

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.25.39

К.О. КАРАМЕНДИН^{1*}, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, А.А. АБИШОВ²,
Ж.Ж. КУМЕКБАЕВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Научно-производственный центр Диавак-АБН, Алматы, Казахстан

³Эквилаб, Алматы, Казахстан

⁴Научно-производственный центр Антиген, Алматинская обл., Казахстан

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

ГЕРПЕСВИРУСЫ ЛОШАДЕЙ EHV-1 И EHV-4 В КАЗАХСТАНЕ

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.03

Аннотация

В статье представлены современные сведения о герпесвирусах, вызывающих ринопневмонию у лошадей. Приводятся данные о клинических проявлениях болезни, методах диагностики и вакцинопрофилактики. Приведены результаты серологических исследований в ИФА поголовья лошадей Алматинской области - найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4. Разработанная тест-система для ПЦР позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах Казахстана. Полногеномное секвенирование местного штамма EHV-1 показало изменения в геноме после аттенуирования штамма методом многократных пассажей в культуре клеток.

Ключевые слова: герпесвирус, EHV-1, EHV-4, ринопневмония, Казахстан, лошадь, диагностика, клиника, вакцина, секвенирование.

Вирусы герпеса лошадей (EHV), представляют собой высококонтагиозные вирусы, вызывающие заболевания верхних дыхательных путей, неврологические заболевания, аборт и/или неонатальную смерть. [1,2]. Ринопневмония лошадей (РПЛ) – это исторически сложившееся общее название заболевания, вызываемого двумя ДНК-вирусами из семейства *Herpesviridae*: *Equid herpesvirus-1* и *Equid herpesvirus-4* (EHV-1 и EHV-4) [3]. Оба вируса относятся к роду *Alphaherpesvirus* и их геномы от 55% до 84% идентичны по нуклеотидному составу, а по аминокислотному сходство составляет до 96% [4,5]. На сегодняшний день EHV-1 и EHV-4 классифицированы как представители подсемейства *Alphaherpesvirinae* рода *Varicellovirus* [6].

В семействе лошадиные идентифицированы восемь герпесвирусов, из которых пять принадлежат к подсемейству *Alphaherpesvirinae* и три - к *Gammapherpesvirinae*. Лошади являются природными хозяевами для *Alphaherpesvirus* типов 1 (EHV-1), 3 (EHV-3, коитальная экзантема), 4 (EHV-4), *Gammapherpesvirus* типов 2 (EHV-2) и 5 (EHV-5). Недавно был описан вариант EHV-1, возникший в результате одной точечной мутации в гене вирусной ДНК-полимеразы и ассоциирующийся с неврологическим заболеванием - лошадиной герпесной миелозэнцефалопатией (ЕНМ). Изоляция нового нейротропного вируса EHV-9 [7] от газели (*Gazelle herpesvirus-1*) указывает на то, что список известных на сегодняшний день герпесвирусов лошадиных еще может пополниться. EHV-1 и EHV-4 клинически, эпизоотически и экономически наиболее значимые патогены для лошадей.

Эпизоотология. Ринопневмония лошадей широко распространена во многих странах мира. В хозяйствах EHV-1 встречается чаще (>60%) по сравнению с EHV-4, инфекция после острого течения у животных принимает характер затяжной латентной

инфекции. Происходит чередование внезапных острых течений с периодами атипичного протекания болезни. Также характерна сезонность: чаще вспышки происходят осенью и в начале зимы.

Патогенез. Латентность альфагерпесвирусов – важная вирусная стратегия, которая обеспечивает ему выживание и распространение внутри популяции лошадей [8]. На сегодняшний день ясно, что латентно инфицированные лейкоциты не распознаются иммунной системой хозяина. EHV-1 персистирует преимущественно в Т-лимфоцитах CD5+/CD8+ и активируется интерлейкином-2 и лошадиным хорионическим гонадотропином [9]. Предполагается, что реактивированный латентный вирус, выделяемый с носовыми истечениями, играет ключевую роль в эпизоотологии EHV-1 и EHV-4. Физиологические факторы, ответственные за реактивацию пока неизвестны, но установлено, что спонтанное выделение вируса следует за такими стресс-факторами как отъем, кастрация, перемещение животного и ремитирующие болезни [10].

Клиника. При заражении взрослых животных инкубационный период составляет 2-8 сут. У больных животных повышается температура тела до 39,5–40 °С, наблюдаются конъюнктивит, серозный ринит, учащенное дыхание и сердцебиение. Частый признак болезни - отечность тазовых конечностей или подгрудка. При инфицировании вирусом EHV-1 жеребые кобылы abortируют во второй половине жеребости на 7-10-м мес. В некоторых случаях выкидыши происходят у 90 % кобыл.

Вакцинопрофилактика. В настоящее время стратегия вакцинации направлена на профилактику заболеваемости среди жеребят-сосунков, так как именно они считаются основным резервуаром и фактором трансмиссии вирусов ринопневмонии [11]. Существуют, по крайней мере, 12 моно- и поливалентных вакцин к EHV-1 и EHV-4. Только одна из них лицензирована в Евросоюзе: инактивированная EHV-1 и EHV-4 вакцина, содержащая адъювант карбомер и обеспечивающая профилактику абортов, вызываемых EHV-1 [12]. В России и Казахстане для специфической профилактики используют живую вирус-вакцину против ринопневмонии из штамма CB/69. Вакцинацию проводят двукратно с интервалом 3–4 мес. Жеребых кобыл иммунизируют на 2-3-м мес жеребости, повторно на 6-7-м мес. В последнее время разрабатываются живые генно-инженерные вакцины [13], однако при испытании их иммуногенность пока оказывается невысокой.

Наиболее эффективной является вакцина, полученная методом классического мутагенеза *in vitro*, которая кроме респираторной формы и абортов при EHV-1, также защищает от EHV-4, при этом вводится только однократно интраназально [14]. В Казахстане разрабатывается собственная вакцина на основе аттенуированного штамма, вызвавшего массовые аборты на юго-востоке страны [15].

Диагностика. Для изоляции вируса из биологических образцов используют первичные культуры клеток почки эмбриона лошади (ЕЕК) или линии фибробластов, полученные из эпидермальной и легочной тканей животных. Дальнейшую дентификацию вируса проводят в реакции иммунофлуоресценции с использованием меченых моноклональных антител [16]. При гистологическом исследовании патматериала в виде парафинизированных образцов используется иммунопероксидазное окрашивание с обнаружением вируса под световым микроскопом. Одновременно можно наблюдать характерные морфологические изменения в тканях [17].

Серологическая диагностика основана на выявлении прироста титров антител при исследовании парных сывороток, взятых во время острого периода заболевания и в стадии реконвалесценции (через 2–4 недели). Антитела в сыворотках крови также можно определить в реакциях связывания комплемента и ИФА [18].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется для быстрой амплификации и обнаружения нуклеиновых кислот вирусов ринопневмонии в клинических образцах, парафинизированных тканях и культурах клеток. Наблюдается высокая степень корреляции между результатами ПЦР и изоляцией вируса в культурах клеток при диагностике EHV-1 или EHV-4 [19]. Однако при интерпретации результатов ПЦР следует учитывать

присутствие вируса в некоторых тканях при латентной инфекции [20]. МЭБ рекомендует гнездовой ПЦР для обнаружения EHV-1 или EHV-4 в клинических или патологических материалах [21]. В лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии разработана собственная тест-система на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей [22].

Материалы и методы

Для серологических исследований использовали тест-систему на основе модифицированного Crabb and Studdert (1993) метода ИФА, для диагностики герпесвирусов лошадей фирмы «Svanova Biotech AB» (Швеция), основанной на использовании рекомбинантных белков EHV1 и EHV4 - “Eguine Herpes Virus type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab)”, которая позволяет распознавать инфицированных лошадей от неинфицированных EHV1 и EHV4 животных.

Для молекулярной диагностики использовали собственную тест-систему на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей. Для ПЦР был выбран консервативный участок генома EHV-4 – ген поверхностной мембраны gB, который имеет 89,6% идентичность с соответствующим геном EHV-1 [8] и в компьютерной программе OligoAnalyser разработаны праймеры.

Для выделения герпесвирусов лошадей материалы от больных животных использовались для заражения перевиваемой культуры клеток трахеи телят (ККТТ). Выделенный штамм ринопневмонии лошадей АК-2011 размножали и накапливали в ККТТ в титре 5,75 lg TCID₅₀/см³ и выше (титр цитопатических доз, вызывающих клеточное повреждение монослоя у 50% инфицированных). Цитопатогенное действие вируса проявлялось в монослое инфицированных клеток через 72–90 часов после инокуляции и распространялось на более чем 85% клеточного монослоя через 110–144 часа после инфицирования.

Для секвенирования нового поколения вирусную ДНК выделяли с помощью набора QIAmp Viral RNA Mini (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Библиотеку получали с помощью набора ДНК NEBNext Ultra (NEB, США) и качество библиотеки оценивали с помощью Agilent 2100 (Agilent, Германия). Секвенирование проводили на приборе MiSeq с использованием набора v.3 (Illumina, США). Программное обеспечение FastQC [23] использовалось для оценки качества прочтений. Полученные прочтения были обрезаны на 3' и 5'-концах. Для сборки de Novo использовали ассемблер SPAdes [24] в составе программного пакета Geneious Prime (Biomatters, Новая Зеландия) [25].

Результаты и обсуждение

В Казахстане вирусы ринопневмонии лошадей часто циркулируют в хозяйствах, где не проводятся профилактические мероприятия. Так, с 2000 по 2007 гг. в Алматинской области регулярно изолируются вирусы ринопневмонии на первично-трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона лошади. При серологическом исследовании в ИФА найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4 [26].

При помощи “Eguine Herpes Virus type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab)” были проанализированы сыворотки крови от 30 кобыл одного из хозяйств Алматинской области Казахстана, в котором ежегодно регистрировались случаи абортов кобыл на последних месяцах жеребости, а также случаи рождения нежизнеспособных жеребят, погибающих в первые часы жизни. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 -Дифференциация антител к EHV1/EHV4 и EHV4 в сыворотках лошадей в ELISA-EHV1/EHV4-Ab тесте фирмы «Svanova Biotech AB» (Швеция).

№ лошади	EHV1/EHV4	EHV4	№ лошади	EHV1/EHV4	EHV4
1	-	+	16	-	+
2	+	+	17	+	+
3	-	+	18	+	+
4	-	+	19	-	+
5	-	+	20	-	+
6	+	+	21	+	+
7	-	+	22	-	+
8	-	+	23	-	+
9	-	+	24	-	+
10	-	+	25	-	+
11	-	+	26	-	+
12	-	+	27	-	+
13	-	+	28	-	+
14	+	+	29	-	+
15	+	+	30	+	+

Все исследованные лошади имели антитела к EHV4. 27% этих животных также имели антитела к EHV1. Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции в данном поголовье двух типов герпесвирусов лошадей - EHV1 и EHV4. Распространению инфекции способствовало скученное содержание животных, отсутствие регулярной вакцинации, несоблюдение карантинных мероприятий при ввозе в данное хозяйство вновь прибывающих лошадей, а также при перемещении животных внутри хозяйства. На основании полученных результатов, кобылы, имеющие антитела к EHV1 были отделены от остальных животных, а из оставшегося поголовья лошадей, имеющих антитела к EHV4, были сформированы небольшие группы. В данных подгруппах лошадей регулярно проводится изучение иммунного фона к герпесвирусным инфекциям на основании исследования сывороток животных в иммуноферментном тесте фирмы «Svanova Biotech AB». Это позволяет, по полученным результатам ИФА, отделять серонегативных животных от серопозитивных, не допуская их контакта, тем самым предотвращать дальнейшую циркуляцию герпесвирусов лошадей и снизить количество аборт в данном хозяйстве.

В лаборатории экологии вирусов разработана собственная тест-система на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей. Проведено выравнивание гена gB с аналогичными последовательностями из международной базы данных Генбанк и определены консервативные участки для конструирования праймеров. В результате исследований чувствительности ПЦР-набора установлено, что отдельно с ДНК вируса ринопневмонии лошадей тест-система работает до 10–5 разведения (25 пикограмм), что сопоставимо с международными требованиями, предъявляемыми к чувствительности ПЦР (рисунок 1). Данная тест-система позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах.



Рисунок 1 – Чувствительность ПЦР тест-системы при разведении исходных образцов до 10-5 разведения

В 2011 г. произошла вспышка ринопневмонии лошадей в Казахстане в одном из хозяйств юго-востока Казахстана, в котором ежегодно регистрировались аборт жеребых, рождение нежизнеспособных жеребят, погибающих в течение первых 12 часов жизни. В настоящей статье в Казахстане описывается молекулярно-генетическая характеристика выделенного изолята и приводится строение его полного генома. В результате секвенирования полученные прочтения были собраны *de Novo* и картированы на эталонной последовательности генома EHV-1 (рисунок 2).

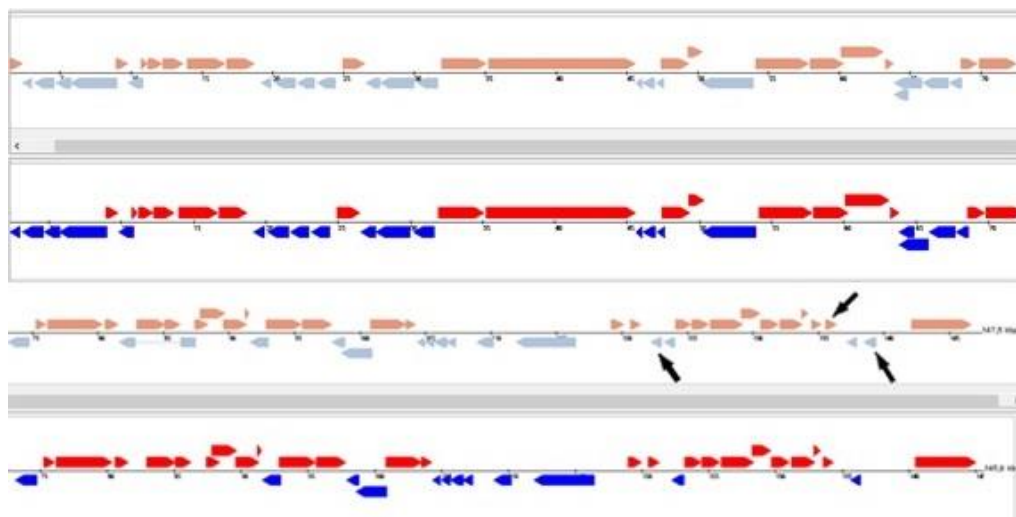


Рисунок 2 – Схема аннотации генома казахстанского штамма EHV-1

Анализ геномов вирусов ринопневмонии методом секвенирования показал, что у EHV-1 он состоит из 150 223, а у EHV-4 из 145 597 пар оснований. У обоих вирусов они условно разделены на длинный уникальный регион, фланкированный коротким инвертированным повтором, и короткий уникальный регион, фланкированный основным инвертированным повтором, и состоят из 76 открытых рамок считывания [27]. В нашем предварительном исследовании определено, что полный геном местного штамма ринопневмонии составил более 145000 нуклеотидов и состоит из 74 открытых рамок считывания. При аттенуировании штамма методом многократных пассажей через клеточную культуру, очевидно, вирус потерял три открытых рамки считывания (на рисунке 2 показаны стрелками).

Заключение

В Казахстане вирусы ринопневмонии остаются актуальными вирусными инфекциями, наносящими значительный урон коневодству. При серологическом исследовании в ИФА найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4 при обследовании поголовья лошадей Алматинской области. Полученные результаты ИФА позволили отделить серонегативных животных от серопозитивных, не допуская их контакта, тем самым предотвратить дальнейшую циркуляцию герпесвирусов лошадей и снизить количество абортов. Разработанная тест-система для ПЦР позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах Казахстана. Полное секвенирование генома местного штамма EHV-1 в дальнейшем расширит понимание биологии этих вирусов и откроет дополнительные возможности для иммунопрофилактики.

Как правило, значительное количество абортов, вызванных вирусом, связано с отсутствием рутинных диагностических тестов, низким уровнем вакцинации, неконтролируемым ввозом лошадей, снижением резистентности к вирусу в зимне-весенний период и длительной выживаемостью патогена в окружающей среде [28].

Финансирование

Работа выполнена в рамках НТП BR10764975 «Разработать и предложить для производства методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибиреязвенных очагов» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

- 1 World Organization of Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 12.8. Infection with Equid Herpesvirus-1 (Equine Rhinopneumonitis). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_rhinopneumonitis.pdf
- 2 Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D. & Smith K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: Infectious Diseases of Livestock, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
- 3 Bryans J.T. & Allen G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Animals, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
- 4 Cullinane, A. A., Rixon, F. J. & Davison, A. J. (1988). Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. Journal of General Virology 69, 1575–1590.
- 5 Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K. & Davison A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virology, 189, 304–316.
- 6 Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. Arch. Virol. 154, 171–177.
- 7 Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochia, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. Virology 226, 34–44.
- 8 Whitley, R.J., Gnann, J.W., 1993. The epidemiology and clinical manifestation of herpes simplex virus infections. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopaz, C. (Eds.), The Human Herpesviruses. Raven Press, New York, pp. 69–105.
- 9 Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD+5/CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophin. Journal of General Virology 24, 2997–3004.
- 10 Burrows, R., Goodridge, D., Denyer, M.S., 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. Veterinary Record 114, 369–374.
- 11 Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2002. Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine. Veterinary Microbiology 88, 13–25.
- 12 Heldens, J.G.M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., Van Den Hoven, R., 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV-1 and EHV-4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. Vaccine 19, 4307–4317.
- 13 Kaashoek, M., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F.A.M., Quak, J., Gielkens, A.L.J., Van Oirschot, J.T., 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine 12, 439–444.
- 14 Patel, J.R., Földi, J., Bateman, H., Williams, J., Didlick, S., Stark, R., 2003b. Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges. Veterinary Microbiology 92, 1–17.
- 15 Abisheva A, Abishov A, Khairullaeva K, Shynybayev K, Kalissynov B, Maikhin K, Kydyrmanov A, Karamendin K, Valdovska A, Syrym N. 2022. AK-2011 strain for the development of a vaccine against equine rhinopneumonitis. Transbound Emerg Dis. 00:1–10. <https://doi.org/10.1111/tbed.14531>
- 16 Gunn H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. Irish Vet. J., 44, 37–40.

17 Schultheiss P.C., Collins J.K. & Carman J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 12–15.

18 Dutta S.K., Talbot N.C. & Myrup A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 1930–1934.

19 Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C.A., Studdert M.J. & Drummer H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, 79, 563–569.

20 Welch H.M., Bridges C.G., Lyon A.M., Griffiths L. & Edington N. (1992). Latent equine herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, 73, 261–268.

21 Borchers K. & Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, 45, 331–336.

22 Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I., Sayatov M.Kh. Development of a PCR for the simultaneous diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. *Biotechnology. Theory and Practice*. No. 1, 2013 pp. 20-23

23 Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

24 Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, & Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70:e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

25 Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

26 Kumekbayeva Zh.Zh. Indication, identification of equine herpesviruses, differentiation of EHV1-EHV4 in ELISA test «Svanova Biotech AB». Proceedings of the 6th REVA Conference «Equine Diseases: Diagnosis, Prophylaxis, Treatment», Moscow, Russia, 2005, p.5.

27 Telford E.A.R., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A. & Davison A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, 79, 1197–1203.

28 Castro ER, Arbiza J. Detection and genotyping of equine herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech*. 2017 Dec;36(3):799-806. doi: 10.20506/rst.36.3.2715.

К.О. ҚАРАМЕНДИН^{1*}, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, А.А. ӘБШОВ², Ж.Ж. КӨМЕКБАЕВА³,
М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴

¹ Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

² Diavak-ABN ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³ Equilab, Алматы, Қазақстан

⁴ «Антиген» ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы облысы, Қазақстан

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ EHV-1 ЖӘНЕ EHV-4 ЖЫЛҚЫЛАР ГЕРПЕСВИРУСТАРЫ

Түйін

Мақалада жылқылар ринопневмониясы ауруын қоздыратын герпесвирустар жөнінде қазіргі заманның мәліметтері беріледі. Аурудың клиникалық көріністері, балау және вакцинамен алдын алу әдістері жөнінде мәліметтер беріледі. Алматы облысы жылқылары ИФА әдісімен серологиялық зерттеулер өткізілді – EHV-1 және EHV-4 қарсы антиденелер табылды. Өзірленген ПТР тест жүйесі Қазақстанның жылқы шаруашылығында жылқылардың ринопневмониясын балауға мүмкіндік береді. Жергілікті EHV-1 штаммының толық геномын секвендеу, жасуша культурасынан бірнеше рет өткізу әдісімен әлсірегені геномындағы өзгерістерді көрсетті.

Кілт сөздер: герпесвирус, EHV-1, EHV-4, ринопневмония, ат, балау клиника, вакцина, секвендеу.

IRSTI: 34.25.39

K.O. KARAMENDIN^{1*}, A.I. KYDYRMANOV¹, A.A. ABISHOV²,
Zh.Zh. KUMEKBAYEVA³, M.N. AKHMETZHANOVA⁴

¹Scientific and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

² SPE DiaVak-ABN, Almaty, Kazakhstan

³ EquiLab, Almaty, Kazakhstan

⁴ Antigen, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

EQUINE HERPESVIRUSES EHV-1 AND EHV-4 IN KAZAKHSTAN

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.03

Abstract

Contemporary data on equine herpesviruses causing rhinopneumonitis in horses are present in this paper. Data on clinical manifestations, methods of diagnosing and vaccine prophylaxis are given. The results of serological studies of the population of horses in the Almaty region in ELISA are presented - antibodies were found both to EHV-1 and EHV-4. The developed PCR makes it possible to effectively diagnose rhinopneumonitis in horse breeding farms in Kazakhstan. Whole genome sequencing of the local strain EHV-1 showed changes in the genome after strain attenuation after multiple passages in cell culture.

Keywords: herpesvirus, EHV-1, EHV-2, rhinopneumonitis, horse, diagnostics, clinics, vaccine, sequencing

Equine herpesviruses (EHV) are highly contagious viruses that cause upper respiratory disease, neurological disease, abortion and/or neonatal death. [1,2]. Equine rhinopneumonitis is the historically common name for a disease caused by two DNA viruses from the *Herpesviridae* family: Equid herpesvirus-1 and Equid herpesvirus-4 (EHV-1 and EHV-4) [3]. Both viruses belong to the genus *Alphaherpesvirus* and their genomes are from 55% to 84% identical in nucleotide composition, and in amino acid - the similarity is up to 96% [4,5]. To date, EHV-1 and EHV-4 are classified as members of the *Alphaherpesvirinae* subfamily of the genus *Varicellovirus* [6].

In the *Equidae* family, eight herpesviruses have been identified, of which five belong to the *Alphaherpesvirinae* subfamily and three to the *Gammaherpesvirinae* subfamily. Horses are natural hosts for *Alphaherpesvirus* types 1 (EHV-1), 3 (EHV-3, coital exanthema), 4 (EHV-4), *Gammaherpesvirus* types 2 (EHV-2) and 5 (EHV-5). A variant of EHV-1 has recently been described, resulting from a single point mutation in the viral DNA polymerase gene, and associated with the neurological disease Equine herpes myeloencephalopathy (EHM). The isolation of the new neurotropic virus EHV-9 [7] from the gazelle (*Gazelle herpesvirus-1*) indicates that the list of currently known equine herpesviruses may still be complemented. EHV-1 and EHV-4 are clinically, epizootically and economically the most significant pathogens for horses.

Epidemiology. Equine rhinopneumonitis is widespread all over the world. In horse populations, EHV-1 infection is supposed to occur at a higher (>60%) frequency compared to EHV-4. Equine rhinopneumonitis, having arisen in a horse breeding farm, become a stationary infection. Acute outbreaks alternate with periods of an obscure, atypical course of the disease. In affected herds, the virus persists due to the ability to survive for a long time in the organism of horses, the universality of the transmission mechanism and the short duration of post-infection immunity. In addition, equine rhinopneumonitis is characterized by seasonality - the largest number of sick animals is registered in autumn and early winter.

Pathogenesis. The latency of alphaherpesviruses is an important viral strategy that ensures its survival and distribution within the horse population [8]. To date, it is clear that latently infected leukocytes are not recognized by the host's immune system. EHV-1 persists predominantly in CD5+/CD8+ T-lymphocytes and is activated by interleukin-2 and equine chorionic gonadotropin

[9]. It is assumed that reactivated latent virus excreted with nasal discharge plays a key role in the epidemiology of EHV-1 and EHV-4. The physiological factors responsible for reactivation are not yet known, but spontaneous viral shedding has been shown to follow stress factors such as weaning, castration, animal movement, and remittent diseases [10].

Clinics. When adult animals are infected, the incubation period is 2-8 days. In sick animals, the body temperature rises to 39.5-40 °C, conjunctivitis, serous rhinitis, rapid breathing and palpitation are observed. A common symptom of the disease is swelling of the pelvic limbs or dewlap. When infected with the EHV-1 virus, pregnant mares are aborted in the second half of pregnancy at the 7-10th month. In some cases, abortions occur in 90% of mares. In the period preceding the abortion, the mares have no visible signs of the disease, the normal development of pregnancy continues. Abortions occur suddenly without noticeable precursors or dead foals are born. An important step in understanding the pathogenesis of rhinopneumonitis is to define that necrotizing vasculitis and thrombosis due to lysis of endothelial cells lining the capillaries of the CNS, the fertilized uterus and other organs of the horse are the main factors causing abortions and paresis.

Vaccination. Currently, the vaccination strategy is aimed at preventing morbidity among suckling foals, since they are considered the main reservoir and transmission factor of EHV [11]. There are at least 12 mono- and polyvalent vaccines for EHV-1 and EHV-4. All of them are intended for parenteral administration and serve to prevent the respiratory form of the disease. Only one of them is licensed in the European Union: an inactivated EHV-1 and EHV-4 vaccine containing a carbomer adjuvant and providing the prevention of abortions caused by EHV-1 [12]. In Russia and Kazakhstan, a live vaccine from the SV/69 strain is used. Vaccination is carried out twice with an interval of 3-4 months. Pregnant mares are immunized at the 2-3rd month of pregnancy, again at the 6-7th month. Young animals are first vaccinated at the age of 3-4 months. For their passive immunization, hyperimmune antiserum is used, but it does not have a protective effect during abortion. Recently, live genetically engineered vaccines have been developed [13], however, during testing, their immunogenicity was found to be low. Testing of another recombinant vaccine, using the Canarypox virus as a vector expressing EHV-1 gB, gC, and gD proteins, provided only partial protection of horses from the respiratory form. In the USA, the vaccines with the greatest ability to limit nasal shedding and viremia of the neuro virulent strain include the vaccines licensed for control of abortion (Pneumabort-K & Prodigy), Calvenza and the MLV vaccine (Rhinomune) [14].

The most effective was the vaccine obtained by classical in vitro mutagenesis, which, in addition to the respiratory form and abortions in EHV-1, also protects against EHV-4, while being administered only once intranasally [15]. Another important characteristic of this live vaccine is its ability to confer immunity to EHV-1 and EHV-4 in suckling foals via mother's milk [16]. Kazakhstan is developing its own vaccine based on an attenuated strain that caused mass abortions in the southeast of the country [17].

Diagnostics. To isolate the virus from samples, primary cultures of equine embryonic kidney (EEK) cells or fibroblast lines obtained from epidermal and lung tissues of animals were used. Virus identification was carried out in an immunofluorescence assay using labeled monoclonal antibodies. Frozen sections [18] can be investigated using this method.

In the histological examination of the pathological material in the form of paraffinized samples, immunoperoxidase staining is used with the detection of the virus under a light microscope. At the same time, specific morphological changes in tissues can be observed [19].

Serological diagnosis is based on the detection of an increase in antibody titers in the study of paired sera taken during the acute period of the disease and in the convalescence stage (after 2-4 weeks). The limiting antibody titer in the neutralization assay is considered to be the highest dilution of serum, which 100% prevents infection of the cell monolayer from the cytopathic effect of the virus [20]. Serum antibodies can also be detected by Complement Fixation Test and ELISA [21], the advantages of which are that these methods provide faster results and do not require cell cultures. During an outbreak of infection, antibodies to EHV1 and EHV4 were detected, which

can be differentiated using the ELISA, which allows not only to speed up the diagnosis, but also to take timely measures to combat this disease.

Polymerase chain reaction (PCR) is used for the rapid amplification and detection of nucleic acids of EHV in clinical specimens, paraffinized tissues and cell cultures. There is a high degree of correlation between PCR results and virus isolation in cell cultures in the diagnosis of EHV-1 or EHV-4 [22]. However, when interpreting PCR results, the presence of the virus in some tissues during latent infection should be considered [23]. The OIE recommends nested PCR for the detection of EHV-1 or EHV-4 in clinical or pathological specimens [24]. The Laboratory of Ecology of Viruses of the Scientific and Production Center for Microbiology and Virology has developed its own PCR-based test for the simultaneous differential diagnosis of influenza and equine rhinopneumonitis [25].

Materials and Methods

For serological studies, an ELISA kit based on the modified Crabb and Studdert (1993) method was used, for the diagnosis of equine herpesviruses (Svanova Biotech AB, Sweden), based on the use of recombinant proteins EHV1 and EHV4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab). This test allows to distinguish infected horses from non-infected EHV1 and EHV4 animals, monitor the immune background of horses to herpesvirus infections and manage possible outbreaks of abortions in pregnant mares.

For molecular diagnostics, we used our own PCR-based kit for the simultaneous differential diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. The compatibility of the primers with each other was checked in the OligoAnalyser software. For PCR, a conservative region of the EHV-4 genome, the gB surface membrane gene, was chosen, which has 89.6% identity with the corresponding EHV-1 gene [8].

To isolate equine herpesviruses, samples from sick animals were used to infect a calf tracheal cell line. The isolated strain of equine rhinopneumonitis AK-2011 was propagated and accumulated at a titer of $5.75 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ and higher (the titer of cytopathic doses that cause cell damage to the monolayer in 50% of the infected). The cytopathogenic effect of the virus was manifested in the monolayer of infected cells 72-90 hours after inoculation and spread to more than 85% of the cell monolayer 110-144 hours after infection.

Next Generation Sequencing. Viral DNA was extracted using the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. The library was obtained using the NEBNext Ultra DNA kit (NEB, USA) and the quantity of the library was assessed using Agilent 2100 (Agilent, Germany). Paired-end sequencing was performed on a MiSeq instrument using v.3 kit (Illumina, USA). FastQC [26] software was used to assess the quality reads. The obtained reads were trimmed at the 3' and 5' ends. SPAdes assembler [27] within the Geneious Prime software package (Biomatters, New Zealand) [28] was used for de Novo assembly.

Results and Discussion

In Kazakhstan, EHV circulates in farms where preventive measures are not taken. Thus, from 2000 to 2007 in the Almaty region, EHV were regularly isolated on primary equine embryo kidney cells. Serological testing in ELISA revealed antibodies to both EHV-1 and EHV-4 [29].

Using the EHV type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab), blood sera from 30 mares of one of the farms of the Almaty region of Kazakhstan were examined, in which cases of abortions of mares in the last months of pregnancy, as well as cases of birth non-viable foals dying in the first hours of life. The results of the study are presented in table 1.

Table 1 - Differentiation of antibodies to EHV1/EHV4 and EHV4 in equine sera in the ELISA-EHV1/EHV4-Ab test (Svanova Biotech AB, Sweden)

Horse #	EHV1/EHV4	EHV4	Horse #	EHV1/EHV4	EHV4
1	-	+	16	-	+
2	+	+	17	+	+
3	-	+	18	+	+
4	-	+	19	-	+
5	-	+	20	-	+
6	+	+	21	+	+
7	-	+	22	-	+
8	-	+	23	-	+
9	-	+	24	-	+
10	-	+	25	-	+
11	-	+	26	-	+
12	-	+	27	-	+
13	-	+	28	-	+
14	+	+	29	-	+
15	+	+	30	+	+

All horses studied had antibodies to EHV4. 27% of these animals also had antibodies to EHV1. The results obtained indicate the circulation in this population EHV1 and EHV4. The spread of the infection was facilitated by the crowded rearing of animals, the lack of regular vaccination, non-compliance with quarantine measures when newly arriving horses were imported into this farm, as well as when animals were moved within the farm. Based on the results obtained using this ELISA kit, mares with antibodies to EHV1 were separated from the rest of the animals, and from the remaining population of horses with antibodies to EHV4. In these subgroups of horses, the study of the immune background to herpesvirus infections is regularly carried out based on the previous study. This allows, according to the results of ELISA, to separate seronegative animals from seropositive ones, preventing their contact, thereby preventing further circulation of EHV and reducing the number of abortions in this farm.

The Laboratory of Viral Ecology has developed its own PCR kit system for the simultaneous differential diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. When designing primers, a conservative region of the EHV-4 genome, the gB surface membrane gene, was chosen, which has 89.6% identity with the corresponding EHV-1 gene [8]. The alignment of the gB gene with similar sequences from the Genbank was carried out, and conservative regions for primer design were identified. As a result of the sensitivity studies of the PCR kit, it was found that the kit works separately with DNA of the equine rhinopneumonitis virus up to 10^{-5} dilutions (25 picograms), which is comparable to international requirements for PCR sensitivity (Figure 1). This kit allows effective diagnosing of rhinopneumonitis in horses.

Figure 1 - The sensitivity of the PCR kit with diluted DNAs up to 10^{-6} dilution

In 2011, there was an outbreak of equine rhinopneumonitis in Kazakhstan in one of the farms in the south-east of Kazakhstan, where abortions of foals and the birth of non-viable foals that die within the first 12 hours of life were recorded annually. This article in Kazakhstan describes the molecular genetic characteristics of the isolated isolate and provides the structure of its complete genome. In the result of sequencing, obtained reads were de Novo assembled and mapped on the reference EHV-1 genome sequence (Figure 2).

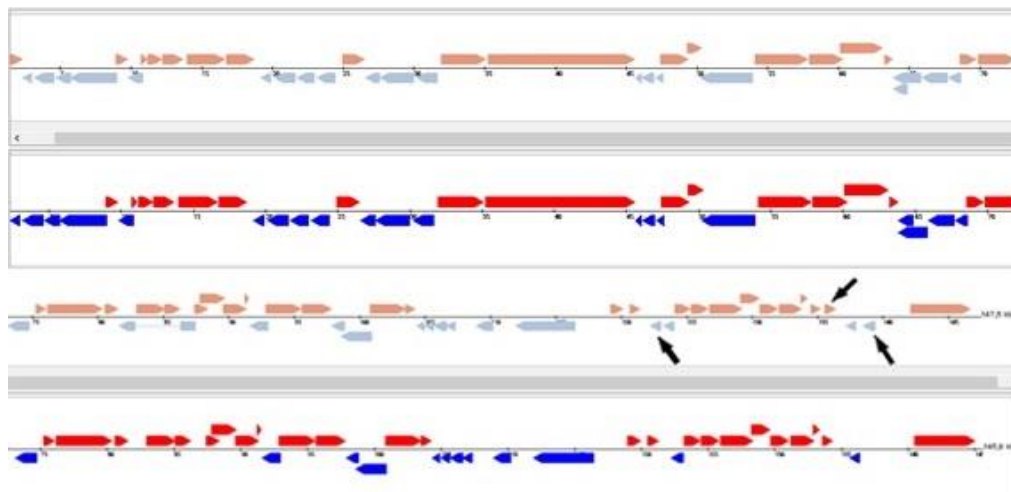


Figure 2 - Scheme of annotation of the genome of the Kazakhstani strain EHV-1

Analysis of the EHV genomes by sequencing showed that in EHV-1 consists of 150,223 base pairs, and in EHV-4 of 145,597 base pairs. In both viruses, they are divided into a long unique region flanked by a short inverted repeat and a short unique region flanked by the main inverted repeat, and consist of 76 open reading frames [30]. In our preliminary study, it was determined that the complete genome of the local EHV strain was more than 145,000 nucleotides and consisted of 74 open reading frames. When the strain was attenuated by multiple passages through cell culture, the virus apparently lost three open reading frames (shown by arrows in Figure 2).

Conclusion

In Kazakhstan, EHV is important viral infection that cause significant damage to horse breeding. The article shows cases of diagnosis, isolation and genetic characterization of local EHV strains.

Serological examination in ELISA revealed antibodies to both EHV-1 and EHV-4 when testing the horse population of the Almaty region. The obtained ELISA results made it possible to separate seronegative animals from seropositive ones, preventing their contact, thereby preventing further circulation of equine herpesviruses and reducing the number of abortions.

The developed PCR kit makes it possible to effectively diagnose rhinopneumonitis in horses in farms of Kazakhstan.

Complete genome sequencing of the local EHV-1 strain will further expand our understanding of the biology of these viruses and open additional opportunities for immunoprophylaxis.

As a rule, a significant number of abortions caused by the virus is associated with a lack of routine diagnostic tests, low vaccination rates, uncontrolled importation of horses, a decrease in resistance to the virus in the winter-spring period, and a long survival of the pathogen in the environment [31].

Funding

The work was carried out within the framework of the BR10764975 Scientific Program "Develop and propose for production methods for diagnosing, preventing diseases, treating

infected animals and decontaminating soil anthrax foci" funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 World Organization of Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 12.8. Infection with Equid Herpesvirus-1 (Equine Rhinopneumonitis). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_rhinopneumonitis.pdf
- 2 Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D. & Smith K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: Infectious Diseases of Livestock, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
- 3 Bryans J.T. & Allen G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Animals, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
- 4 Cullinane, A. A., Rixon, F. J. & Davison, A. J. (1988). Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. Journal of General Virology 69, 1575–1590.
- 5 Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K. & Davison A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virology, 189, 304–316.
- 6 Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. Arch. Virol. 154, 171–177.
- 7 Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochia, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. Virology 226, 34–44.
- 8 Whitley, R.J., Gnann, J.W., 1993. The epidemiology and clinical manifestation of herpes simplex virus infections. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopaz, C. (Eds.), The Human Herpesviruses. Raven Press, New York, pp. 69–105.
- 9 Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD+5/CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophin. Journal of General Virology 24, 2997–3004.
- 10 Burrows, R., Goodridge, D., Denyer, M.S., 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. Veterinary Record 114, 369–374.
- 11 Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2002. Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine. Veterinary Microbiology 88, 13–25.
- 12 Heldens, J.G.M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., Van Den Hoven, R., 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV-1 and EHV-4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. Vaccine 19, 4307–4317.
- 13 Kaashoek, M., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F.A.M., Quak, J., Gielkens, A.L.J., Van Oirschot, J.T., 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine 12, 439–444.
- 14 Patel, J.R., Fo' ldi, J., Bateman, H., Williams, J., Didlick, S., Stark, R., 2003b. Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges. Veterinary Microbiology 92, 1–17.
- 15 Abisheva A, Abishov A, Khairullaeva K, Shynybayev K, Kalissynov B, Maikhin K, Kydyrmanov A, Karamendin K, Valdovska A, Syrym N. 2022. AK-2011 strain for the development of a vaccine against equine rhinopneumonitis. Transbound Emerg Dis. 00:1-10. <https://doi.org/10.1111/tbed.14531>
- 16 Gunn H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. Irish Vet. J., 44, 37–40.
- 17 Schultheiss P.C., Collins J.K. & Carman J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. J. Vet. Diagn. Invest., 5, 12–15.
- 18 Dutta S.K., Talbot N.C. & Myrup A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 44, 1930–1934.
- 19 Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C.A., Studdert M.J. & Drummer H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. Aust. Vet. J., 79, 563–569.

20 Welch H.M., Bridges C.G., Lyon A.M., Griffiths L. & Edington N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J.Gen. Virol.*, 73, 261–268.

21 Borchers K. & Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, 45, 331–336.

22 Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I., Sayatov M.Kh. Development of a PCR for the simultaneous diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. *Biotechnology. Theory and Practice*. No. 1, 2013 pp. 20-23

23 Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

24 Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, & Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70:e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

25 Kears M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

26 Kumekbayeva Zh.Zh. Indication, identification of equine herpesviruses, differentiation of EHV1-EHV4 in ELISA test «Svanova Biotech AB». *Proceedings of the 6th REVA Conference «Equine Diseases: Diagnosis, Prophylaxis, Treatment»*, Moscow, Russia, 2005, p.5.

27 Telford E.A.R., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A. & Davison A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, 79, 1197–1203.

28 Castro ER, Arbiza J. Detection and genotyping of equid herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech*. 2017 Dec;36(3):799-806. doi: 10.20506/rst.36.3.2715.