. Wszystkie cztery szczepy stworzyły oddzielną, niepołączoną z innymi szczepami referencyjnymi (96/7982, B076 i A755) gałąź w kładzie IIB, co może sugerować ich wspólne pochodzenie. Inte-

resując jest to, że żaden z dotychczas opublikowanych polskich szczepów nie wykazywał podobieństwa do podgrupy IIB. Wraz z nasilonym międzynarodowym, a nawet międzykontynentalnym transportem koni spodziewać się możemy, że kolejne badania filogenetyczne ujawnią dalsze różnicowanie genetyczne izolatów EAV krążących w Polsce. Pierwszym w pełni scharakteryzowanym polskim szczepem EAV był szczep Wrocław-2 wyizolowany na przełomie 1976 i 1977 r. (11). Został on zaliczony razem z dwoma homologicznymi szczepami włoskimi 1192VE4/91 i 135VE2/95 do podgrupy IIC szczepów pochodzenia europejskiego (16). Wyniki przeprowadzonej analizy filogenetycznej wykluczyły jednak przynależność ewolucyjną badanych izolatów polskich do podgrupy IIC. Opierając się na uzyskanych wynikach, bezpodstawne wydaje się wyróżnianie klastera IIC, skoro tworzą go tylko 3 szczepy, z których ostatni był izolowany ponad 10 lat temu. Potwierdzają to najnowsze badania Mittelholzer i wsp. (15), którzy wykluczyli przynależność szczepu Wrocław-2 do któregośkolwiek z utworzonych klasterek (EAV-1 do 3).

Piśmiennictwo

- Balasuriya U. B. R., Dobbe J. C., Heidner H. W., Smalley V. L., Navarrette A., Snijder E. J., MacLachlan N. J.: Characterization of the neutralization determinants of equine arteritis virus using recombinant chimeric viruses and site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Virology* 2004, 321, 235-246.
- Balasuriya U. B. R., Hedges J. F., Smalley V. L., Navarrette A., McCollum W. J., Timoney P. J., Snijder E. J., MacLachlan N. J.: Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 379-390.
- Balasuriya U. B. R., Patton J. F., Rossitto P. V., Timoney P. J., McCollum W. H., MacLachlan N. J.: Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four sites in the amino-terminal ectodomain of the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1997, 232, 114-128.
- Balasuriya U. B. R., Timoney P. J., McCollum W. H., MacLachlan N. J.: Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1995, 214, 690-697.
- Cavanagh D.: Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 1997, 142, 629-633.
- Chirnside E. D., de Vries A. A. F., Mumford J. A., Rottier P. J. M.: Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 1989-1998.
- Choi J. H., Jung H. J., Kim H. S., Cho H. G.: PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics* 2000, 16, 1056-1058.
- Domingo E., Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Martin-Hernandez A. M., Saiz J. C., Escarmis C.: Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, 4, 521-527.
- Felsenstein J.: Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* 1973, 22, 240-249.
- Glaser A. L., de Vries A. A. F., Dubovi E. J.: Comparison of equine arteritis virus isolates using neutralizing monoclonal antibodies and identification of sequence changes in GL associated with neutralization resistance. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 2223-2233.
- Golnik W., Michalak T.: Przypadki wirusowego zapalenia tętnic koni (arteritis equorum) w Polsce. *Medycyna Wet.* 1978, 35, 605-606.
- Guthrie A. J., Howell P. G., Hedges J. F., Bosman A. M., Balasuriya U. B. R., McCollum W. H., Timoney P. J., MacLachlan N. J.: Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizzaner stallions in South Africa. *Equine Vet J.* 2003, 35, 596-600.
- Jameson B. A., Wolf H.: The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 1988, 4, 181-186.
- Larska M., Rola J.: RT-PCR as effective detection method of equine arteritis virus in the semen of naturally infected stallions. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2003, 47, 307-313.
- Mittelholzer C., Stadejek T., Johansson I., Baule C., Ciabatti I., Hamant D., Paton D., Autorino G. L., Nowotny N., Belak S.: Extended phylogeny of equine arteritis virus: division into new subgroups. *J. Vet. Med. B* 2006, 53, 55-58.
- Stadejek T., Bjorklund H., Bascunana C. R., Ciabatti I. M., Scicluna M. T., Amadeo D., McCollum W. H., Autorino G. L., Timoney P. J., Paton D. J., Klingeborn B., Belak S.: Genetic diversity of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 1999, 80, 691-699.

Adres autora: dr Magdalena Larska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: m.larska@piwet.pulawy.pl