



# Genetisk typning av ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1)

En studie av svenska stammar

---

*Genetic typing of equine herpesvirus-1 (EHV-1): A study of Swedish strains*

Johan Öhrmalm

Självständigt arbete • 30 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet  
Uppsala 2022





# Genetisk typning av ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1) – En studie av svenska stammar

*Genetic typing of equine herpesvirus-1 (EHV-1) isolates – A study of Swedish strains*

Johan Öhrmalm

<b>Handledare:</b>	<b>Mikael Berg, professor i veterinär virologi, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap</b>
<b>Bitr. handledare:</b>	Gittan Gröndahl, VMD, tf statsveterinär, Statens veterinärmedicinska anstalt
<b>Bitr. handledare:</b>	Harindranath Cholleti, PhD, postdoktor, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
<b>Examinator:</b>	Johanna Lindahl, VMD, docent, Uppsala Universitet, Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
<b>Omfattning:</b>	30 hp
<b>Nivå och fördjupning:</b>	Avancerad nivå, A2E
<b>Kurstitel:</b>	Självständigt arbete i veterinärmedicin
<b>Kurskod:</b>	EX0869
<b>Program/utbildning:</b>	Veterinärprogrammet
<b>Kursansvarig inst.:</b>	Institutionen för kliniska vetenskaper
<b>Utgivningsort:</b>	Uppsala
<b>Utgivningsår:</b>	2022
<b>Omslagsbild:</b>	April 4mulaone (SWE), foto Johan Öhrmalm
<b>Nyckelord:</b>	Ekvint herpesvirus 1, EHV-1, virusabort, PCR, sekvensering, fylogenetiskt träd

## **Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1) är ett vanligt virus som infekterar hästar världen över. Viruset orsakar flera kliniska former av sjukdomen; feber, respiratorisk form, abort, neonatal död samt centralnervös form. I Sverige diagnosticeras omkring 10–30 utbrott per år på Statens veterinärmedicinska anstalt, SVA. Under 2019 drabbades ett antal stall i Stockholms län av den centralnervösa formen. Flera hästar avlivades som en följd av detta, medan vissa hästar uppvisade inga symptom alls. Vidare drabbades hoppeliten i Europa av ett stort utbrott i samband med tävlingar i Valencia vårvintern 2021. Ett 80-tal hästar insjuknade och många uppvisade den centralnervösa formen av sjukdomen varav 18 dog.

Flera studier har påvisat ett samband mellan centralnervösa symptom och virusstammar med en typisk genetisk markör, mutation ORF30 A2254G. Denna leder till ett aminosyraskifte, N752D, i virusets DNA-polymeras. Dock finns fall av centralnervös form där markören saknas. Det finns också exempel på det omvända, där markören finns men viruset endast orsakar den lindrigare respiratoriska formen.

Genom att kartlägga olika avsnitt av virusets genom (öppna läsramar) kan epidemiologiska studier göras i syfte att smittspåra. Denna studie undersökte mutationer och de olika virusstammarnas inbördes släktskap, det vill säga en fylogenetisk kartläggning, hos 85 EHV-1-positiva isolat. Målpopulationen definierades som svenska hästar som under de senaste 10 åren testat positivt för EHV-1 oaktat form; abort, respiratorisk såväl som centralnervös form.

Trots litet studiematerial påträffades flera nya mutationer som tidigare inte har rapporterats. Troligtvis finns fler cirkulerande virusstammar som ännu inte har påvisats. För att kunna göra användbara fylogenetiska strukturer krävs ytterligare kartläggning av virusstammar.

I samtliga fall där isolat från fler än en häst från samma utbrott sekvenserats uppvisade isolaten identiska sekvenser. Det talar för att hästar smittar varandra med nytt virus vid ett utbrott och inte att latent virus återaktiveras hos flera hästar samtidigt. Dubbla stammar av EHV-1 hos den enskilda hästen inte är ovanlig, och det indikerar att hästar återinfekteras trots tidigare genomgången infektion.

I Valencia-utbrottet 2021 påträffades en ny mutation. Det går inte att fastställa att den mutationen orsakade den svåra symptombilden. Förklaringen kan ligga i det faktum att hästtäteten i stallarna vid tävlingarna i Valencia var mycket hög, och därmed bidragit till ökat smittryck. Isolat från Valencia innehöll inte N752D-mutationen.

Isolat från Stockholmskommunerna Österåker respektive Värmdö 2019 sekvenserades och jämfördes. Då isolat från de två stallen hade olika mutationer (läsramarna ORF34 och ORF11) avfärdade denna studie spekulationer om att dessa utbrott hade ett samband. Båda hade dock D752-mutation. I övrigt visade det sig svårt att klargöra ifall identiska isolat från flera anläggningar hade kopplingar då det ofta är många hästar i stallarna och stor rörlighet bland dem (tävlingar, träningar, kliniker etc.). Det går att fria samband mellan utbrott, men det är svårare att fälla.

Unika mutationer som påvisats vid fler än ett utbrott kunde ses endast hos travhästar eller ridhästar, aldrig både och. Förklaringen till detta ligger troligtvis i att detta är två skilda hästpopulationer med mycket lite samröre.

*Nyckelord:* Ekvint herpesvirus 1, EHV-1, virusabort, myeloencefalopati, PCR, sekvensering, fylogenetiskt träd

## Abstract

Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is a common virus disease among horses all over the world. The virus causes several clinical syndromes; mild to severe respiratory disease, abortion, neonatal death, as well as neurological disease. In Sweden, 10-30 outbreaks each year are diagnosed at the National Veterinary Institute, SVA. During 2019, several stables in Stockholm had neurological outbreaks. Many horses were euthanized, while other horses had no clinical signs at all. In 2021, an outbreak in Valencia, Spain, caused disease in about 80 horses, several with neurological signs, and 18 deaths in total.

Several studies have shown an association between neurological symptoms and virus strains with the genetic marker ORF30 A2254G. This mutation causes a shift in amino acid, N752D, in the DNA polymerase of the virus. However, neurological signs can be seen without this marker, and vice versa, the marker can cause mild respiratory symptoms, or no symptoms at all.

Investigation of different strains (open reading frames, ORF) can form a base for epidemiological studies, which can be used for tracing. This study has investigated the relationship of several strains, thus creating a phylogenetic map, in 85 EHV-1 positive isolates. The target population was defined as all Swedish horses during the last ten years that tested positive for EHV-1 in any form; abortion, respiratory, as well as neurological form.

Despite a relatively small number of samples, this study revealed numerous new mutations. Thus, there are several strains that are yet to be discovered. To develop useful phylogenetic structures, more strains need to be isolated and sequenced.

In all outbreaks, with several isolates from different horses, these had identical sequences. This suggests that horses infect each other with a new virus in an outbreak, rather than reactivation of latent virus in several horses at the same time. Two different strains of EHV-1 in a horse are not uncommon, and this indicates that horses are re-infected despite previous infection.

In Valencia 2021, a new mutation was discovered. It cannot be concluded that this mutation was the cause to the severe illness seen in many horses. The reason could be the high density of horses in the stables, which caused high infection pressure. Isolates from Valencia did not have the N752D-mutation.

Isolates from Österåker and Värmdö, respectively, outside Stockholm 2019, were sequenced. These large outbreaks at two different premises were thought to be connected to each other. However, isolates from horses from the stables had different mutations in ORF 34 and ORF11, which exclude any relation between the outbreaks. Both outbreaks had the N752D-mutation. In many cases, however, there were difficulties to conclude if identical isolates from different premises were connected. Large stables with many horses, and large movements among these horses, increase the number of routes of infection. Thus, it is easy to conclude that there is no connection between outbreaks (different sequences), but difficult to conclude a connection when outbreaks have the same sequence.

Unique mutations found in more than one outbreak could be seen from trotters or riding horses, never from both groups of horses. The explanation for this, probably, is that these populations are separated with low number of interactions.

*Keywords:* Equine herpesvirus, EHV-1, Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy, EHM, PCR, sequencing, phylogenetic tree.

# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Introduktion</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Litteraturoversikt</b> .....	<b>12</b>
2.1. Allmänt om herpesvirus och EHV-1 .....	12
2.1.1. Herpesvirusets uppbyggnad .....	12
2.1.2. Herpesvirusets egenskaper .....	13
2.1.3. Ekvint herpesvirus 1, EHV-1 .....	14
2.1.4. Prevalens .....	14
2.2. Kliniska tecken hos EHV-1-infekterade hästar .....	15
2.2.1. Respiratoriska formen, rhinopneumonit .....	15
2.2.2. Virusabort och neonatal infektion .....	15
2.2.3. Centralnervösa formen, ekvin herpesmyeloencefalopati .....	16
2.3. Patogenes .....	17
2.3.1. Infektionsport och respiratorisk sjukdom .....	17
2.3.2. Leukocyt-associerad viremi och vaskulit .....	19
2.3.3. Virusabort och skador på föl .....	19
2.3.4. Neurologiska skador och neurotropi .....	20
2.3.5. Latens .....	20
2.4. Behandlingar och prevention .....	20
2.5. Diagnostik .....	21
2.5.1. PCR .....	21
2.5.2. Serologi .....	21
2.5.3. Analys av cerebrospinalvätska .....	21
2.5.4. Histologisk analys .....	22
2.6. EHV-1-stammar och patogenicitet .....	22
2.7. Epidemiologisk utbredning .....	24
2.8. Genetisk och fylogenetisk analys .....	24
2.8.1. ORF30, virulent markör med mutationen A2254G .....	26
2.8.2. ORF34, epidemiologisk markör .....	28
2.8.3. ORF11, gen för fylogenetisk analys .....	28
2.8.4. Clades .....	28
2.8.5. Fylogenetiska träd .....	29
<b>3. Material och metoder</b> .....	<b>31</b>
3.1. Övergripande studiedesign .....	31
3.2. Prover från infekterade hästar .....	31
3.3. Sammanställning av remisser .....	32
3.4. PCR och sekvensering .....	33
3.4.1. Nukleinsyraextraktion, preparation av prover .....	33
3.4.2. Mastermix med primrar .....	34
3.4.3. PCR (klassisk) .....	35
3.4.4. Rening av prover och sekvensering .....	37
3.5. Fylogenetisk analys .....	38
3.5.1. Referenssekvenser .....	38
3.5.2. Konsensussekvenser .....	38

3.5.3.	Multiple Sequence Alignment .....	39
3.5.4.	Analys av mutationer i relation till sjukdom och plats .....	40
3.5.5.	Fylogenetiska träd.....	40
3.6.	Deskriptiv statistik och statistisk analys.....	40
<b>4.</b>	<b>Resultat.....</b>	<b>41</b>
4.1.	PCR och sekvensering.....	41
4.2.	Mutationer i ORF30 .....	44
4.2.1.	D752-varianten kopplad till centralnervös form .....	44
4.2.2.	Andra mutation i ORF30: T2225C och A2279G .....	45
4.3.	Mutationer i ORF34 .....	45
4.3.1.	Epidemiologisk analys av utbrotten i Stockholm 2019 .....	45
4.3.2.	Flertalet tidigare okända mutationer i ORF34.....	46
4.4.	Mutationer i ORF11 .....	49
4.4.1.	Isolat från utbrottet i Valencia 2021 .....	49
4.4.2.	Frekvent rapporterad mutation vanlig även i Sverige? .....	50
4.5.	Geografisk utbredning av mutationerna .....	53
4.6.	ORF30, ORF11 och ORF34 kombinerat .....	56
4.6.1.	Indirekt koppling mellan smittade hästar .....	56
4.6.2.	Abort hos travston.....	56
4.6.3.	Travhästar med olika symptom.....	57
4.6.4.	Utbrotten i Stockholm 2019 .....	57
4.6.5.	Ridhästar med abortform eller respiratorisk form .....	57
4.6.6.	Ridhästar med centralnervösa symptom .....	57
4.6.7.	Mutationer i ORF34/ORF11 beroende av N/D-mutation? .....	58
4.7.	Epidemiologiska data från remisser .....	58
4.7.1.	Förändring över tid (2011–2021) .....	58
4.7.2.	Ålder.....	59
4.7.3.	Raser .....	59
4.7.4.	Kön.....	61
<b>5.</b>	<b>Diskussion och slutsatser .....</b>	<b>62</b>
5.1.	Diskussion .....	62
5.1.1.	Identiska sekvenser tyder på dubbla stammar .....	62
5.1.2.	Flertalet tidigare okända mutationer .....	62
5.1.3.	Övriga mutationers påverkan på virulens .....	63
5.1.4.	Spridning av olika stammar .....	63
5.1.5.	Epidemiologiskt separerade hästpopulationer.....	64
5.1.6.	Utbrotten i Stockholm 2019 .....	64
5.1.7.	Ston mer drabbade? .....	64
5.1.8.	Standard för smittspårning.....	65
5.2.	Vad kunde gjorts bättre i denna studie?.....	65
5.3.	Förslag på framtida studier .....	66
5.3.1.	Fortsatt fylogenetisk kartläggning .....	66
5.3.2.	Prevalensstudie: Provtagning av avlivade hästar .....	66
5.3.3.	Koppling mellan virus och värd.....	66
5.3.4.	Orsakar D752-mutationen högre smittryck? .....	67
5.4.	Slutsatser.....	67
	<b>Referenser.....</b>	<b>69</b>
	<b>Tack .....</b>	<b>75</b>
	<b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>	<b>76</b>



## Förkortningar

A	Kvävebas Adenin
Ab4	Högvirulent isolat av EHV-1 (jmf V592)
C	Kvävebas Cytosin
CD4	Cluster of Differentiation 4
Clade	Monofyletisk grupp, naturlig grupp, med gemensam anfader
CNS	Centrala nervsystemet
CSF	Cerebrospinal fluid, cerebrospinalvätska
CTPL	Cytotoxiska T-cellsprekursorer
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Dubbelsträngat DNA
EHM	Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy
EHV-1	Ekvint herpesvirus 1, orsakar bl.a. virusabort och EHM
EHV-4	Ekvint herpesvirus 4, orsakar endast respiratorisk sjukdom
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
G	Kvävebas Guanin
gB	Glykoprotein B
KI	Konfidensintervall
MSA	Multiple Sequence Alignment
ORF	Open Reading Frame, öppen läsram
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Realtids-PCR
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt
T	Kvävebas Tymin
V592	Lågvirulent isolat av EHV-1 (jmf Ab4)



# 1. Introduktion

Ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1) är en mycket vanlig virussjukdom hos hästar världen över (OIE, 2021). I Sverige diagnosticeras omkring 10–30 utbrott per år på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA, 2021). Viruset har global spridning i hästpopulationen och orsakar flertalet kliniska syndrom, från mild till allvarlig respiratorisk sjukdom, aborter, neonatal död hos föl, korioretinit samt neurologisk sjukdom (Paillot *et al.*, 2008). Den anses även vara en av de viktigaste hästsjukdomarna ur ekonomisk och klinisk synvinkel (OIE, 2021).

Det vanligaste är att EHV-1 orsakar respiratorisk sjukdom, men ibland uppträder aborter och den centralnervösa formen (Paillot *et al.*, 2008). Den centralnervösa formen benämns i engelsk litteratur ibland för Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy, EHM. Denna form är anmälningspliktig i Sverige vid klinisk misstanke och ska anmälas av den kliniska veterinären till länsveterinären (SJVFS 2021:10). Övriga former är anmälningspliktiga vid bekräftad laboratediagnos.

Under 2019 drabbades ett antal stall i Mellansverige av den centralnervösa formen. Flera hästar avlivades som en följd av detta, medan vissa hästar inte fick några symptom alls<sup>1</sup>. Vidare drabbades hoppeliten i Europa av ett stort utbrott i samband med tävlingar i Valencia vårvintern 2021 (FEI, 2021). Ett 80-tal hästar insjuknade, många med den centralnervösa formen; 18 hästar dog.

Flera studier har påvisat ett samband mellan centralnervösa symptom och virusstammar med en typisk genetisk markör, mutationen ORF30 A2254G. ORF30 A2254G är en så kallad icke-synonym mutation, det vill säga den leder till ett aminosyraskifte. I detta fall N752D i DNA-polymeraset. Dock finns fall av neurologisk sjukdom där markören saknas (Nugent *et al.*, 2006). Det finns också exempel på det omvända, där markören finns men viruset endast orsakar den lindrigare respiratoriska formen.

Genom att genetiskt kartlägga olika stammar av ett virus kan epidemiologiska studier göras, till exempel för spårning av virusstammar vid utbrott och på så sätt undersöka hur smittan kom in i och spred sig i ett stall. Denna typ av studier har tidigare aldrig gjorts i Sverige. Syftet med denna studie var att genetiskt kartlägga EHV-1 genom svenska prov som insamlats av SVA vid olika utbrott under tio år, samt att kunna besvara frågor kring smittspridning av EHV-1. Studien undersökte också om det finns speciella virusstammar eller markörer för EHV-1 som kan kopplas till de olika sjukdomsbilderna.

---

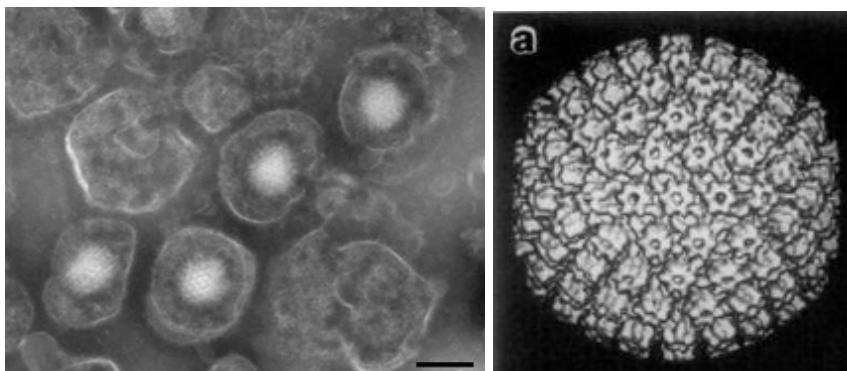
<sup>1</sup> Personlig kommunikation med Gittan Gröndal, tf statsveterinär, SVA, 2021.

## 2. Litteraturoversikt

### 2.1. Allmänt om herpesvirus och EHV-1

#### 2.1.1. Herpesvirusets uppbyggnad

*Herpesviridae* är en familj dubbelsträngade DNA-virus, dsDNA (klass 1 i Baltimore-schemat) som infekterar alla typer av ryggradsdjur. Viruset, som är ett av de mest komplexa och största virus vi känner till, består av en lipidhöljeförsedd (enveloped) ikosahedral kapsid med peplomerer (spikes). Kapsiden är uppbyggd av 960 subenheter av 16 olika typer. Hela viruspartikeln, virionen, är ca 200 nm i diameter, medan kapsiden är ca 100 nm. Se Figur 1.



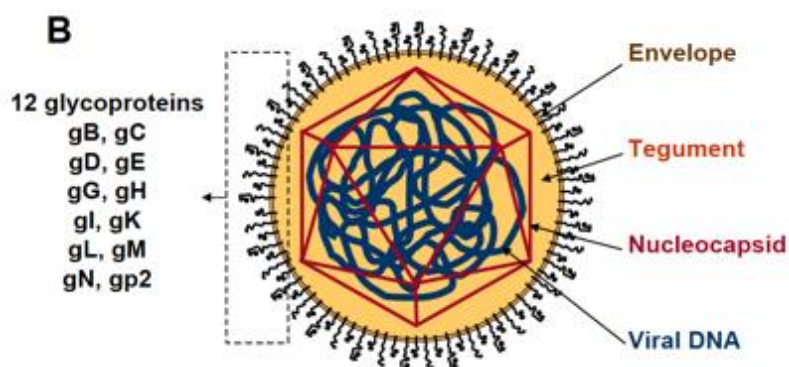
Figur 1. Till vänster: Negativ färgning av ett herpesvirus med den inkapslade ikosahedraala kapsiden. Det svarta strecket är 100 nm. Förstoring 100,000. (Courtesy of Erskine L. Palmer, CDC.) (Goldsmith et al., 2009). Publicerad med tillstånd av *Clinical microbiology reviews*. Till höger: Tredimensionell rekonstruktion av kapsiden hos herpes simplex-virus 1, HSV-1 (Newcomb et al., 1993). Publicerad med tillstånd av Elsevier.

Det linjära dubbelsträngade DNA:t består av 125.000-240.000 baspar. Utrymmet mellan lipidhöljet och kapsiden, tegumentet, innehåller tolv virala proteiner och enzymer som har till uppgift att initiera replikationen (Dimmock et al., 2007; Paillot et al., 2008). Replikationen sker inne i värdcellens cellkärna och viruset kan ligga latent hos värdjuret under lång tid (Dimmock et al., 2007).

Familjen *Herpesviridae* delas upp i tre underfamiljer: *Alpha-*, *Beta-* och *Gammaherpesvirinae*. *Alphaherpesvirinae* kan i sin tur delas upp i släkten (genus): *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* och *Iltovirus* (Dimmock et al., 2007).

EHV-1 tillhör underfamiljen *Alphaherpesvirinae* och släktet *Varicellovirus* (Paillot *et al.*, 2008).

På alla virus som tillhör *Alphaherpesvirinae* sitter elva typer av glykoproteiner på ytan (se Figur 2) som har olika uppgifter (se Tabell 1) (Paillot *et al.*, 2008). Hästens herpesvirus, EHV-1 och EHV-4, har dessutom ytterligare ett glykoprotein, gp2, med okänd funktion. Glykoprotein B, gB, kodas av ORF33 (Shakya *et al.*, 2017) som användes för epidemiologiska syften i denna rapport.



Figur 2. Struktur av EHV-1 (Paillot *et al.*, 2008). Publicerad med tillstånd av författaren<sup>1</sup>.

Tabell 1. Glykoproteiner på höljet hos EHV-1

Glyko-protein	Funktion	Glyko-protein	Funktion
gB	Cellpenetration, spridning mellan celler	gC	Adherans, utträde
gD	Cellpenetration, spridning mellan celler	gN	Process av gM
gM	Cellpenetration, spridning mellan celler	gH	Okänd funktion
gK	Spridning mellan celler, virusutträde	gG	Okänd funktion
gE	Spridning mellan celler	gL	Okänd funktion
gI	Spridning mellan celler	gp2	Okänd funktion

## 2.1.2. Herpesvirusets egenskaper

Herpesvirus är ubikvitära (Dimmock *et al.*, 2007), det vill säga allmänt förekommande. Samtliga kända herpesvirus kan orsaka en livslång latent infektion hos värdjuret. För att åstadkomma detta kan viruset antingen uttrycka ett lytiskt program där nya viruspartiklar produceras och sprids vidare, alternativt ett latensprogram där viruset gömmer sig för immunförsvaret. Nyinfekterade djur får en akut infektion som producerar nya virioner och som kan ge kliniska symptom. I latent tillstånd förändras genomet från en linjär till en cirkulär episomal form inne i cellkärnan (Bryant *et al.*, 2018), likt plasmider i bakterier. I det latent stadium är viruset fortfarande aktivt inne i värdcellerna (Dimmock *et al.*, 2007). Vissa viruskodade produkter, så kallade "Latency Associated Transcripts", uttrycks, men inga antigener (Tizzard, 2013). Immunförsvaret kan därmed inte upptäcka herpesviruset. Den latent infektionen är alltid subklinisk (Dimmock *et al.*, 2007). För att få kliniska symptom krävs en återaktivering av det latent viruset, vilket kan ske

<sup>1</sup> Privat e-postmeddelande från Roman Paillot 2021-09-20.

vid till exempel vid stress eller nedsatt immunförsvar. Vid återaktivering av viruset kan värdjurets immunförsvar reagera tidigare än vid den initiala infektionen, vilket trycker tillbaka viruset och man kan få en subklinisk infektion eller mildare symptom än tidigare (Tizzard, 2013). Immunförsvaret kan aldrig eliminera herpesviruset, utan infektionen är obotlig.

Flera herpesvirus kan delta i utvecklingen av tumörer, till exempel vid Mareks sjukdom hos hönsfåglar kan T-cellslymfom utvecklas (Dimmock *et al.*, 2007). Inga artiklar om hästens herpesvirus som predisponerade faktor för tumörutveckling kunde påträffas.

### 2.1.3. Ekvint herpesvirus 1, EHV-1

Totalt har nio herpesvirus påvisats hos hästdjur (familjen Equidae) varav fem herpesvirus har isolerats från hästar (EHV-1 till EHV-5) och tre från åsnor (EHV-6 till EHV-8) (Garvey *et al.*, 2018). Det nionde viruset, EHV-9, har oklart ursprung; naturliga värdjur föreslås vara gasell, zebra och/eller noshörning. Innan 1981 trodde man att det respiratoriska viruset EHV-4 var samma virus som EHV-1, men då kunde det visas att de var två olika virus även om de är genetiskt och antigeniskt lika (Studdert *et al.*, 1981). Ekvina herpesvirus tillhör samma släkte (*Varicellovirus*) som orsakar vattkoppor och bältros hos människa (Dimmock *et al.*, 2007).

EHV-1 (och EHV-4) har förmåga att infektera ett stort antal celltyper, till exempel respiratoriska epitelceller, olika leukocyter, lymfatiska celler, vaskulära endotelceller och neurala celler (Paillot *et al.*, 2008). Celler kan infekteras direkt av fritt virus, men också genom cell-cell-kontakt där infekterade celler för över virus till nya celler. Mer om EHV-1 och dess patogenes beskrivs i kapitel 2.3 och 2.8.

Första infektion sker i regel under de första 18 levnadsåren (Gilkerson, 1999). Det är visat att virusutsöndring kan ske vid återaktivering av latent EHV-1-infektion (Slater *et al.*, 1994).

### 2.1.4. Prevalens

EHV-1 förekommer endemiskt över hela världen (Quinn *et al.*, 2011). I de länder där undersökningar har gjorts bär en stor andel av hästpopulationen latent på EHV-1. En brasiliansk studie visade att prevalensen av latent EHV-1 från slaktade hästar var så hög som 88 % (Carvalho *et al.*, 2000). En senare amerikansk studie av fullblodshästar visade att 25,7 % hade virus i lymfatisk vävnad eller i *N. trigeminus* (Pusterla *et al.*, 2012). Samma studie påvisade också dubbla stammar av EHV-1 hos 56 % av hästarna. Detta tyder på att EHV-1-smitta från annan häst som utsöndrar virus är möjlig trots att mottagande häst redan är latent infekterad.

En australiensisk studie påvisade antikroppar mot EHV-4 hos fullblodshästar i 100 % av fallen (Crabb & Studdert, 1995). Vad gäller antikroppar mot EHV-1 visade en annan australiensisk undersökning av 229 ston att prevalensen av antikroppar (med ELISA) mot EHV-1 var omkring 26 % (Gilkerson *et al.*, 1999). En turkisk studie visade att 14,5 % av hästarna var seropositiva (Ataseven *et al.*, 2009). Antikroppar mot EHV-1 bryts ner snabbt (månader) (OIE, 2017), vilket kan förklara den lägre prevalensen av antikroppar än latent virus. Det är av denna anledning vanligt med återinfektion. Vi vet att antikroppar mot EHV-1 snabbt minskar i serum, vissa på några månader, andra inom ett år (Oladunni *et al.*, 2019).

## 2.2. Kliniska tecken hos EHV-1-infekterade hästar

Även om EHV-1 kallas hästens abortvirus, då det kan orsaka abort, kan detta aggressiva virus ge flera helt olika symptombilder (SVA, 2021): respiratorisk sjukdom, aborter, allmänt utbredd fatal sjukdom hos neonatala föl, samt neurologisk sjukdom i form av myeloencefalopati (Quinn, 2011). Oftast ses endast en av dessa symptombilder, men i sällsynta fall i kombination (Oladunni *et al.*, 2019). Lokal vaskulit, framför allt i lungor, placenta och CNS, är den huvudsakliga skadan som viruset orsakar och som ligger till grund för de olika sjukdomsbilderna (McGavin & Zachary, 2007). Utöver dessa symptombilder kan hästar även få ögoninfektion i form av konjunktivit (McGavin & Zachary, 2007), korioretinit och uveit (Allen *et al.*, 2004).

Oaktat vilken symptombild som sedan förlöper påbörjas infektionen av EHV-1 med feber som uppstår en till tre dagar efter infektion (Goehring *et al.*, 2010; Van de Walle *et al.*, 2009). Denna feber håller i sig från ett dygn upp till en vecka. Nasal virusutsöndring kommer igång under första dygnet efter infektion och håller i sig 4–16 dagar.

### 2.2.1. Respiratoriska formen, rhinopneumonit

Respiratoriska symptom från EHV-1-infektion kan inte kliniskt särskiljas från det närbesläktade och mer vanliga herpesviruset EHV-4 (Quinn, 2011).

Äldre hästar får oftast milda eller subkliniska luftvägsinfektioner, medan yngre hästar drabbas av allvarligare luftvägssymptom (Paillot *et al.*, 2008b). Sekundära bakteriella infektioner med muköst nosflöde, hosta och/eller bronkopneumonier är vanliga (Quinn, 2011). Om inga sekundära komplikationer uppstår läker infektionen ut inom två veckor.

Den förvärvade immuniteten från genomliden sjukdom håller endast en kortare tid; fyra till åtta månader, men ibland så kort tid som under tre månader (Paillot *et al.*, 2008; Quinn, 2011). Hästens immunologiska svar mot EHV-1 beror på många faktorer; tidigare genomgången infektion, olika Major Histocompatibility Complex (MHC) etc. (Oladunni *et al.*, 2019).

### 2.2.2. Virusabort och neonatal infektion

Dräktiga ston som infekteras av EHV-1 kan abortera i sen dräktighet, sista fyra månaderna (Quinn, 2011). Ett sto med latent EHV-1-infektion som återaktiveras kan orsaka abortstorm i ett avelsstall hos icke-immuna ston (Quinn *et al.*, 2011). Ett sto som tidigare drabbats av kastning utlöst av EHV-1 påverkar inte efterföljande dräktighet eller fertilitet. Ston som drabbas av abortformen uppvisar oftast inga andra kliniska sjukdomstecken; i en tysk studie på 15 dräktiga ston som kastat uppvisade endast fyra ston feber som enda symptom utöver abort (Damiani *et al.*, 2014), men exempel finns på kombination med centralnervösa symptom (Oladunni *et al.*, 2019).

Om stoet smittas nära partus kan fölet födas levande (Quinn, 2011; McGavin & Zachary, 2007). Fölet utvecklar då ofta interstitiell pneumoni och andra viremiska vävnadsskador (lever, lungor, binjurar), vilket leder till att fölet dör tidigt.

### 2.2.3. Centralnervösa formen, ekvin herpesmyeloencefalopati

Centralnervösa formen av EHV-1-infektion, på engelska Equine Herpesvirus Myeloencefalopathy (EHM), är den minst vanliga formen (Quinn, 2011). Det drabbar främst vuxna hästar. Den förekommer vid utbrott av respiratoriska formen eller vid virusabort. Den kan även drabba zebra (McGavin & Zachary, 2007).

Utöver feber, letargi och inappetens kan den centralnervösa formen ge allt från lätta symptom som lindrig ataxi till svårare symptom som paralyser eller död (Quinn, 2011). Oftast ses svaghet och bristande koordination i bakdelen samt nedsatt svans- och analtonus (Henninger *et al.*, 2007), samt urininkontinens (Pusterla *et al.*, 2016). Ödematösa bakben förekommer ofta (SVA, 2021), men det är ett vanligt symptom vid virusinfektion i allmänhet och är inte patognomont för just centralnervös form av EHV-1<sup>1</sup>. De centralnervösa symptomen kommer cirka 6–10 dagar efter infektion, men ibland så snabbt som inom ett dygn (Slater, 2007).

En holländsk studie av nio utbrott visade att säsong, ras, kön, ålder och förekomst av feber (>38,5 °C i minst två dagar) påverkar prevalensen av centralnervös form (Goehring *et al.*, 2006). Ston, äldre hästar (över 15 år) och vissa raser löpte större risk att utveckla den centralnervösa formen av EHV-1 i denna studie.

- Vid *allvarliga* centralnervösa symptom var ston överrepresenterade med ett odds ratio på 3,8 (95 % KI 1,09–13,28) (Goehring *et al.*, 2006).
- Åldersgruppen 15-19 år innebar högre risk för centralnervösa symptom med ett odds ratio på 3,13 (95 % KI 1,30–7,52) (Klouth & Göhring, 2019).
- Feber är en riskfaktor för centralnervösa symptom och har ett odds ratio på 80 (95 % KI 8,45–756), och vid *allvarlig* neurologisk sjukdom 23,4 (95 % KI 2,15–255) (Goehring *et al.*, 2006).

Den centralnervösa formen av EHV-1 förekommer hela året, men studier visar att utbrott oftare uppstår under vinter och vår (november-maj), vilket förklaras med att hästar stallas in med tätare kontakt mellan hästarna (Goehring *et al.*, 2006).

Risken för centralnervös form har i olika studier skiljt sig åt för olika raser. Goehring *et al.* (2006) visar att kallblod, spanska raser och varmblodiga travhästar predisponerar utveckling av allvarliga centralnervösa symptom. En tysk studie med 140 hästar infekterade med EHV-1 har visat att fjording och varmblood löper större risk för EHM än populationen i stort, och ponnyraser lägre risk (Klouth & Göhring, 2019).

Andra riskfaktorer för centralnervös form av EHV-1 är hästens immunstatus. Låg nivå av cirkulerande cytotoxiska T-cellsprekursorer (CTLp), vilka är viktiga för skyddet mot viremi, har visats vara förknippade med ökad risk för centralnervös form av EHV-1 (Allen, 2008). Infekterade CD4+T-lymfocyter (regulator-T-celler) fungerar som virusbärare i den lytiska (replikerande) och den latent fasen av infektionen och tros därför vara relevanta för patogenesen (Goodman *et al.*, 2007).

Prognosen vid lindrig form av centralnervös form (lindrig ataxi) är god, de flesta hästar tillfrisknar helt (Van Maanen *et al.*, 2001). Om häst överlever sjukdom med svårare centralnervösa symptom är prognosen för fullt tillfrisknande dålig med kvarstående livslånga centralnervösa symptom.

---

<sup>1</sup> Personlig kommunikation med Gittan Gröndal, tf statsveterinär, SVA, 2021-12-10.

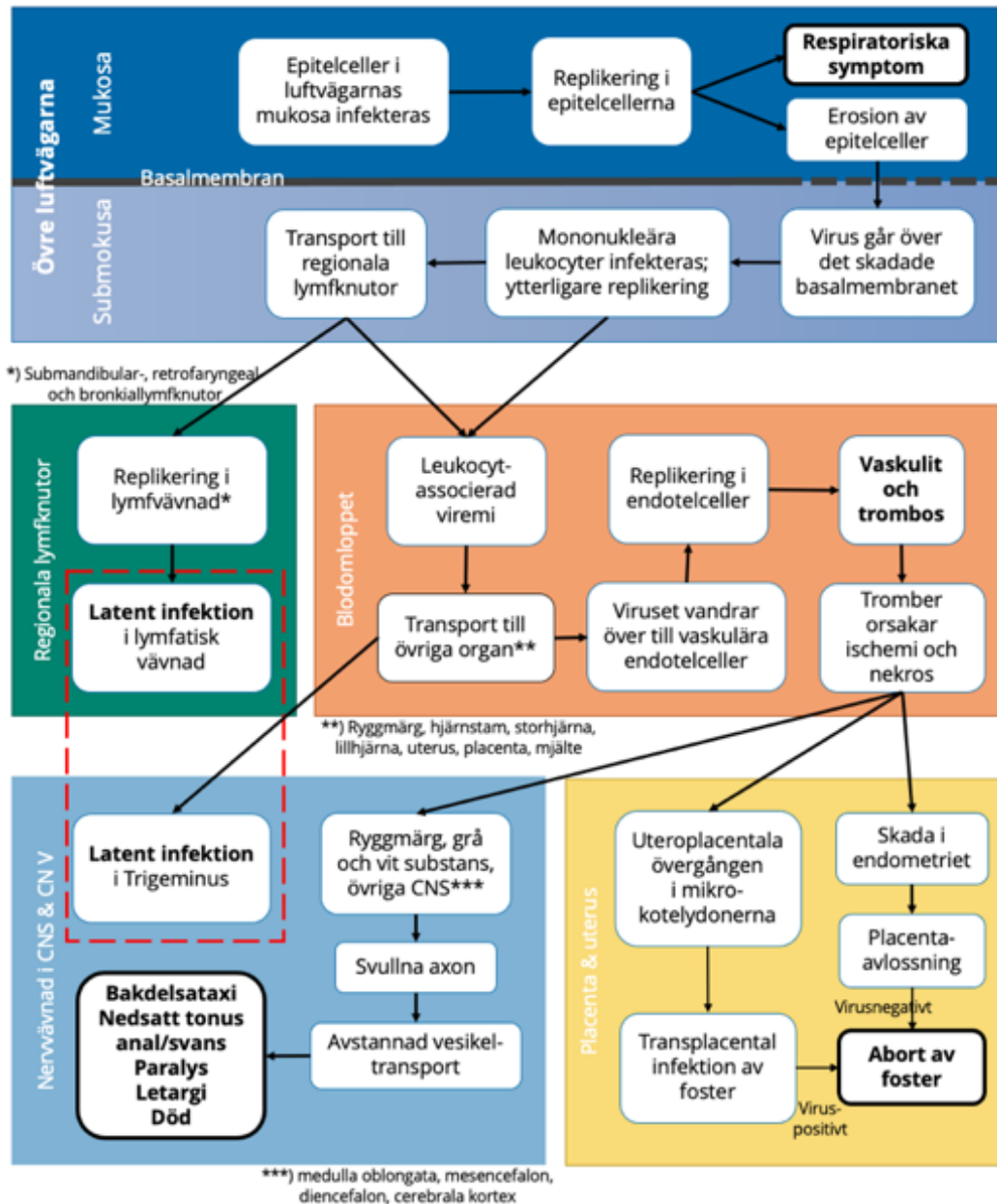


Några differentialdiagnoser till centralnervösa formen av EHV-1 är förgiftning av mögelsvamp eller mykotoxiner, ionoforförgiftning, botulism och virala encefaliter (Orsini & Divers, 2008).

## 2.3. Patogenes

### 2.3.1. Infektionsport och respiratorisk sjukdom

Hästar infekteras genom kontaktsmitta eller aerosoler från annan häst med respiratoriska symptom, nossekret, aborterat foster, placenta eller postpartala flytningar (Quinn *et al.*, 2011; Reed & Toribio, 2004). Föl smittas av sin mor eller av andra lakterade ston i sin närhet (Quinn *et al.*, 2011). Smitta kan också ske direkt mellan föl (Quinn *et al.*, 2011). Centralnervösa formen ses oftast samtidigt eller efter utbrott av aborter eller respiratorisk form av EHV-1 (McGavin & Zachary, 2007). Efter smitta sker spridning och replikering av viruset enligt patogenesen i Figur 3. De olika stegen beskrivs i efterföljande kapitel.



Figur 3. Patogenes EHV-1. För detaljer, se texten. Figur: Johan Öhrmalm.

Hästens näs- och munhåla utgör infektionsport för EHV-1 där epitelceller i slemhinnans mukosa infekteras (Paillot *et al.*, 2008). Viruset replikerar i ett flertal celltyper med start i luftvägarnas epitelceller. I huvudsak sker detta i de övre luftvägarna, men i viss utsträckning även i nedre luftvägarna (Edington *et al.*, 1994; Goodman *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2011). Vid replikering av EHV-1 i luftvägarnas epitelceller bildas plack ovanför mukosans basalmembran (Vandekerckhove *et al.*, 2010). Epitelcellerna eroderas också vilket skadar basalmembranet och banar väg för viruset (Oladunni *et al.*, 2019). Denna luftvägsinfektion leder till respiratoriska symptom hos hästen (Paillot *et al.*, 2008). Se överst i Figur 3.

### 2.3.2. Leukocyt-associerad viremi och vaskulit

Efter replikeringen i luftvägarna kan en leukocytassocierad viremi uppstå (Quinn *et al.*, 2011). Detta sker genom infektion av perifera mononukleära blodceller, främst T-lymfocyter och monocyter, i den lokala lymforetikulära lymfvävnaden (Paillot *et al.*, 2008). Dessa går därefter ut i blodbanan (Bryant *et al.*, 2018; McGavin & Zachary, 2007).

Leukocyterna infekteras genom cell-cell-kontakt med de infekterade epitelcellerna (Paillot *et al.*, 2008; Vandekerckhove *et al.*, 2010) eller direkt av cirkulerande virus som passerat det skadade basalmembranet (Oladunni *et al.*, 2019). Virusinfekterade mononukleära leukocyter i luftvägarna kan påträffas inom 24 timmar. Efter cirka två till tre dagar ses en leukocyt-associerad viremi, vilken kan hålla i sig i upp till tre veckor med en topp cirka åtta till nio dagar efter exponering (Allen *et al.*, 2006).

Via blodet transporteras virus till andra organ, bland annat centrala nervsystemet, placenta, livmoder och mjälte (Goodman *et al.*, 2007). Virus kan där vandra över från monocytorna till de vaskulära endotelcellerna, vilket gör att de undkommer cirkulerande antikroppar (Quinn *et al.*, 2011; McGavin & Zachary, 2007). Detta orsakar vaskulit och trombos, där tromberna leder till ischemi och nekros i vävnaden (Paillot *et al.*, 2008).

Det är främst vaskuliten och trombosen i vävnaden som orsakar sjukdomssymptomen vid kastning och den centralnervösa formen av EHV-1, inte infektion av de olika organens egna celler (McGavin & Zachary, 2007; Nugent *et al.*, 2006; Patel & Heldens, 2005; Quinn *et al.*, 2011).

### 2.3.3. Virusabort och skador på föl

Hos dräktiga ston sker vävnadsskador orsakade av vaskulit och trombos antingen i endometriet eller i den uteroplacental övergången i mikrokotelydonerna (McGavin & Zachary, 2007; Nugent *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2011). Tromber kan orsaka ischemiska skador i mikrokotelydonen som leder till snabb placentaavlossning och abort; fostret kan då fortfarande vara virusnegativt (Paillot *et al.*, 2008).

Ett annat utfall är att EHV-1 hinner överföras till fostret över placenta, vilket leder till infektion av flera organ hos fostret, till exempel lunga, lever och mjälte (Paillot *et al.*, 2008). Infektionen leder till abort och fostret blir viruspositivt. Skillnaden mellan dessa former är att placentaavlossning inträffar om skadan i endometriet är kraftig, medan mindre ischemiska skador på uterus leder till virusöverföring över uteroplacentalbarriären; både endometriet och fostret blir då viruspositiva.

Vid överföring av virus till fölet i sen dräktighet kan fölet födas levande och leva upp till ett fåtal dagar (Paillot *et al.*, 2008). Dödsorsaken är andnöd (pneumoni mm). Viruset invaderar och skadar även thymus och annan lymfoid vävnad hos fostret, där lymfocytolys uppstår i celler i germinala center (McGavin & Zachary, 2007).

### 2.3.4. Neurologiska skador och neurotropi

Vid centralnervös form av EHV-1 orsakar viruset vaskulit i endotelceller och trombos i de små blodkärlen i CNS vilket leder till ischemiska infarkter i nervvävnaden (McGavin & Zachary, 2007). Ryggmärg är predilektionsställe, både i grå och vit substans (myelomalaci) (Quinn *et al.*, 2011). Ischemiska skador ses även i medulla oblongata, mesencefalon, diencefalon och cerebrala cortex i hjärnan (McGavin & Zachary, 2007).

Det har beskrivits EHV-1-stammar som förefaller vara neuroropa (Oladunni *et al.*, 2019), men det är främst vaskuliten i CNS-vävnaden som orsakar sjukdom. Vaskuliten orsakar svullnad av axon och dilaterade myelinskidor i nervvävnaden i CNS, främst ryggmärgen, som i sin tur kan orsaka avstannad vesikeltransport (Bresgen *et al.*, 2012; Goodman *et al.*, 2007). Svullna axon eller dilaterade myelinskidor ses dock inte hos alla obducerade hästar med centralnervösa symptom (Goodman *et al.*, 2007).

### 2.3.5. Latens

Från den lokala lymfatiska vävnaden sker även transport av virus till regionala lymfknotor där ytterligare replikering sker och en latent infektion uppstår (Edington *et al.*, 1994; Goodman *et al.*, 2007; Paillot *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2011). Virus och/eller antigen kan påträffas i submandibular-, retrofaryngeal- eller bronkial-lymfknotor redan 12–24 timmar efter infektion (Paillot *et al.*, 2008b). Virus kan också orsaka latent infektion i *N. trigeminus* (Quinn *et al.*, 2011).

Den latent infektionen kan återaktiveras och orsaka kliniska symptom (Quinn *et al.*, 2011). Det anses vara en nyckelfaktor till initiering av nya utbrott av den centralnervösa formen (Paillot *et al.*, 2008).

## 2.4. Behandlingar och prevention

I Sverige behandlas hästar med EHV-1-infektion understödjande, till exempel med antiinflammatoriska preparat (SVA, 2021) som kortison. Utomlands har man prövat antivirala läkemedel (till exempel Valacyclovir) vilket har visat viss positiv effekt (Oladunni *et al.*, 2019).

De rekommendationer till stallägare som idag ges för att undvika utbrott av EHV-1 består av vaccination under dräktighet, separation av avelsston och yngre hästar samt sporthästar, samt isolering av besökande ston på stuterier (Garvey *et al.*, 2019). SVA rekommenderar att ett stall med kliniska fall av EHV-1 omedelbart isoleras, dräktiga ston hålles åtskilt och rutiner som minimerar spridning mellan hästarna införs (SVA, 2021). Kastade foster och tillhörande efterbörd är smittbärande; det som inte skickas in för analys ska grävas ner.

Efter utbrott av EHV-1 måste stallet först rengöras mekaniskt, därefter desinficeras (SVA, 2021). EHV-1 är höljeförsett och är därmed lätt att inaktivera med de vanligaste desinfektionsmedlen (SVA, 2021). Vid abort mockas stallet ut, strö och gödsel kan brännas, box rengörs med till exempel Virkon, och om abort sker i

hagen ska hagen därefter inte användas till dräktiga ston under fyra veckor<sup>1</sup>. Stoet kan betäckas igen efter sin andra brunst efter kastning (SVA, 2021).

Vaccin mot EHV-1 finns både i form av modifierat levande, inaktiverat såväl som avdödat virus (Quinn *et al.*, 2011). Befintliga vaccin har endast indikation mot abortformen och/eller mot rhinopneumoni (Bryant *et al.*, 2018), det vill säga ingen vaccintillverkare hävdar förebyggande effekt mot neurologisk sjukdom. Vissa vaccin skyddar mot både EHV-1 och EHV-4 (Quinn *et al.*, 2011). Oftast behövs flera doser för att uppnå ett bra skydd. Vaccination ger inte fullständigt skydd (SVA, 2021), men förväntas lindra symptom och minska risk för abort (Quinn *et al.*, 2011). Föl som får i sig antikroppar mot EHV-1 via råmjölken har bara skydd i mindre än fyra veckor, därefter har alla de maternella antikroppar brutits ner (Bresgen *et al.*, 2012).

## 2.5. Diagnostik

### 2.5.1. PCR

Diagnos av EHV-1 kan ske genom PCR av prov från nossekret, blod, foster eller efterbörd (Quinn *et al.*, 2011). I tidigt stadium av respiratorisk form kan nossvabb, nässvalgsvabb eller nässköljprov tas. PCR kan differentiera EHV-1 från EHV-4.

Vid leukocytassocierad viremi kan EHV-1 påvisas i helblod med PCR (Goehring, 2014). Vid kastningar kan virus påvisas i prov från efterbörd och i vissa fall även i organ från fostret.

Glykoprotein B, kodat av ORF33, är det målprotein som är vanligast och ger den mest sensitiva PCR-analysen vid klinisk diagnostik av EHV-1 (Goehring, 2014). Realtids-PCR är att föredra då sensitiviteten är högre än konventionell PCR.

PCR från CSF kan också användas, men andelen falskt negativa är hög då det krävs leukocyter i vätskan och det inte alltid sker blodutträde till CSF (Goodman *et al.*, 2007).

### 2.5.2. Serologi

Serologi är en pålitlig metod för påvisande av pågående eller genomgången sjukdom (Goehring, 2014). Titerstegring av antikroppar i blodet efter infektion av EHV-1 är påtaglig (Quinn *et al.*, 2011). Vid utbrott kan en fyrfaldig titerstegring av antikroppar konfirmera EHV-1. Det är en pålitlig diagnostik, men det kräver parvisa prov (Goehring, 2014); proven måste analyseras vid samma laboratorium vid samma tillfälle<sup>2</sup>.

### 2.5.3. Analys av cerebrospinalvätska

En studie visade att hos över 50 % av hästar med centralnervösa symptom uppstod xantokromi (cerebrospinalvätskan, CSF, blir rosa eller gul), blodläckage till CSF samt hög proteinkoncentration utan pleocytos (ökning av celler) (Goehring, 2014).

<sup>1</sup> Dahlin, A.-M. (2019). Föreläsning i stogynekologi vid SLU, 7 nov 2019.

<sup>2</sup> Korrespondens med VMD Gittan Gröndahl, tf statsveterinär vid SVA, 2021-11-04.

Detta är dock inte patognomont för EHV-1, utan kan bero på andra neurologiska sjukdomar eller skador på CNS.

#### 2.5.4. Histologisk analys

På döda hästar kan histologisk analys av olika vävnader genomföras (McGavin & Zachary, 2007; Quinn *et al.*, 2011). Intranukleära inklusioner kan vid mikroskopering påträffas i leverceller vid hepatisk nekros i samband med virusabort, såväl som i den nasala mukosan vid den respiratoriska formen (McGavin & Zachary, 2007; Quinn *et al.*, 2011). Inklusionskroppar förekommer inte i nervvävnad vid centralnervös form, utan där ses primärt vaskulit och emellanåt till vaskuliten sekundära blödningar, tromber, plasmaproteiner och svullna axon (McGavin & Zachary, 2007). Vid genomgång av litteraturen har ingen histologisk bild påträffats som kan sägas vara patognomont för EHV-1.

Infekterade foster som fötts levande har mycket sällan hepatisk nekros, men däremot intranukleära inklusioner och fokal nekros i epitellagret i tarmarnas kryptor (Maxie, 2015). Hos aborterade foster har epitellagret i bronker och bronkioler nekrotiserats och innehåller ofta intranukleära inklusionskroppar.

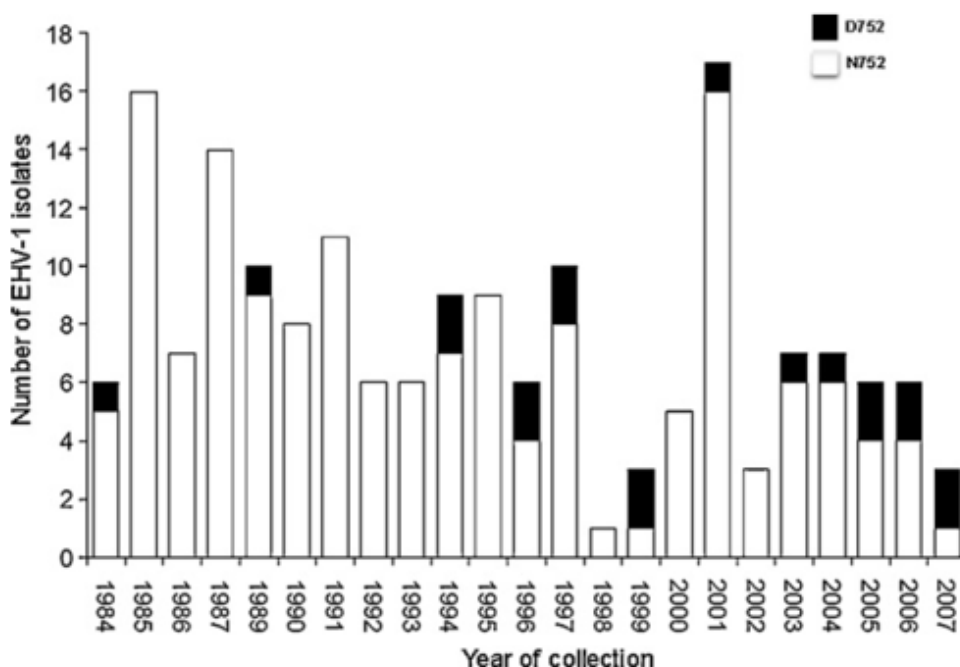
## 2.6. EHV-1-stammar och patogenicitet

Antalet stammar av EHV-1 är otaliga, men i fråga om patogenicitet kan viruset delas upp i två huvudsakliga stammar; en neuropatogen stam (referensisolat Ab4), som ofta ger allvarlig sjukdom med både abort och/eller centralnervösa symptom, samt en icke-centralnervös form (referensisolat V592) som oftast ger milda respiratoriska symptom, ibland aborter, men sällan centralnervösa symptom (Nugent *et al.*, 2006; Telford *et al.*, 1992). Den signifikanta mutationen som skiljer de två huvudstammarna åt återfinns i aminosyran i position 752 i DNA-polymeraset; aspargin (N) i den icke-neurologiska stammen omvandlas genom substitution till asparginsyra (D) i den neurologiska; betecknas N<sub>752</sub> respektive D<sub>752</sub> (Nugent *et al.*, 2006; Paillot *et al.*, 2008). Substitutionen orsakas av en mutation i virusets genom betecknad ORF30 A2254G, se vidare kapitel 2.8.1.

Det är alltså inte en fullständig koppling mellan stam och symptom. I en tidig studie härstammade 86 % av alla neurologiska utbrott från stammar med D<sub>752</sub> och 95 % av alla icke-neurologiska utbrott från stammar med N<sub>752</sub> (Nugent *et al.*, 2006). EHV-1 har ett stabilt genom och den genetiska skillnaden mellan stammarna är endast ca 0,1 % (Nugent *et al.*, 2006). Det finns ytterligare en beskriven neurologisk stam, OH03, upptäckt i isolat Ky T953 (Gardiner *et al.*, 2012; Mumford *et al.*, 1994).

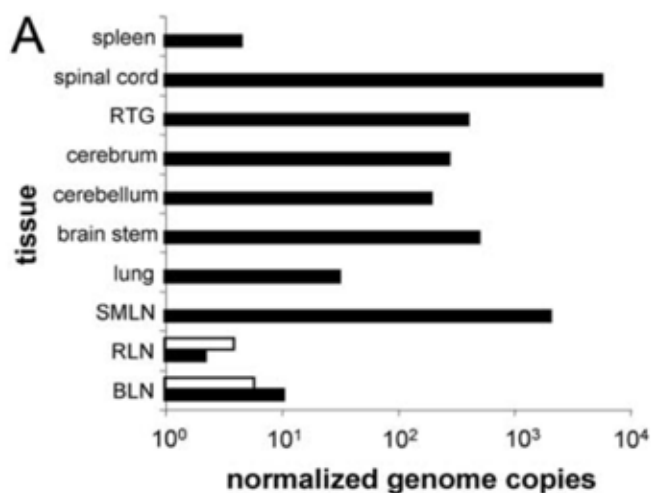
Vad gäller den neurologiska stammen visar en amerikansk studie att andelen av denna stam relativt den icke-neurologiska har ökat från cirka 3,6 % 1960 till cirka 13,3 % 1990 (Smith *et al.*, 2010). Denna ökande tendens håller i sig även idag. Exempel på detta från USA visas i Figur 4 (Perkins *et al.*, 2009). Det diskuteras att hästar drabbade av den mer virulenta mutationen D<sub>752</sub> utsöndrar mer virus under en längre tid, som tidigare nämnts beroende på ett effektivare DNA-polymeras, och därmed får en mer effektiv spridning (Garvey *et al.*, 2019). Det skulle kunna förklara den ökade andelen isolat med D<sub>752</sub>-mutation (Garvey *et al.*, 2019). Det

finns dock inga belegg för att virusutsöndring från den enskilda hästen skulle öka med denna mutation (Paillot, 2008).



Figur 4. I en retrospektiv studie från USA (1984-2007) visades en tydlig trend av ökat antal fall av genotypen D<sub>752</sub> (Perkins *et al.*, 2009). Publicerad med tillstånd av Elsevier.

D<sub>752</sub>-mutationen av EHV-1 har större benägenhet att infektera CD4<sup>+</sup> T-lymfocyter vilket föreslås öka virulensen (Goodman *et al.*, 2007), möjligtvis genom snabbare viral DNA-syntes. En studie visade att stammar med D<sub>752</sub> orsakade en lång kraftig viremi som ger en utbredd endotelcellsinfektion, medan stammar med N<sub>752</sub> orsakar en kort lindrig viremi med begränsad eller utebliven infektion i endotelcellerna (Nugent *et al.*, 2006). En annan studie visade att infekterade celler med neurologisk stam penetrerade luftvägsmukosans basalmembran snabbare (24 timmar) och var fler till antalet (två till fem gånger) jämfört med icke-neurologisk stam (36 timmar) (Vandekerckhove *et al.*, 2010). I en tredje studie påvisades en tidigare, kraftigare och längre leukocyt-associerad viremi hos neurogena stammar än hos icke-neurogena (Allen *et al.*, 2006). I ytterligare en studie visades att stammar med D<sub>752</sub> har högre förmåga att sprida sig till och infektera vaskulära endotelceller i livmoder och CNS (Bryant *et al.*, 2018). I Figur 5 ses vilken stam som påträffades, och i vilken viruskoncentration, i olika vävnader/organ. Allen *et al.* (2008) visade i en studie på 24 hästar som inokulerades med neurologisk stam av EHV-1 en 100 gånger högre cell-associerad viremi hos äldre hästar (>20 år) än hos yngre hästar (<15 år).



Figur 5. Viruskoncentration påträffade i olika vävnader uppdelade på neurologisk respektive icke-neurologisk stam. Vid infektion av EHV-1 med icke-neurologisk stam (vita staplar) påträffades virus i retrofaryngeallymfknotor (RLN) och bronkiallymfknotor (BLN). Vid infektion av neurologisk stam (svarta staplar) påträffades virus i ytterligare vävnader; mjälte, ryggmärg, högre trigeminiganglion (RTG), hjärnan, lillhjärnan, hjärnstammen, lungorna och i submandibularlymfknotorna (SMLN) (Goodman *et al.*, 2007). Publicerad i enlighet med PLOS regelverk.

## 2.7. Epidemiologisk utbredning

Virus från olika hästar inom samma utbrott visades sig i en studie ha genetiskt identisk profil, medan virus isolerade från olika tillfällen, men samma anläggning, skiljde sig åt (Garvey *et al.*, 2019). Garvey *et al.* (2019) drar därför slutsatsen att nyintroduktion av smitta utifrån är vanligare än återaktivering av latenta infektioner hos hästar i stallet.

Ett examensarbete från 2019 sammanställde svenska fall av EHV-1-utbrott under åren 2016–2018 baserat på statistik från Jordbruksverket (Faring, 2019). Abortformen förekom i 16 indexfall och centralnervösa formen i 9 indexfall. EHV-1 rapporterades under denna period endast i södra och mellersta Sverige (upp till Gävleborg), aldrig i norra Sverige. 39 % av stoägarna vaccinerade sina dräktiga ston mot EHV-1.

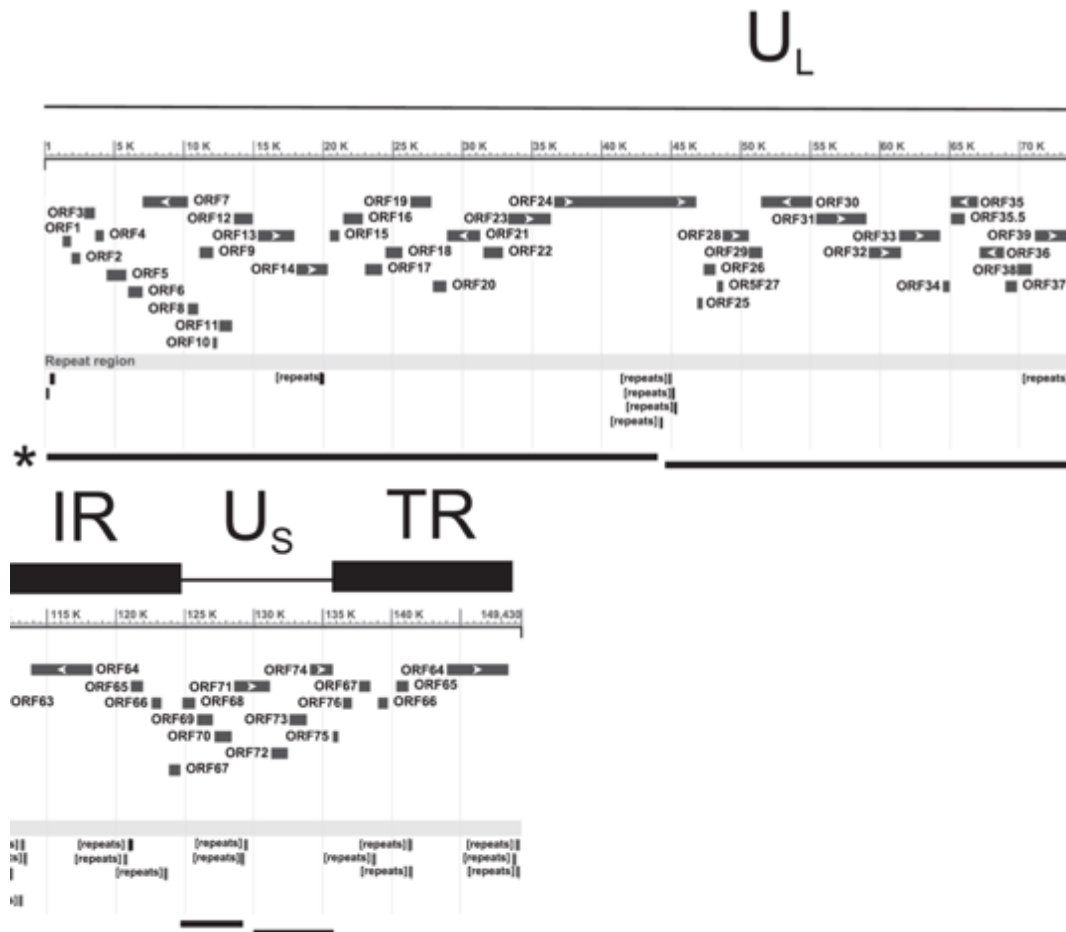
## 2.8. Genetisk och fylogenetisk analys

Genetiska studier har gjorts av EHV-1-virusets genom för att finna varianter som orsakar de olika symptombilderna. Som beskrivits ovan kan mutation ORF30 A2254G associeras med neurologisk form (Nugent *et al.*, 2006). Dock är inte kopplingen hundra procentig, utan denna SNP som är associerad till centralnervös form kan också ge enbart vanliga respiratoriska symptom, och vice versa (Nugent *et al.*, 2006). Exakt koppling mellan genetiken och symptombild är med andra ord ännu inte helt klarlagd.

En läsram, reading frame på engelska, beskriver hur baspar läses av i kodoner (tripletter av baspar) (Appling *et al.*, 2016). Open Reading Frame (ORF) är den del



av en läsram som kan translateras (stoppkodonet ger ingen aminosyra). Genomet hos EHV-1 kan delas upp i en unik lång region ( $U_L$ ) och en unik kort region ( $U_S$ ) samt repetitiva regioner (IR, TR) (Bryant *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2019), se Figur 6. Totalt innehåller genomet 80 olika ORF som kodar för 76 funktionella proteiner (och fyra repeterade proteiner) (Garvey *et al.*, 2019). De ORF:ar som undersöktes i denna studie återfinns i  $U_L$ .



Figur 6. Genstrukturen hos EHV-1 (Bryant *et al.*, 2018). Publicerad med tillstånd av John Wiley and Sons.

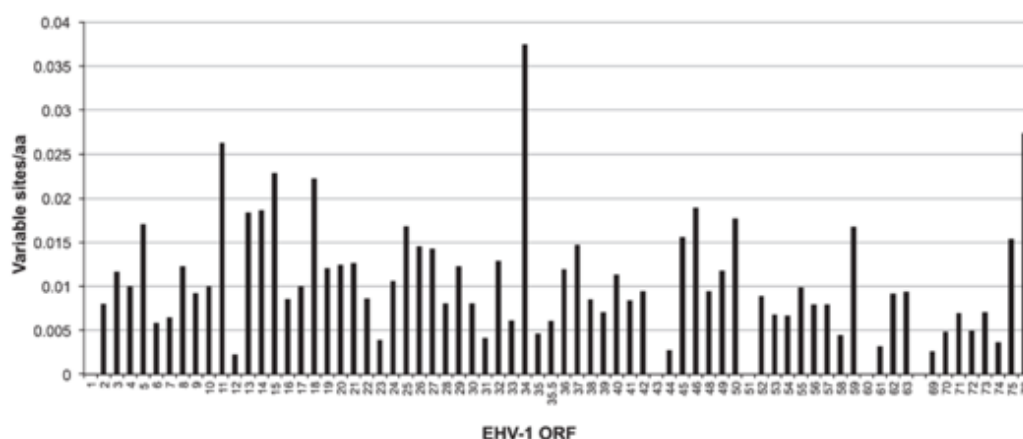
Forskare över hela världen har studerat SNP i olika ORF:ar i syfte att förstå virulensen hos EHV-1; ORF30 (Garvey *et al.*, 2019; Perkins *et al.*, 2009; Preziuso *et al.*, 2019; Nugent *et al.* 2006; Stasiak *et al.*, 2020; Sutton *et al.*, 2020), ORF68 (Garvey *et al.*, 2019; Preziuso *et al.*, 2019; Stasiak *et al.*, 2020), ORF34 (Bryant *et al.*, 2018; Preziuso *et al.*, 2019) och ORF11 (Bryant *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2019; Sutton *et al.*, 2021). Även andra ORF:ar har studerats i syfte att karakterisera olika stammar av EHV-1 och gruppera dessa varianter genom fylogenetisk analys.

Den genetiska variationen inom en ORF skiljer sig markant åt mellan ORF:ar (Bryant *et al.*, 2018). Vissa ORF:ar är konservativa, medan andra har en hög mutationsgrad (även om skillnaderna i absoluta tal är mycket små), se Figur 7. De som har störst variation, t.ex. ORF11 och ORF34, anses lämpa sig bättre för fylogenetisk analys än de mer konservativa.

De konservativa regionerna kan dock ha andra intressanta tillämpningar, såsom virulens (ORF30) eller diagnostik (ORF33). Den mutation som har associeras mest

till den centralnervösa formen av virusabort sitter, som tidigare nämnts, i ORF30 (Nugent *et al.*, 2006), se vidare kapitel 2.8.1. ORF33 utgör den vanligaste och mest sensitiva PCR-analysen vid klinisk diagnostik av EHV-1 (Goehring, 2014). Vid så kallad nestad PCR (se kapitel 3.4) av ORF33 detekteras både EHV-1 och EHV-4 av det första primerparet, medan endast EHV-1 detekteras med det andra primerparet.

Delar av ORF68 är polymorft och därför har det ansetts vara en bra epidemiologisk markör (Nugent *et al.*, 2006; Garvey *et al.*, 2019). Nugent *et al.* (2006) föreslog en gruppering av isolaten i sex grupper. Samma forskare har visat att olika grupper förekommer i olika regioner i världen, även om en viss överlappning föreligger. Däremot kunde isolat (n = 59) från neurologiska utbrott inte sorteras in i en enskild grupp. Preziuso *et al.* (2019) har visat att det finns en deletion på position 701-818 i ORF68 (ses bland annat i referensisolat V592) som ger ett kodonskifte med förändringar i efterföljande aminosyror (samtliga studerade 20 isolat hade detta kodonskifte). Detta omöjliggör klassificering. Inget av de undersökta isolaten kunde kategoriseras in i någon av de föreslagna grupperna, eller i några tidigare av andra forskare föreslagna grupper. ORF68 anses därmed mindre användbar för fylogenetisk analys.



Figur 7. Genetiska variationen i genomet hos EHV-1 fördelade i respektive ORF (Bryant *et al.*, 2018). Genomet är uppdelat i 76 ORF:ar (x-axeln) som var och en kodar för olika proteiner. På y-axeln visas andelen positioner i genomet där mutationer har påträffats. Publicerad med tillstånd av John Wiley and Sons.

### 2.8.1. ORF30, virulent markör med mutationen A2254G

ORF30 är ett konservativt segment i det virala genomet hos EHV-1 (Bryant *et al.*, 2018). Det kodar för DNA-polymeraset som har en central funktion hos viruset. Som tidigare nämnts finns en SNP, A2254G, i ORF30 som har visat sig vara en bra markör för patogenicitet (Nugent *et al.* 2006).

En intressant jämförelse med andra patogena herpesvirus för andra sjukdomar och djurslag visar att position 2254 i ORF30 är starkt konservativ och med få undantag kodar för asparbinsyra (D) (Nugent *et al.*, 2006). Alltså, den mindre virulenta formen av EHV-1, med N<sub>752</sub>, är en ”udda fågel” bland herpesvirus.

Det finns en statistiskt signifikant koppling mellan genotypen A2254G och neurologisk sjukdom samt hög virulens (Garvey *et al.*, 2019). Med hög virulens

avses här utbrott med flertal aborter och/eller neurologisk sjukdom. Virus med allelen G<sub>2254</sub> visade i en amerikansk studie ge 162 (95 % KI 35–742) gånger större risk (odds ratio) att vara associerad med centralnervösa symptom än den konkurrerande allelen A<sub>2254</sub> (Perkins *et al.*, 2009); och i en irländsk studie var den associerad med 27 (95 % KI 10–75) gånger högre risk (Garvey *et al.*, 2019). Trots denna starka koppling visade det sig att i den amerikanska studiens alla hästar med centralnervös form av EHV-1 hade 24 % (5 av 21 hästar) allelen A<sub>2254</sub> (Perkins *et al.*, 2009). Detta tyder på att en mutation i position 2254 i ORF30 inte är hela sanningen, utan fler faktorer styr utfallet av symptombild (se Figur 8).

	EHM	Respiratory or abortion	Total
ORF30 G <sub>2254</sub>	16	3	19
ORF30 A <sub>2254</sub>	5	152	157
Total	21	155	176

EHM = equine herpes myeloencephalopathy.

Figur 8. Antal EHV-1-isolat kategoriserade efter genotyp och kliniska tecken i en studie av 23 utbrott i USA (Perkins *et al.*, 2009). Den påvisar en signifikant koppling mellan G<sub>2254</sub> och centralnervös form, samt A<sub>2254</sub> och icke-centralnervös form, men det gäller dock inte alla utbrott. Publicerad med tillstånd av Elsevier.

Oavsett om viruset har genotyp A<sub>2254</sub> eller G<sub>2254</sub> kan det infektera lymfocyter och därmed ha potential att infektera det vaskulära endotelet i ryggmärgen (Perkins *et al.*, 2009). Det kan i sin tur leda till centralnervösa symptom. Mutationen A<sub>2254</sub>G har i flera studier visats vara signifikant associerad med (Allen & Breathnach, 2006; Nugent *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007):

- en snabb viral replikation
- infektion av CD4+T-lymfocyter
- hög nivå av viremi
- lång persistens

Den teori som har framförts kring varför aminosyra D<sub>752</sub> i DNA-polymeraset oftare skulle orsaka centralnervösa symptom är att den har associerats med *längre* duration av *högre* leukocyt-associerad viremi än N<sub>752</sub> (Allen & Breathnach, 2006; Van de Walle *et al.*, 2009). Oddsens att ett virus är hypervirulent (definierat som fler än en häst med centralnervösa symptom eller kastning) har uppskattats till cirka fem gånger högre om D<sub>752</sub> mutationen finns (Garvey *et al.*, 2019). Detta är alltså faktorer som tillsammans leder till högre överföring av virus från de mononukleära cellerna (monocyter, lymfocyter) i blodet till det vaskulära endotelet i ryggmärgen (Allen & Breathnach, 2006; Van de Walle *et al.*, 2009). Hästar infekterade med centralnervöst respektive icke-centralnervöst associerad stam av EHV-1 har visats utsöndra likartad mängd virus från nasalmukosan trots att stammarna associerats med olika patogenicitet (Goodman *et al.*, 2007).

En brittisk studie påvisade D<sub>752</sub>-mutationen i alla isolat (n = 78 unika utbrott) från hästar med centralnervösa symptom (Bryant *et al.*, 2018). Viruset hade också en virusstam med en unik substitution i aminosyreposition 250, från aminosyra histidin (H) till arginin (R). Det är inte klarlagt om denna har betydelse för patogenicitet.

2018 upptäcktes i Frankrike ytterligare en variant av SNP i position 2254 (Paillot *et al.*, 2020). Istället för A eller G påträffades nukleotid C<sub>2254</sub> vilket resulterar i aminosyra histidin, H<sub>752</sub>. Dock visade simulering av förändringen på DNA-polymeraset ingen eller mycket liten effekt på dess funktion (Sutton *et al.*, 2020). Vid ett utbrott i Frankrike 2018 med denna mutation fick ca 25 % av hästarna respiratoriska symptom, feber och ödem i bakbenen; 2 av 82 hästar fick centralnervös form varav en dog (Paillot *et al.*, 2020). Senare under 2020 visade en mindre experimentell studie där fyra welsh mountain-ponnyer infekterades ett snabbt förlopp för denna mutation med tydliga respiratoriska symptom som varade minst två veckor, med god virusutsöndring och cell-associerad viremi (Sutton *et al.*, 2020).

### 2.8.2. ORF34, epidemiologisk markör

ORF34 kodar för proteinet V32 vars funktion inte är helt utredd (Rybachuk, 2009), men det har en viss funktion i samband med virusets utträde ur cellen (Neubauer *et al.*, 2002).

Den mest variabla delen av EHV-1:s genom har påträffats i ORF34 (Bryant *et al.*, 2018; Preziuso *et al.*, 2019). Det bedöms därför som en viktig markör vid epidemiologiska studier (Preziuso *et al.*, 2019). Preziuso *et al.*, 2019, föreslår en indelning i tolv grupper, se Figur 9 i kapitel 2.8.5.

### 2.8.3. ORF11, gen för fylogenetisk analys

ORF11 kodar för ett tegumentprotein, VP22, bestående av 304 aminosyror (Okada *et al.*, 2015). VP22 har oklar funktion, men det finns tecken på att proteinet spelar en viktig roll vid replikation. VP22 deltar i produktionen av virion och kan eventuellt delta i RNA-transporten till icke-infekterade celler (Rubachuk, 2009). Proteinets interagerar med andra virala protein, cellproteiner hos värdcellen samt med kromatin (Wu *et al.*, 2020). Det finns ungefär 2000 exemplar av detta protein i varje virion. Det har dock ingen betydande roll för virulensen hos EHV-1 (Okada *et al.*, 2015).

ORF11 kan användas vid gruppering av virus vid fylogenetisk analys, det vill säga vid beskrivning av släktskap och evolutionär utveckling av EHV-1 (Garvey *et al.*, 2019). ORF11 är en av de mest variabla generna av genomet (Bryant *et al.*, 2018), se Figur 7. Det har också visat sig att ORF11 kan användas för spårning av EHV-1 från utbrottet i Valencia 2021 (Sutton *et al.*, 2021). I virus från detta utbrott upptäcktes en mutation, A713G, som inte påträffats tidigare. Denna mutation leder till en förändrad aminosyra i tegumentproteinets, från lysin till arginin (K238R). Från utbrottet i Valencia har det kunnat visas att denna stam har spridit sig (initialt) till tio andra länder utöver Spanien.

### 2.8.4. Clades

*Clade* betyder ”gren” och avser en undergrupp monofyletiska organismer (här: stammar av EHV-1) som har gemensamt evolutionärt ursprung genom en (monofyletisk) gemensam anfader. *Cladogram* är ett fylogenetiskt träd, se Figur 10 i kapitel 2.8.5. Unique long region, U<sub>L</sub>, och Unique short region, U<sub>S</sub>, av genomet hos

EHV-1 kan utnyttjas för gruppering i clades (Bryant *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2019) i syfte att ge kunskap om hur viruset spridits.

En av anledningarna till att EHV-1 är ett komplext virus med många stammar har föreslagits bero på att rekombination sker, inte bara mellan stammar av EHV-1, utan även mellan olika ekvina herpesvirus, till exempel mellan EHV-1 och EHV-4 (Bryant *et al.*, 2018). Bryant *et al.* (2018) har vidare föreslagit att hästar kan vara infekterade av flera stammar med EHV-1 då detta har upptäckts från isolat vid abort. Det är vid sådana tillfällen som rekombination av olika stammar skulle kunna ske.

Trots denna komplexitet krävs det endast sex ORF:ar för att skilja på tio clades (Garvey *et al.*, 2019). Detta kan göras i syfte att kartlägga virulenta stammar som orsakar centralnervös form av EHV-1.

U<sub>L</sub> Clade 7 identifieras med hjälp av ORF11 (R235M)<sup>1</sup>. Det är den numera enskilt största gruppen (Bryant *et al.*, 2018). ORF11 identifierar även virus i U<sub>L</sub> Clade 9<sup>1</sup>, som dock inte har påvisats hos några neurologiska (Garvey *et al.*, 2019).

Isolat förknippade med neurologisk sjukdom respektive abort återfinns i flera olika clades (Bryant *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2019). I en irländsk studie har man lyckats associera neurologisk sjukdom främst till U<sub>L</sub> Clade 1 och U<sub>L</sub> Clade 3 (Garvey *et al.*, 2019). Hypervirulens (definierat som fler än en häst med centralnervösa symptom eller kastning) kunde kopplas till U<sub>L</sub> Clade 1 och U<sub>L</sub> Clade 8. Det var också i dessa clades som förekomst av G<sub>2254</sub> var som störst.

ORF13 har två mutationer, A405T och A499T, vilka identifierar U<sub>L</sub> Clade 6 respektive U<sub>L</sub> Clade 8<sup>1</sup>. ORF30 tillsammans med ORF11 och ORF13 identifierar U<sub>L</sub> Clade 10 och U<sub>L</sub> Clade 11<sup>1</sup>. Virusstammen som rapporterades med den nya mutationen C<sub>2254</sub> (aminosyra H<sub>752</sub>) återfinns i U<sub>L</sub> Clade 10 (Sutton *et al.*, 2020).

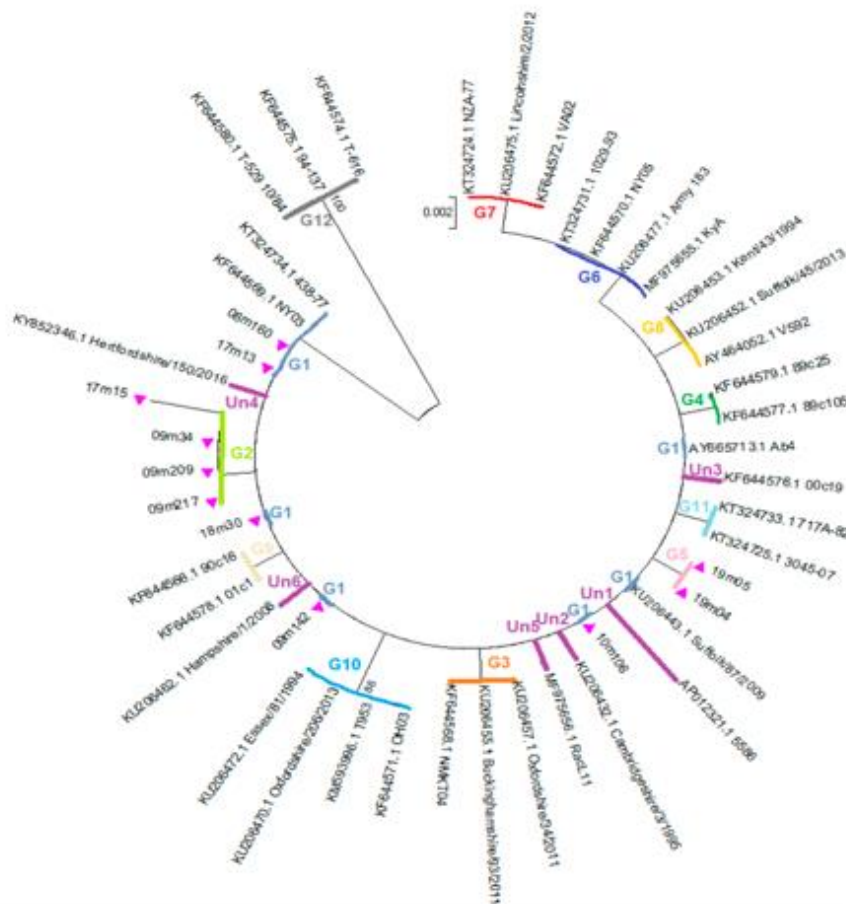
### 2.8.5. Fylogenetiska träd

Fylogenetiska träd kan byggas upp utifrån enskilda ORF. I Figur 9 ses prover från olika utbrott grupperade i tolv grupper utifrån deras nukleotidsekvens i ORF34 (Prezioso *et al.*, 2019). Avstånden mellan grupperna indikerar variationen av olika baser mellan de grupperna. Grupp 1 är den största gruppen; gruppen saknar mutationer utan består enbart av den vanligaste kvävebasen i respektive position i ORF34. Grupp 12 inkluderar isolat från zebra, onager och Thomsongazell.

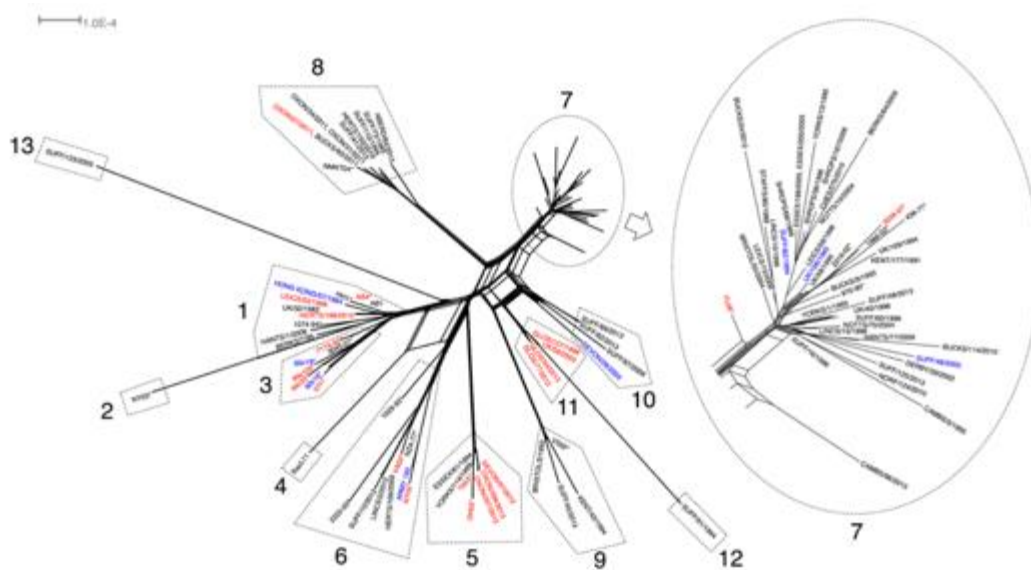
Fylogenetiska träd kan även byggas upp utifrån clades. Clades utgår från en kombination av flera ORF:ar, det vill säga de tar hänsyn till flera olika ställen på genomet i sin klassning, vilket ger en mer holistisk bild av det evolutionära ursprunget. I Figur 10 har stora delar av U<sub>L</sub> sekvenserats och analyserats för 20 isolat från Italien (Prezioso *et al.*, 2019). Clades kan säga mer om släktskap och kan ge en mer träffsäker epidemiologisk bild än studie av enskild ORF. Clades har potential att bli ett framtida verktyg för att spåra utbrott (Bryant *et al.*, 2018).

---

<sup>1</sup> Personlig kommunikation mellan Gittan Gröndahl, SVA, och Ann Cullinane, Irish Equine Centre [2021-05-25].



Figur 9. Fylogenetiskt träd av ORF34 som illustrerar italienska isolat ( $n = 20$ ) (rosa trianglar) från 12 olika stall (utbrott) åren 2008-2010 och 2017-2019 i de 12 grupperna (G) tillsammans med referensisolat från GenBank (Preziuso et al., 2019). Avståndet 0,002 motsvarar en Single Nucleotide Polymorfism (SNP). Publicerad i enlighet med MDPI:s regelverk.



Figur 10. Fylogenetiskt träd över EHV-1  $U_L$  ( $n = 75$ ). Ab4 ligger i  $U_L$  Clade 1 och V592 ligger i  $U_L$  Clade 9. En annan neurologisk stam, OH03, ligger i  $U_L$  Clade 5. (Bryant et al., 2018.) Publicerad med tillstånd av John Wiley and Sons.

## 3. Material och metoder

### 3.1. Övergripande studiedesign

I denna tvärsnittsstudie analyserades positiva EHV-1-prover från svenska hästar med luftvägssjukdom, spontanaborter och/eller centralnervösa symptom. Proverna har insamlats av SVA under åren 2011–2021. SVA:s positiva kontroll, ett prov från 1990-talet, inkluderades i studien.

Proverna preparerades inför PCR på SVA. SVA:s diagnostiska Realtids-PCR, RT-PCR, genomfördes på samtliga preparerade prover för att verifiera att virus fortfarande kunde detekteras i provet.

Klassisk PCR genomfördes därefter på SLU. Tre olika regioner, ORF11, ORF30 samt ORF34, i det virala DNA:t amplifierades med nestad PCR innan sekvensering, se kapitel 3.4. Primersekvenserna baserades på en publicerad studie av Preziuso *et al.* (2019; Tabell 4).

Sekvensering av PCR-produkter från varje prov och ORF genomfördes av MacroGen, Nederländerna. I programmet UGENE jämfördes sekvenserna med resultat från utländska studier registrerade i GenBank (NCBI, 2021). Analys genomfördes av särskilda mutationer i UGENE. Fylogenetiska träd konstruerades med hjälp av programmet MegaX.

Symptombild i dessa svenska fall inhämtades främst från remisser, men kompletterades i enstaka fall genom intervjuer med djurägare och/eller ansvarig veterinär.

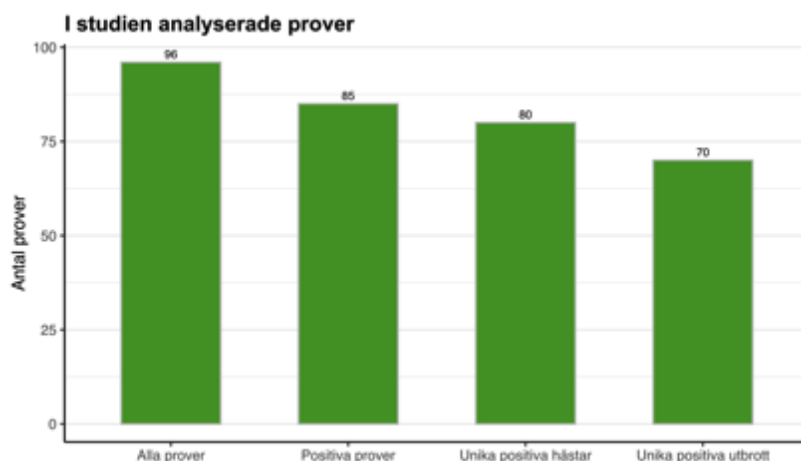
### 3.2. Prover från infekterade hästar

SVA har under 2011–2021 samlat prover från hästar diagnostiserade med EHV-1. Initialt preparerades 96 av dessa, men 11 prover valdes bort i ett senare skede av studien (Se Figur 11):

- Åtta prov visade sig vara negativa vid RT-PCR-analys av de preparerade proverna (troligtvis låg virusnivå vid preparation och/eller att virus brutits ner under förvaring).
- Tre prover kom med av misstag, de var negativa redan vid ursprungliga PCR-testerna (efterkontroll av hästar som varit i Valencia 2021).

Vissa prover är tagna från samma häst och vissa prover kommer från olika hästar på samma stall, se Figur 11. PCR och sekvensering genomfördes på samtliga prover, även då de kom från samma häst eller stall. Vid den statistiska analysen sorterades resultat från samma häst bort.

Ett utbrott definieras som minst en sjuk häst i ett stall under samma år. Då det rörde sig om fler hästar i samma utbrott användes resultat från samtliga hästar i vissa statistiska analyser (till exempel symptom), medan i andra fall togs bara en häst från varje utbrott med (till exempel mutationer). Se Tabell 7.



Figur 11. Statistik över prover som använts i denna studie.

Till de återstående 85 proverna adderades två prover som tidigare hade helgenomsekvenserats. En del av genomet (ORF30) för vissa prover hade sekvenserats tidigare för A2254G-mutationen. Samtliga 87 prover återfinns i Tabell 7 i Kap 4.7.

Proverna utgjordes av olika material; nässvabb, blod, foster, fosterhinnor, placenta, organ från foster eller avlidna föl såsom lungor, hjärna, lever, mjälte, njurar etc. Efter preparationen gavs varje prov en unik beteckning för lättare hantering vid genomförandet av PCR och sekvensering. Se Tabell 7.

Vid fall av abort hade prov tagits från efterbörden såsom fosterhinnor och placenta, och i vissa fall från flera organ från fostret/fölet. Ofta poolades dessa prov vid extraheringen. I Tabell 7 anges samlingsnamnet "kastningsmaterial" (Kastn). Vid fall med respiratoriska symptom fanns oftast en nössvabb (87,5 % av fallen), eller mer sällan blodprov (12,5 %). Vid fall med centralnervösa symptom fanns blodprov (57,1 %) och/eller nössvabb (42,9 %).

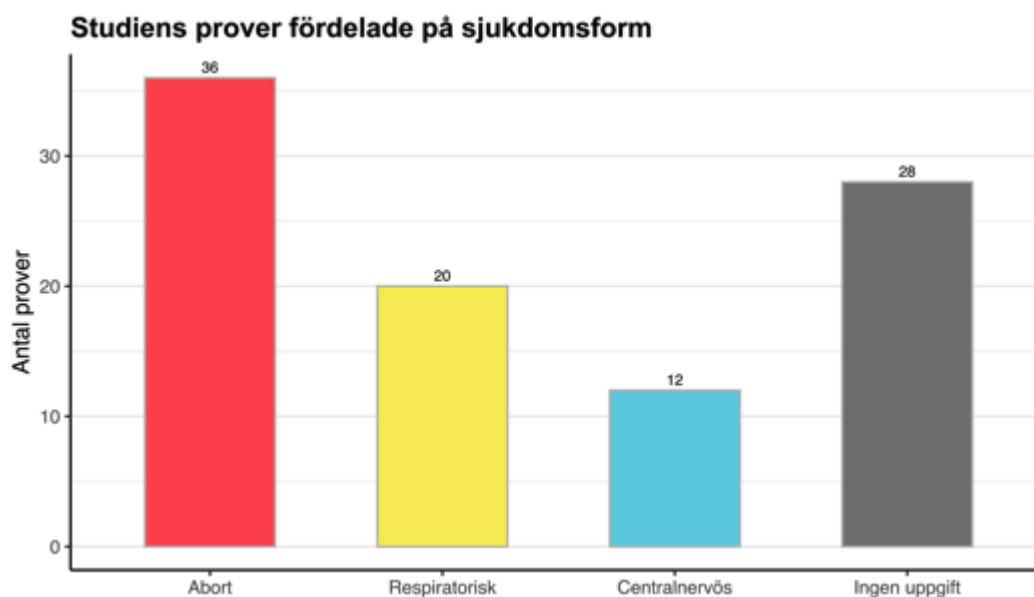
### 3.3. Sammanställning av remisser

Information om årtal för provtagning, provmaterial, hästens kön, ålder, ras, uppställningsplats (kommun, län), klinisk diagnos (respiratorisk, abort- eller centralnervös form) enligt behandlande veterinär sammanställdes från remisser och/eller K4-blanketter som hörde till proverna. K4-blankett används av SVA för att rapportera anmälningspliktig sjukdom till Jordbruksverket. Se sammanställning i Tabell 7. Några prover saknade remiss, men viss information kunde ändå tillfogas;



om provet kommer från kastningspaket antas klinisk diagnos vara abort och kön på hästen sto. I studien ingick en häst från Norge och fem från Spanien.

Sjukdomar kategoriserades i de tre grupperna abortform, respiratorisk form respektive centralnervös form av EHV-1. Diffusa kliniska symtombilder som feber och ödematösa bakben kategoriserades som respiratorisk form. Vid de utbrott där det förekom hästar med respiratorisk och hästar med centralnervös form kategoriserades utbrottet som centralnervöst. I de fall ett sto som kastat även uppvisade centralnervösa symptom räknades detta som två fall i statistiken. Fördelningen mellan de olika diagnoserna ses i Figur 12.



Figur 12. Kliniska former av EHV-1-infektion bland studiens 96 prover inkomna till SVA under åren 2011-2021 (samt ett prov från 1990-talet).

Uppgifterna kompletterades i enstaka fall genom telefon- eller mejlkontakt med hästägare och/eller behandlande veterinär. Ofullständiga eller tvetydiga data sorterades bort.

## 3.4. PCR och sekvensering

### 3.4.1. Nukleinsyraextraktion, preparation av prover

Inför PCR-analys preparerades proverna på SVA. TANBead Maelstrom 9600 Nucleic Acid Extractor är det system som användes på SVA för att rena fram DNA och RNA från bl.a. virus. Tekniken går ut på att binda den negativt laddade nukleinsyran till mikroskopiska metallkulor. En magnetisk stav suger åt sig metallkulorna med nukleinsyror och därefter kan rester sköljas bort med olika lösningar. På så vis erhålls ett koncentrat av nukleinsyror som därefter kan användas i PCR. Till TANBead Maelstrom 9600 hör ett kit med lösningar, IndiMag Pathogen Kit.

Blod och organdelar svabbades med vanlig bomullstopps och topsen stoppades i en buffertlösning (ca 850 µl). Buffertlösningen var en s.k. TE-buffert (Tris och

EDTA) som har till uppgift att lösa nukleinsyror (DNA och RNA) och samtidigt skydda dem från nedbrytning. Tris är en pH-buffert och EDTA binder joner.

En PCR-platta med 96 brunnar förbereddes med 20 µl Proteinase K per brunn. Proteinase K bryter ner celler och virusproteiner för att få ut nukleinsyror. Proteinase K medföljde IndiMag Pathogen Kit. Därefter pipetterades 200 µl av respektive prov till brunnarna. Protokoll fördes över vilket prov som sattes i vilken brunn.

Vid extraktion av nukleinsyror med TANBead Maelstrom användes en guanidin-buffert (ACB) för att lysera celler och virus. Resterna sköljdes bort med två lösningar (AW1, AW2). Till sist användes en lösning (AVE) som får nukleinsyror att släppa från de magnetiserade metallkulorna. Den slutliga produkten, eluatet, är därmed klar för PCR.

Innan leverans till SLU repeterades SVA:s egna EHV-1 PCR-test (realtids-PCR av glykoprotein C<sup>1</sup>, ORF16) för proverna. Den preparerade PCR-plattan med eluat frystes in i -70 °C inför vidare analyser på SLU.

### 3.4.2. Mastermix med primrar

Primrar till PCR förbereddes i en så kallad mastermix med olika reagenser, se Tabell 2. Vid olika tillfällen användes olika volymer mastermix (kolumnerna 1x 25 µl respektive 1x 50 µl i Tabell 2). Till denna adderades 2,5 µl (1x 25 µl) alternativt 5 µl (1x 50 µl) av eluatet med viralt DNA från respektive prov.

Tabell 2. Reagenser för mastermix

Reagenser	Slutlig koncentration	1x 25 µl	1x 50 µl
Vatten, nukleas-fritt		16,25	32,5
10x PCR buffert II	1x	2,5	5,0
10 mM dNTP mix	0,2 mM	0,5	1,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	15 mM	1,5	3,0
10 µM Forward primer	0,3 µM	0,75	1,5
10 µM Reverse primer	0,3 µM	0,75	1,5
Amplitaq Gold DNApol (5 U/µl)	2,5 U (ej konc)	0,25	0,5
Totalt		22,5	45

Nukleas-fritt vatten utgjorde basen för lösningen. PCR buffert II är en buffert med basiskt pH, K<sup>+</sup> för att gynna hybridiseringen (eng. *annealing*), samt andra komponenter som behövs för processen. Dioxynukleosidtrifosfat, dNTP, utgör byggstenar för DNA-molekylen med de olika baserna Adenin, Cytosin, Tymin och Guanin, betecknade dATP, dCTP, dTTP respektive dGTP. MgCl<sub>2</sub> är en kofaktor till DNA-polymeraset och behövs för att förstärka aktiviteten. Forward- och reverseprimrar utgör start respektive stopp för den givna DNA-sekvens som ska amplificeras. Amplitaq Gold DNA polymerase är ett värmestabilt polymeras med god ”proof reading” (det vill säga introducerar inga felaktigheter) som är katalysatorn för processen vid tillverkning av nya DNA-strängar.

De frysta reagenserna tinades långsamt på is under ca 30 min. dNTP levereras i koncentrationen 25 mM och späddes därför till 10 mM innan mix. Primrarna

<sup>1</sup> Korrespondens med Tomas Jinnerot, forskningsingenjör vid mikrobiologen på SVA, e-post 2021-09-16.

levererades i koncentrationen 100 µM och spädes till 10 µM innan mix. Reagenserna utom primrarna mixades i den ordning som anges i Tabell 2.

För varje prov blandades mastermix med de två för provet aktuella primrarna (forward och reverse). Till mastermix med primrar adderades de preparerade DNA-proven och blandades med pipetten.

Primrar som användes för respektive ORF och hybridiseringstemperaturer vid PCR-körningar framgår av Tabell 3. Primersekvenserna testades i Nucleotide BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) mot EHV-1, EHV-4 och ospecificerade sekvenser (bland annat från hästens genom). Samtliga primerpar visade sig binda bra till EHV-1 och den aktuella läsramen.

En av forward-primrarna till ORF11, ORF11\_F1, binder även in till EHV-4. Motsvarande reverse-primer, ORF11\_R1, binder dock inte in till EHV-4. Då både forward- och reverse-primrar måste binda in för att kunna amplifiera ett DNA-avsnitt kunde amplifiering av EHV-4 uteslutas.

ORF11\_R1 och ORF11\_F2 binder även in till EHV-8 som tidigare var känt som åsnans AHV-3 (SVA, 2021). EHV-8 är närbesläktat med EHV-1 och har associerats med luftvägsproblem och spontanabort hos häst (SVA, 2021). De prover som användes i denna studie hade redan diagnostiserats med EHV-1 av SVA, och därmed kunde vi sluta oss till att det var EHV-1 som sekvenserades, och inte EHV-8.

Tabell 3. Primrar för respektive ORF.

Gen	Primer	Sekvens (5'-3')	Antal baspar	Hybr. Temp
ORF11	ORF11_F1	CCGATACGTGGCGTAGACG	908	58 °C
	ORF11_R1	ACCGGAATTCGTGTCGTCG		
	ORF11_F2	TGGCTGTAACGATGCTAACG	842	
	ORF11_R2	TTACATTTTCAGGGATCGCCG		
ORF30	F8	GTGGACGGTACCCCGGAC	380	62 °C
	R2	GTGGGGATTTCGCGCCCTCACC		
	F7	GGGAGCAAAGGTTCTAGACC	256	
	R3	AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG		
ORF34	1058F	GGCCCCAAGGATATTTAAGC	855	60 °C
	1893R	GTTTGAGGCGGTTACGTCAG		
	1090Fi	CCGAGGTTTCATCCTCATTC	714	
	1784Ri	GCGGACATATTCGTGTCTCA		

### 3.4.3. PCR (klassisk)

Inför analys med PCR förbereddes PCR-maskinen (Applied biosystems ProFlex PCR System) med en termoprofil, det vill säga ett program med temperaturförändringar, se Tabell 4. Steg 2–4 repeterades i 35 cykler.

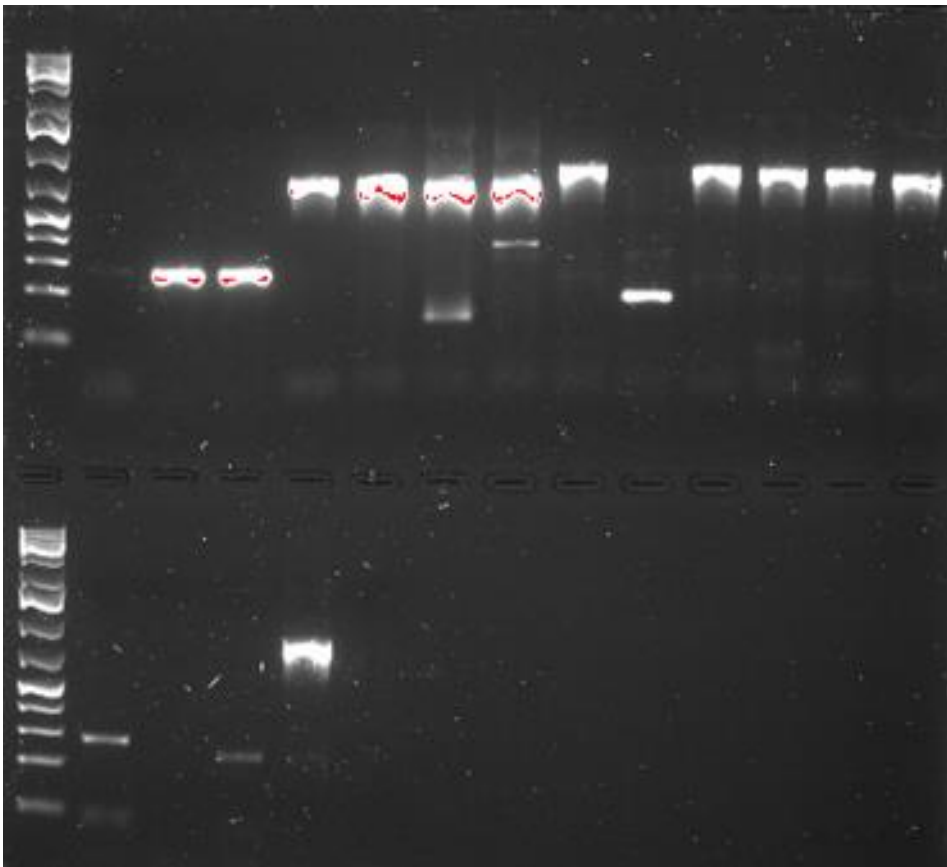
Tabell 4. Termoprofil för PCR-analysen.

Steg	Temperatur	Tid
1. Initiering	95 °C	10 min
2. Denaturering	95 °C	15 sek
3. Hybridisering	58-62 °C	30 sek
4. Elongering	72 °C	1 min/kb
5. Slutlig elongering	72 °C	5 min
6. Uppehåll	4 °C	(Timmars)

Hybridiseringstemperaturen varierade med primrarna, se Tabell 3. Den låg på eller strax under primrarnas respektive smälttemperatur. Smälttemperaturen kunde uppskattas genom formeln  $T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T)$  där G, C, A och T är antalet kvävebaser i primersekvensen. Hybridiseringstemperaturen anpassades efter den primer av de två primrarna som hade lägst smälttemperatur.

Elongering är steget där ny DNA-sträng syntetiseras. Tiden anpassades efter längden på PCR-produkten, en minut per tusen baser, men minst en minut.

Efter PCR testades produkten på en Agarose-gel (1,2 %) i syfte att kontrollera att processen har fungerat och att termoprofilen var korrekt. Agarose-gel bereddes med 0,84 g Agarose-pulver som blandades med 70 ml 1xTBE-buffert och värmdes i mikrovågsugn i ca två min tills pulvret löst sig helt. När Agarose-lösningen hade svalnat något adderades 3 µl GelRed. GelRed interagerar med DNA:t och används för att visualisera DNA-banden på gelen. Gellösningen hölls i en gelbox där den fick stelna i ca 20 min. Den färdiga gelen placerades i elektroforesmaskinen (VWR Mini Gel II). 3-5 µl av varje prov mixades med 2 µl av 6xDNA Loading Dye som krävs för att se provets vandring i gelen under elektroforesen. Mixen placerades i brunnar i gelens överkant. Slutligen sattes 1-2 µl av 1 kb DNA Ladder Plus i en brunn bredvid proven, vilken har till uppgift att skapa en referens baserat på DNA-sekvensens storlek.



*Figur 13. Elektrofores på PCR-produkter. Om bandet för respektive prov bedömdes som tillräckligt starkt i förhållande till bakgrundsbruset ("smear") sekvenserades produkten. Om inget eller svagt band syntes sekvenserades inte PCR-produkten. Om fler band för ett prov sågs eller om bakgrundsbruset var stort i förhållande till signalen, bedömdes det som värt att sekvensera efter att PCR-produkten stansats ut från en Agarose-gel (1,6–2,0%).*

I de fall där inget, eller endast ett svagt, band syntes på gelen genomfördes en andra PCR, så kallad nested PCR, för att öka antalet DNA-kopior och öka specificiteten. Efter den nestade PCR:en, om fler än ett tydligt band av önskad storlek kunde ses, sattes all PCR-produkt i en 1,6 % eller 2,0 % Agarose-gel; bandet i den nya gelen stansades ut och gelen tvättades bort i den kommande reningsprocessen (kapitel 3.4.4). Tydliga band med lågt bakgrundsbrus ("smear") som låg rätt i förhållande till DNA-stegen och avsaknad av andra band, skickades för sekvensering. Se exempel på elektrofores för PCR-produkter i Figur 13.

Innan PCR kördes på de proverna utvärderades primrarna med positiva kontroller (1A, 2H och 11G). Mängden DNA-prov, hybridiseringstemperaturer och andra faktorer i PCR-processen justerades tills goda resultat erhöles, dvs. en specifik amplifiering av önskad sekvens. När PCR-protokollet var justerat och primrarna testade genomfördes PCR på samtliga prover.

I de fall där tveksamma resultat erhöles gjordes PCR:en om för dessa prover. Om samma svar erhöles ansågs provet vara positivt och sändes för sekvensering. I annat fall togs provet bort från resultatet.

#### 3.4.4. Rening av prover och sekvensering

Innan sekvensering renades de önskade DNA-sekvenserna fram i de PCR-amplifierade proverna. Reningsprocessen eliminerar risken för kontaminanter som primrar, dNTP etc. För detta användes GeneJet PCR Extration Kit.

I de prov som var utstansade från Agarose-gel (när det fanns andra band utöver det eftersökta på gelen) tillsattes 600 µl bindningsbuffert, följt av ca 10-15 min autoklavering i 58 °C tills gelen löst upp sig i bufferten. 700 µl av den upplösta gelen placerades i en GeneJET purification column och centrifugerades i 12 000 x g i 60 s. Bindningsvätskan som passerat filtret med provet hölles av och resten av den upplösta gelen placerades i sin kolumn och centrifugerades igen. Bindningsvätskan hölles av.

I övriga prov tillsattes bindningsbuffert i ungefär lika delar (30-45 µl) efter att proven pipetterades till filtret i en GeneJET purification column. Därefter centrifugerades kolumnerna i 12 000 x g i 60 s.

670 µl tvättbuffert pipetterades i kolumnerna som därefter centrifugerades i 12 000 x g i 60 s. Tvättbufferten hölles av och kolumnerna centrifugerades ytterligare en gång i 12 000 x g i 60 s.

Kolumnerna placerades i autoklaverade 1,5 ml mikrocentrifugtuber. 20-30 µl elutionbuffert placerades mitt på filtret i kolumnerna. Efter 2 min väntan centrifugerades kolumnerna i 12 000 x g i 120 s. I detta steg lossar DNA:et från filtret och hamnar som ett eluat i botten på mikrocentrifugtuberna. Kolumnerna kastades.

För sekvensering krävs att aktuella primrar tillsätts respektive prov. Två autoklaverade 1,5 ml mikrocentrifugtuber per prov preparerades med 5 µl forward-respektive reverse-primer (10 pmol/µl).

Eluatet fördelades i tre 1,5 ml mikrocentrifugtuber; två i de med primrar preparerade tuberna för sekvensering, 5 µl prov var, och resten sparades i en tub för framtida studier. Tuberna för sekvensering märktes upp med etiketter från sekvenseringsföretaget MacroGen innan transport till Nederländerna. Resultat erhöles inom två arbetsdagar.

## 3.5. Fylogenetisk analys

### 3.5.1. Referenssekvenser

För den fylogenetiska analysen krävs att de funna sekvenserna jämförs med tidigare referenssekvenser. Det finns några sekvenser som ofta används inom forskningen:

- AY665713.1 (Ab4), neurologisk stam
- AY464051.1 (V592), icke-neurologisk stam
- MF975656.1 (RacL11), stam från 1950-talet som orsakade abort
- KU206477.1 (Army 183), respiratorisk stam från 1941
- DQ180735.1 (US99\_3\_2), har mutation A2279G i ORF30

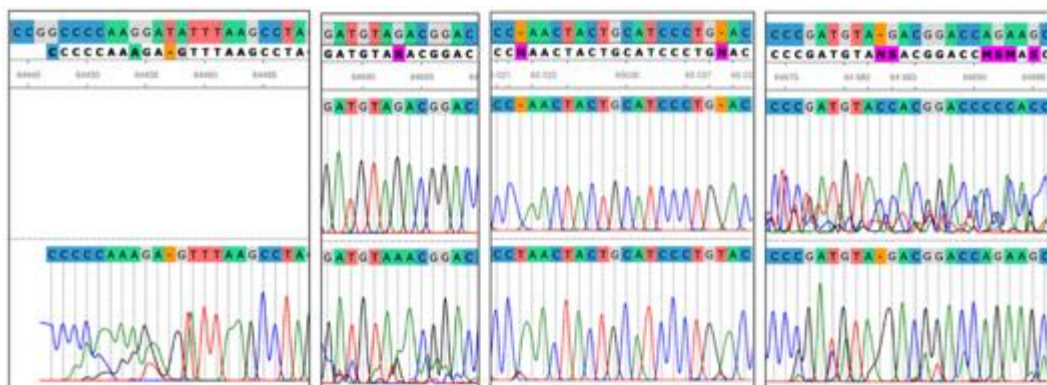
Vidare har referenssekvenser från tillämpliga forskningsstudier används vid multi-sekvenslinjering (Multiple Sequence Alignment, MSA), analys av mutationer och byggandet av fylogenetiska träd. Referenssekvenserna hämtades från GenBank (NCBI, 2021).

I denna studie definieras **mutation** som en avvikelse i genomet i förhållande till referensisolat **AY665713.1 Ab4** (ofta förkortat Ab4).

### 3.5.2. Konsensussekvenser

Eftersom dubbla PCR-produkter skickades för sekvensering, en med forward- och en med reverse-primer, erhöles två sekvenser för varje prov. DNA-sekvenser från MacroGen bestod av grafiska kurvor, en för varje kvävebas. Jämförelse mellan dessa sekvenser, och en referenssekvens, kunde en konsensussekvens skapas. Emellanåt fanns vissa problem med kurvorna (brus, extra/avsaknad av kvävebas etc.) och då kunde denna jämförelse användas för att bestämma vilken kvävebas som var den korrekta.

Sekvenserna analyserades i bioinformatikprogrammet UGENE. Sekvenserna trimmades genom att studera sekvenserna med Sanger data analysis i UGENE och jämfördes med referenssekvensen Ab4, se Figur 14. Efter trimning exporterades konsensussekvensen till en textfil och/eller en FASTA-fil som senare kunde användas för MSA.



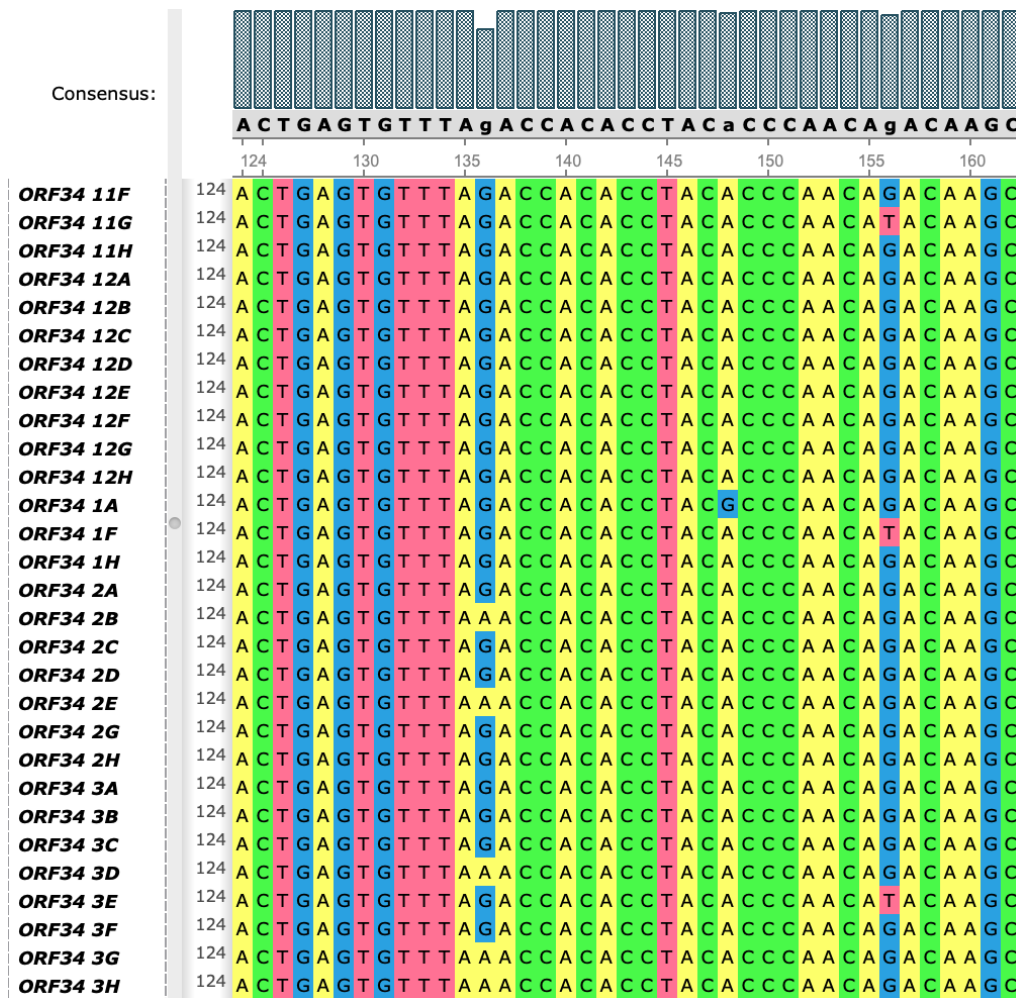
Figur 14. A) Början på reverse-sekvensen, de första ca 10 kvävebaserna trimmades bort. B) A i den reverse-sekvensen (nedre) ändrades till G. C) Två insertioner orsakade av störning i forward-sekvensen (övre), båda togs bort. D) Vid stora störningar användes den ostörda sekvensen, alternativt utslöts provet ur försöket.

Konsensussekvenserna jämfördes mot sekvenser i GenBank (NCBI, 2021). ”E-value”, ”Percentage identity” och ”Accession no” noterades. 100 % identisk innebär att denna stam är identisk med en tidigare stam, medan <100 % innebär att en ny mutation har påträffats.

### 3.5.3. Multiple Sequence Alignment

Multiple Sequence Alignment, MSA, innebär att erhållna konsensussekvenser jämförs med varandra. Utifrån den tabell som skapades kunde mutationer enkelt läsas av. Se exempel Figur 15.

Olika forskargrupper har gjort försök att gruppera stammar av EHV-1 utifrån mutationer. Sekvenser från relevanta studier (Bryant *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2019; Nugent *et al.*, 2006; Preziuso *et al.*, 2019; Sutton, 2021) laddades ner från GenBank (NCBI, 2021); för överskådlighetens skull sorterades dubletter bort. MSA genomfördes på de svenska sekvenserna tillsammans med de internationella för att se vilka tidigare kända stammar de svenska stammarna var besläktade med.



Figur 15. Exempel på Multiple Sequence Alignment, ORF34, med provbeteckningar i kolumnen till vänster. Överst syns en grafisk profil som visar i vilken position mutation påträffas och andelen mutationer. Därunder ses den vanligaste kvävebasen (ACTG) i respektive position. Liten bokstav innebär att mutationer förekommer i materialet. Siffran under kvävebaserna indikerar position. I matrisen syns kvävebaserna (ATCG, färgade) för varje prov respektive position.

### 3.5.4. Analys av mutationer i relation till sjukdom och plats

Mutationerna jämfördes med vilka symptom hästarna hade. Det är sedan tidigare känt att den s.k. N/D-mutationen (G2254A) i ORF30 har stark korrelation till den centralnervösa formen av EHV-1-infektion. Dock kan det vara intressant att även studera andra positioner för att se om statistisk signifikanta samband finns mellan genotyp och symptom för andra mutationer, t.ex. A2279G (Nugent *et al.*, 2006).

Vidare studerades geografisk lokalisering av de påträffade mutationerna. Förekomst kontrollerades lokalt i det gemensamma stallet, i samma kommun, i samma län, i Sverige och jämfört med internationella rapporter.

### 3.5.5. Fylogenetiska träd

Fylogenetiska träd byggdes i programmet MegaX 11.0.8 med Neighbor-Joining-algorithmen (NJ) substitutionsmodellen Tamura-3-parameter. För fylogenetisk test användes bootstrap baserat på 1 000 replikationer. För exempel, se Figur 9 i Kapitel 2.8.5. Utöver egna sekvenser inkluderades även referenssekvenser från andra studier (NCBI, 2021) för att visa på samhörighet med tidigare kända mutationer alternativt illustrera att denna studie har påvisat tidigare okända mutationer.

För att träden ska bli lättöverskådliga togs dubletter av referenssekvenser bort. Detta gjordes genom parvisa jämförelser mellan sekvenserna i MegaX. Vidare togs egna prover som saknade mutationer bort (utom ett), även detta för att få ett mer överskådligt fylogenetiskt träd.

## 3.6. Deskriptiv statistik och statistisk analys

Insamlade data från remisser och genomförda försök loggades i MS Excel. Den bearbetade datamängden exporterades till en csv-fil som därefter kunde importeras till statistikverktyget R. R användes för att producera deskriptiv statistik i form av grafer.

Ålderskategorier definierades utifrån åldersspann på 7 år: unga hästar (0–7 år), medelålders (8–14 år) och gamla hästar (15 år och äldre). Någon nationell statistik över åldersfördelningen av svenska hästpopulationen finns inte.

Statistik om antalet hästar för varje ras inhämtades från Hästnäringens Nationella Stiftelse (HNS, 2017). Det finns fler hästar enligt Jordbruksverket (355 300 hästar), men HNS räknar endast hästar som är med i något av deras medlemsorganisationer (266 112). Raserna delades in i tre kategorier: travhäst, ridhäst och ponny. Se Tabell 5.

Tabell 5. Raskategorier och antal hästar som är registrerade hos HNS medlemsorganisationer (HNS, 2017).

Raskategori	Antal hästar
Travhästar (varmblod, kallblod)	55 840
Ridhästar (halvblod, fullblod)	152 872
Ponny	49 550



## 4. Resultat

### 4.1. PCR och sekvensering

Syftet med denna studie var att genetiskt kartlägga svenska EHV-1-stammar genom prov som insamlats av SVA vid olika utbrott under tio år. Studien undersökte också om det finns speciella virusstammar eller markörer för EHV-1 som kan kopplas till de olika sjukdomsbilderna.

Av de 96 EHV-1-proven var 85 positiva i RT-PCR-analysen på SVA. Av de 11 prov som var negativa lyckades ingen PCR-analys för ORF30, ORF34 eller ORF11. Lyckade PCR-produkter och sekvenser listas i Tabell 6. Av de 255 PCR-produkterna (85 prover som PCR-analyserades för tre olika ORF:ar) bedömdes totalt 197 PCR-produkter som tillräckligt bra (specificitet och mängd) för att sekvenseras. Elva sekvenser gick dock inte att tyda, utan de föll bort ur analysen.

De 85 positiva proven kompletterades med två helgenomsekvenserade prov (SVA, 2021) samt nio prov från SVA som tidigare har bestämda A2254G-mutationer. Sekvenseringen gav resultat från 78 prover hos minst en ORF. Information om prov och helgenomsekvenseringar återfinns i Tabell 7; län, provmaterial, klinisk diagnos, ras, kön, ålder. N/D anger resultat från både denna studie (märkt med asterisk) såväl som tidigare test av N752D-mutationen. Kommun och årtal framgår av isolatbenämning (SWE/KommunSLU-nummer/ÅÅÅÅ).

Tabell 6. Antal prov som analyserats för PCR och därefter sekvenserats. Av de 85 positiva EHV-1-proven lyckades inte alla PCR-analyser. Av lyckade PCR-produkter lyckades inte alla sekvenser läsas av. ORF30 A2254G-mutationen har analyserats tidigare för vissa prov.

Raskategori	Antal	Kommentar
Totalt antal EHV-1-prov	96	
Antal positiva prov RT-PCR	85	RT-PCR på SVA innan studiestart
Antal PCR-produkter, ORF30	65	
Antal sekvenser, ORF30	65	varav 2 sekvenser från tidigare helgenomstudie <sup>1</sup>
Antal PCR-produkter, ORF34	72	
Antal sekvenser, ORF34	70	varav 1 sekvenser från tidigare helgenomstudie <sup>1</sup>
Antal PCR-produkter, ORF11	71	
Antal sekvenser, ORF11	67	varav 2 sekvenser från tidigare helgenomstudie <sup>1</sup>
Antal A2254G-mutationer	74	ORF30 kompletterades med tidigare analyser <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Under 2021 genomfördes helgenomsekvensering av två prover på Irland. Dessa tillfördes denna studie. Dock saknades sekvens för ORF30 på ena provet.

<sup>2</sup> Tidigare studie av A2254G-mutationen i ORF30 har gjorts på SVA. Även de två helgenomsekvenserna bidrog med två A2254G-resultat.

Tabell 7. Totalt 85 prover från svenska hästar som visat positivt för EHV-1 vid SVA under åren 2011–2021 (samt ett prov från 1990-talet) användes i försöket. Olika provmaterial beroende på klinisk diagnos. Hästens ras, kön och ålder samt plats (län) vid provtagning. N/D anger resultat från både denna studie (\*) såväl som tidigare test (ingen \*) av N752D-mutationen.

Isolatbeteckning	Län/ Stall <sup>1</sup>	Prov- material <sup>2</sup>	Diagnos	Ras	Kön	Ålder (år)	N/D
SWE/1A/1990 <sup>3</sup>	-	Odlat	i.u.	i.u.	-	-	D
SWE/Upplands-Bro1E/2013	AB	Kastn	Abort	Vbl trav	S	13	D
SWE/1F/2013	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	D
SWE/1H/2012	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N*
SWE/2A/2012	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N
SWE/Österåker2B/2019 <sup>4</sup>	ABÖ1	Blod	i.u.	Vbl rid	V	22	-
SWE/2C/2019	-	Blod	Resp	i.u.	S	8	N*
SWE/Värmdö2D/2019	ABV1	Blod	Resp	Hbl	S	17	D
SWE/Österåker2E/2019	ABÖ1	Blod	Neuro	Sv ridp	S	11	D
SWE/Österåker2F/2019	ABÖ1	Blod	i.u.	Hannov	S	14	D
SWE/Strängnäs2G/2020	DS1	Kastn	Abort	SWB	S	11	N*
SWE/Gotland2H/2020	I	Kastn	Abort	Quarter	S	-	-
SWE/Huddinge3A/2020	AB	i.u.	i.u.	Hbl	V	5	N*
SWE/Värmdö3B/2019 <sup>5</sup>	ABV1	Blod	Neuro	Sv ridp	S	9	D
SWE/Ronneby3C/2018	K	Blod	Neuro	SWB	S	15	N
SWE/Österåker3D/2019 <sup>4</sup>	ABÖ1	Nässv	i.u.	Vbl rid	V	22	-
SWE/Skellefteå3E/2019	AC	Kastn	Abort	i.u.	S	-	N*
SWE/Karlskrona3F/2019	K	Kastn	Abort	i.u.	S	14	N*
SWE/Österåker3G/2019	ABÖ1	Nässv	Resp	Sv ridp	S	9	D*
SWE/Österåker3H/2019	ABÖ1	Nässv	Resp	Sv ridp	V	9	D*
SWE/Österåker4A/2019	ABÖ1	Nässv	Resp	Sv ridp	S	10	-
SWE/Österåker4B/2019	ABÖ1	Nässv	Neuro	Vbl rid	V	7	D*
SWE/Österåker4C/2019 <sup>4</sup>	ABÖ1	Blod	i.u.	Vbl rid	V	22	D*
SWE/Österåker4D/2019 <sup>4</sup>	ABÖ1	Blod	i.u.	Vbl rid	V	22	-
SWE/Österåker4E/2019 <sup>4</sup>	ABÖ1	Blod	i.u.	Vbl rid	V	22	-
SWE/Norrtälje4F/2019	AB	Kastn	i.u.	Arab	S	-	D*
SWE/4G/2012	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N
SWE/4H/2011	-	i.u.	i.u.	i.u.	-	-	D*
SWE/Österåker5A/2019	ABÖ1	Nässv	Neuro	Vbl rid	S	14	D*
SWE/5B/2019	-	Nässv	Resp	i.u.	-	11	N
SWE/Österåker5C/2019	ABÖ1	Nässv	Neuro	SWB	V	14	D
SWE/5D/2019	-	Kastn	Abort	Okänd	S	9	N
SWE/5E/2019	-	Kastn	Neuro	SWB	S	14	-
SWE/5F/2019 <sup>6</sup>	NOR	Nässv	i.u.	i.u.	-	-	N
SWE/Örnsköldsvik5G/2019	AC	Kastn	Abort	Basjkir	S	9	N
SWE/Värmdö5H/2019	ABV1	Nässv	Resp	Ponny	S	11	D
SWE/Örebro6A/2019	T	Kastn	Abort	i.u.	S	12	N
SWE/Värmdö6B/2019	ABV1	Nässv	Resp	Ponny	S	11	D
SWE/6C/2018	-	Nässv	i.u.	Hannov	V	15	N

<sup>1</sup> Länsbokstäver. NOR = Norge, ESP = Spanien. I de fall fler prov (hästar) kommer från samma utbrott/stall anges stallbeteckning med länsbokstav, kommunens första bokstav samt ett löpnummer. I alla övriga fall, med enbart länsbokstav, är det prov från en häst som definerar utbrottet. '-' ingen uppgift.

<sup>2</sup> Kastn = Material från kastning, kan vara placenta, fosterhinnor, helt föl, organ från föl etc. Nässv = Nässvabb, nässköljprov eller annat provmaterial från övre luftvägarna.

<sup>3</sup> SVA positiva kontroll för EHV-1

<sup>4</sup> Prov 2B, 3D, 4C, 4D, 4E från Österåker 2019 är prover från samma häst.

<sup>5</sup> Prov 3B och 7C från Värmdö 2019 är prover från samma häst.

<sup>6</sup> Norskt prov.

Forts. Tabell 7.

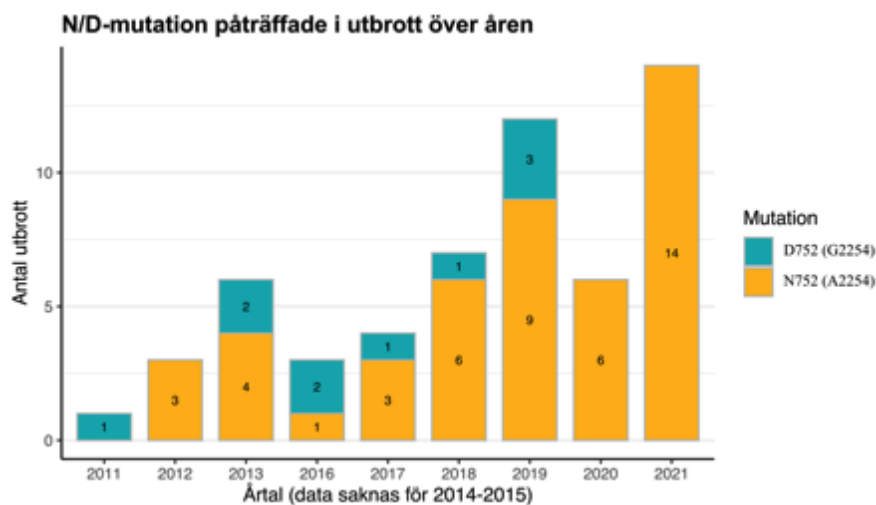
Isolatbeteckning	Län/ Stall	Prov- material	Diagnos	Ras	Kön	Ålder (år)	N/D
SWE/Sölvesborg6D/2017	KS1	i.u.	Neuro	i.u.	S	-	-
SWE/Sölvesborg6E/2017	KS1	Nässv	Neuro	i.u.	S	-	D
SWE/Heby6F/2017	C	Nässv	Resp	Shetl p	S	1	N
SWE/6H/2017	-	Nässv	Resp	Hbl	S	23	N
SWE/7A/2016	-	Nässv	i.u.	Hbl	V	4	N
SWE/Österåker7B/2019	ABÖ1	Nässv	i.u.	Sv ridp	S	11	D
SWE/Värmdö7C/2019 <sup>5</sup>	ABV1	Nässv	Neuro	Sv ridp	S	9	D
SWE/Halmstad7E/2016	NH1	Nässv	Abort/Neur	Vbl trav	S	8	D
SWE/Upplands Väsby7F/2016	ABU1	Nässv	i.u.	Vbl trav	V	5	D
SWE/Upplands Väsby7G/2016	ABU1	Nässv	i.u.	Vbl trav	S	3	D
SWE/Uppsala7H/2016	C	Nässv	Resp	i.u.	V	-	-
SWE/8A/2013	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N
SWE/8B/2013	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N
SWE/8C/2013	-	Nässv	i.u.	i.u.	-	-	N
SWE/8D/2013	-	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N
SWE/8G/2018	-	Kastn	Abort	Island	S	19	N
SWE/Uppsala8H/2021	CU1	Kastn	Abort	SWB	S	-	N*
SWE/Hjo9A/2021	O	Kastn	Abort	SWB	S	17	N*
SWE/Hjo9C/2021	O	Kastn	Abort	i.u.	S	-	N*
SWE/Valencia9E/2021 <sup>1</sup>	ESP2	Nässv	i.u.	KWPN	V	11	N*
SWE/Valencia9G/2021 <sup>1</sup>	ESP2	Nässv	i.u.	SWB	-	-	-
SWE/Kristianstad9H/2021	M	Nässv	Resp	Hbl	V	2	N*
SWE/Strängnäs10A/2021	DS2	Nässv	Resp	Vbl trav	S	4	N*
SWE/Strängnäs10B/2021	DS2	Nässv	Resp	Vbl trav	S	2	-
SWE/Ale10C/2020	O	i.u.	Resp	Hbl	S	9	N*
SWE/Karlsborg10D/2021	O	Kastn	Abort	SWB	S	-	N*
SWE/Valencia10E/2021 <sup>1</sup>	ESP	Nässv	i.u.	i.u.	-	-	-
SWE/Ystad10F/2021	M	Nässv	Resp	SWB	S	25	-
SWE/Enköping10G/2021	C	Nässv	Resp	Vbl trav	S	2	N*
SWE/Knivsta10H/2021	C	Nässv	Resp	Vbl trav	S	-	N*
SWE/Halmstad11A/2016	NH1	Kastn	Abort	Vbl trav	S	8	D*
SWE/Halmstad11B/2016	NH1	Kastn	Abort	Vbl trav	S	9	D
SWE/Halmstad11C/2016	NH1	Kastn	Abort	Vbl trav	S	10	D
SWE/Heby11D/2017	C	Kastn	Abort	Vbl trav	S	12	N
SWE/Varberg11E/2018	N	Kastn	Abort	i.u.	-	-	N*
SWE/Sandviken11F/2018	X	Kastn	Abort	i.u.	S	-	N
SWE/Eda11G/2018	S	Kastn	Abort	Vbl trav	S	-	N
SWE/Sjöbo11H/2020	M	Kastn	Abort	SWB	S	11	N*
SWE/Strängnäs12A/2021	D	Kastn	Abort	Ponny	S	7	N*
SWE/Uddevalla12B/2021	O	Kastn	Abort	SWB	S	11	N*
SWE/Boxholm12C/2021	E	Kastn	Abort	Vbl trav	S	-	N*
SWE/12D/2020	-	Nässv	Resp	SWB	V	-	N*
SWE/12E/2021	-	i.u.	Abort	i.u.	-	-	N*
SWE/Sala12F/2020	U	Kastn	Abort	SWB	S	12	N*
SWE/Haninge12G/2018	AB	Kastn	Abort	Basjkir	S	-	D
SWE/Umeå12H/2019	AC	Kastn	Abort	i.u.	S	15	N
SWE/Karlstad58WG/2021 <sup>2</sup>	S	Kastn	Abort	SWB	S	17	N*
SWE/Eskilstuna74WG/2021 <sup>2</sup>	D	Kastn	Abort	SWB	S	12	N*

<sup>1</sup> Prover tagna i Sverige från hästar som deltagit i tävlingar i Valencia, Spanien, 2021.<sup>2</sup> Två prover gjordes ingen PCR-analys på i denna studie då de hade helgenomsekvenserats tidigare.

## 4.2. Mutationer i ORF30

### 4.2.1. D752-varianten kopplad till centralnervös form

När det gäller utbrott hade 46 (80,7 %) unika stall utbrott med den mildare N752-mutationen (A<sub>2254</sub>), medan 11 (19,3 %) utbrott hade den allvarligare D752-mutationen. Hästar från samma utbrott hade alltid samma mutation i position 2254. Antal utbrott de tio senaste åren som analyserades för N752/D752-mutationer presenteras i Figur 16. Antalet D752-mutationer (G<sub>2254</sub>) är för få för att kunna dra några slutsatser om förändringar över tiden.



Figur 16. N752- (A<sub>2254</sub>) respektive D752-mutation (G<sub>2254</sub>) påvisade i utbrott under åren 2011-2021. OBS! Inga prover från 2014–2015 analyserades. Ett prov från 90-talet, som inte presenteras i grafen, hade D752-mutationen.

Avseende hästar som analyserats för N752/D752-mutation hade totalt 47 (64,4 %) unika hästar i studien den mildare N752-mutationen, medan 26 (35,6 %) hästar hade den allvarligare D752-mutationen. Mutationer för de olika sjukdomsformerna presenteras i Figur 17.



Figur 17. N752- respektive D752-mutation påträffade bland de olika diagnosgrupperna.

#### 4.2.2. Andra mutation i ORF30: T2225C och A2279G

En annan tidigare känd mutation i position 2225 (isolat AB363613.1, GenBank) påträffades i två svenska prover. T2225C är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyraposition 742, från valin (V) till alanin (A), V742A. De svenska isolaten, SWE/Strängnäs12A/2021 och SWE/Eskilstuna74WG/2021, kommer från ett ponnysto respektive ett häststo som båda aborterade. Båda hade N752-mutationen.

Nugent *et al.* (2006) påvisade en mutation A2279G från fyra hästar från olika utbrott (till exempel isolat DQ180735.1, GenBank). Denna ger en aminosyraskifte i position 760, från asparbinsyra (D) till glycin (G), D760G. I tre av dessa fall uppvisade hästarna centralnervösa symptom, i ett fall abort. Dessa fall hade N752-mutationen, dvs. den icke-neurologiska stammen. Mutation A2279G kunde dock inte påvisas i något av de svenska proven.

### 4.3. Mutationer i ORF34

#### 4.3.1. Epidemiologisk analys av utbrotten i Stockholm 2019

PCR av ORF34 gav 69 konsensussekvenser utav 72 sekvenserade PCR-produkter, samt en konsensussekvens från en helgenomsekvensering. Av dessa 70 konsensussekvenser kunde mutationer påträffas i 20 av dem från 16 unika hästar i totalt 8 olika positioner i 6 olika kombinationer (Tabell 9) i ORF34, se Tabell 8. Resterande 50 prover saknade mutationer i ORF34.

Av de 50 prover (49 unika hästar) som inte hade någon mutation i ORF34 återfanns två hästar från utbrottet på Värmdö öster om Stockholm 2019. Av de åtta unika hästar med mutation G136A kommer sju hästar från utbrottet i Österåker norr om Stockholm 2019. Detta utbrott orsakade flertalet centralnervösa fall med totalt fem dödsfall, men också respiratoriska fall. Alltså, de virus som orsakade de två utbrotten i Stockholm 2019 hade olika ursprung. Den åttonde hästen med mutation G136A kommer från Blekinge 2017, denna häst hade centralnervösa symptom.

SVA:s positiva kontroll (SWE/1A/1990) var det enda isolat som hade mutationerna A148G och T282C.

Fyra sekvenser hade mutationerna G156T och C303A. Två av dem kom från ston som båda aborterade 2013; en från Upplands-Bro och det andra från okänd ort. De två andra hästarna var också ston som aborterade, ett från Värmland 2018 och ett från Västerbotten 2019.

Ett isolat med mutation ORF34 G309A kom från ett sto i Haninge i Stockholms län (2018) som aborterat. Isolat SWE/5B/2019 kommer från en häst med respiratoriska symptom. Isolatet hade mutation ORF34 T408C. Från ett sto från Karlsborg, som aborterade 2021, påvisades mutation ORF34 C434A.

Tabell 8. Mutationer i ORF34. På andra raden anges den vanligaste kvävebasen (referensisolat Ab4) i respektive position. På sista raden ses totala antalet unika hästar påträffade i materialet och antal unika utbrott inom parentes.

Position	136	148	156	282	303	309	408	434
Svenska isolat   Ab4:	G	A	G	T	C	G	T	C
SWE/Sölvesborg6E/2017	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker2B/2019 <sup>1,2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker3D/2019 <sup>1,2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker4C/2019 <sup>1,2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker4D/2019 <sup>1,2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker4E/2019 <sup>1,2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker2E/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker3G/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker3H/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker4A/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker5C/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/Österåker7B/2019 <sup>2</sup>	A	.	.	.	.	.	.	.
SWE/1A/1990	.	G	.	C	.	.	.	.
SWE/1F/2013	.	.	T	.	A	.	.	.
SWE/Upplands-Bro1E/2013	.	.	T	.	A	.	.	.
SWE/Eda11G/2018	.	.	T	.	A	.	.	.
SWE/Skellefteå3E/2019	.	.	T	.	A	.	.	.
SWE/Haninge12G/2018	.	.	.	.	.	A	.	.
SWE/5B/2019	.	.	.	.	.	.	C	.
SWE/Karlsborg10D/2021	.	.	.	.	.	.	.	A
Antal unika hästar	8	1	4	1	4	1	1	1
(unika utbrott)	(2)	(1)	(4)	(1)	(4)	(1)	(1)	(1)

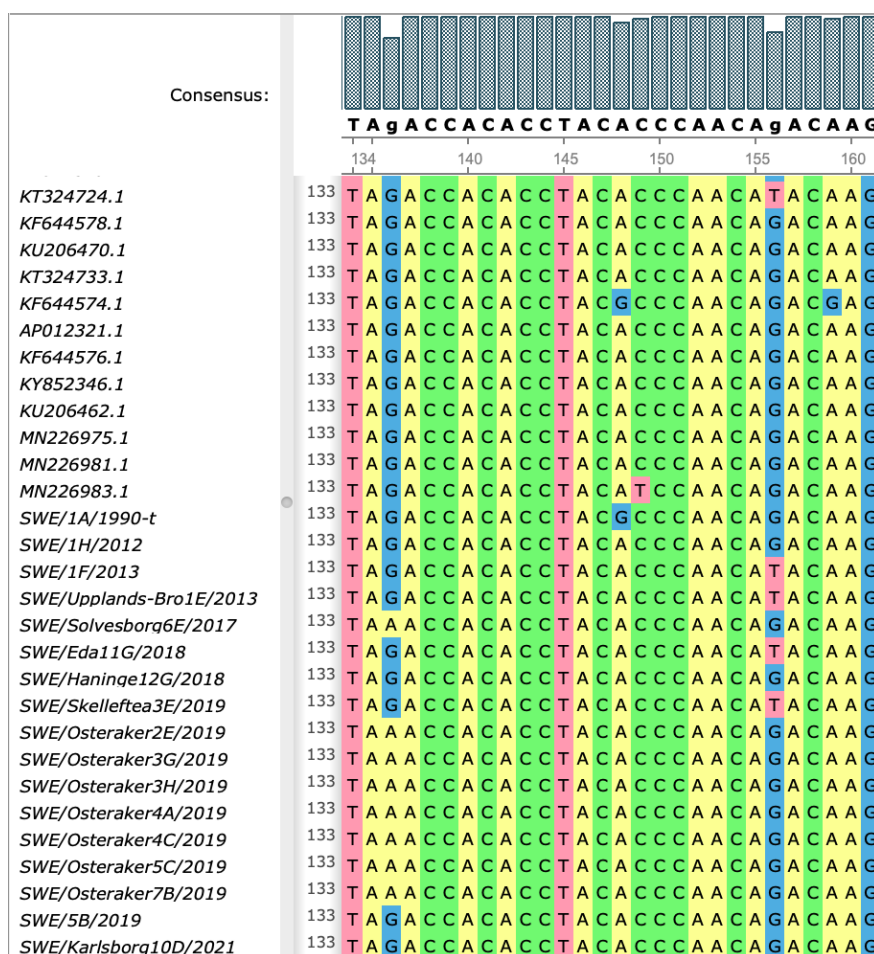
#### 4.3.2. Flertalet tidigare okända mutationer i ORF34

MSA har genomförts på prov i Tabell 8 med referenssekvenser från GenBank. Ett avsnitt av MSA (kvävebas 134-161) presenteras i Figur 20. Mutationerna G136A, A148G, T282C, G309A, T408C och C434A i ORF34 har inte rapporterats tidigare (NCBI, 2021). ORF34 A148G/T282C, som påträffades i den positiva kontrollen från 1990-talet, har rapporterats tidigare, men då i kombination med ett stort antal andra mutationer i ORF34 (Preziuso *et al.*, 2019) vilket vårt kontrollprov inte hade.

- G136A är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 46, från asparaginsyra (D) till asparagin (N), D46N.
- A148G är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 50, från treonin (T) till alanin (A), T50A.
- T282C är en synonym mutation, från kodon TGT till TGC, vilka båda kodar för cystein (C) i aminosyra-position 94.
- G309A är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 103, från arginin (R) till glycin (G), R103G.
- T408C är en synonym mutation, från kodon CGT till CGC, vilka båda kodar för arginin (R) i aminosyra-position 136.
- C434A är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 145, från prolin (P) till glutaminsyra (E), P145E.

<sup>1</sup> Fem isolat kommer från samma häst.

<sup>2</sup> Elva isolat kommer från samma stall, dvs. samma utbrott.



Figur 18. Avsnitt (kvävebas 134-161) av multisequence alignment (MSA) av de svenska proverna (SWE) som hade mutationer i ORF34. Utöver svenska isolat från denna studie presenteras tidigare rapporterade isolat från GenBank (NCBI, 2021). Översta raden är en grafisk profil som visar i vilken position mutationer påträffas och andelen mutationer. Raden därunder anges den vanligaste kvävebasen (ACTG) i respektive position. Siffran under respektive kvävebas indikerar position. I matrisen syns kvävebaserna (färgade) för varje position och för varje prov.

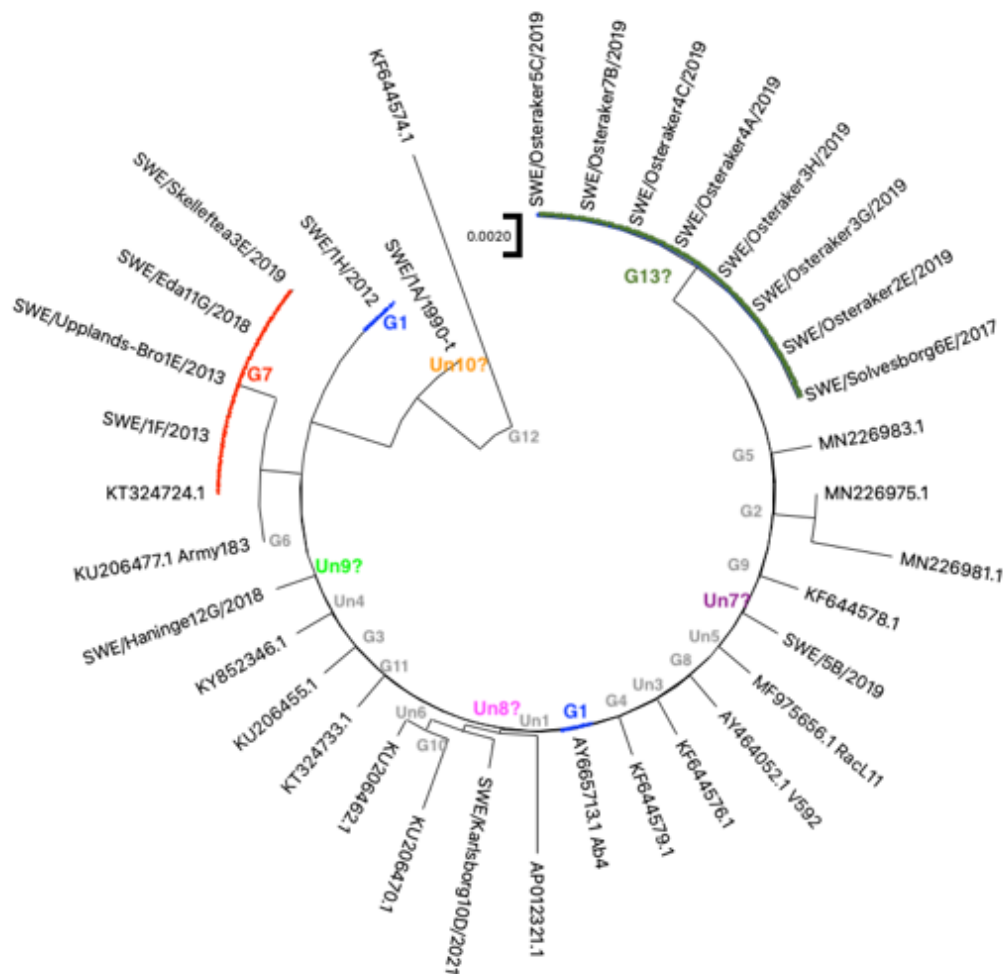
Tabell 9. Antal svenska isolat från unika hästar med givna mutationer i ORF34 (antalt unika utbrott inom parentes) samt antalet funna i GenBank (NCBI, 2021). Exempel på isolat från GenBank (med referens).

Mutationer i ORF34	Antal svenska	Antal i GenBank	Exempel på isolat från GenBank
G136A	8 (2)	0	Ny mutation
A148G, T282C	1 (1)	0	Ny mutation
G156T, C303A	4	11	KU206476 (Bryant <i>et al.</i> , 2018)
G309A	1 (1)	0	Ny mutation
T408C	1 (1)	0	Ny mutation
C434A	1 (1)	0	Ny mutation

Mutationerna ORF34 G156T/C303A har rapporterats av Bryant *et al.* (2018). Preziuso *et al.* (2019) har placerat in denna variant i Grupp 7. Totalt har elva prover med denna mutation tidigare rapporterats i GenBank (NCBI, 2021). G156T är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyraposition 52, från

glutamin (Q) till histidin (H), Q52H; C303A är en synonym mutation, från kodon GCC till GCA, vilka båda kodar för alanin (A) i aminosyraposition 101.

Prov i Figur 18 presenteras i ett fylogenetiskt träd, se Figur 19<sup>1</sup>. De grå beteckningarna, som är tagna från Prezioso *et al.* (2019, Figur 9), visar på mutationer som inte påträffades vid denna svenska studie. Prov med tidigare rapporterade mutationer påträffades dock tillhörandes grupp G1 (blå) och G7 (röd). Vidare identifierades ytterligare en grupp, betecknad 'Grupp 13?' (mörkgrön). Ytterligare unika mutationer påträffades, betecknade 'Un7?' (lila), 'Un8?' (rosa), 'Un9?' (ljusgrön), respektive 'Un10?' (orange). (De nya mutationerna särskiljs från tidigare påträffade mutationer med ett frågetecken.)



Figur 19. Fylogenetiskt träd över ORF34. Utöver svenska isolat från denna studie presenteras ett urval av tidigare rapporterade isolat från GenBank (NCBI, 2021). De grå beteckningarna, från Prezioso *et al.* (2019), se Figur 9, visar på mutationer som inte påträffades vid vår svenska studie. Prov med tidigare rapporterade mutationer påträffades dock tillhörandes grupp G1 (blå) och G7 (röd). Vidare identifierades ytterligare en grupp, 'Grupp 13?' (mörkgrön). Ytterligare unika mutationer påträffades; 'Un7?' (lila), 'Un8?' (rosa), 'Un9?' (ljusgrön), respektive 'Un10?' (orange). (De nya mutationerna särskiljs från tidigare påträffade mutationer med ett frågetecken.)

<sup>1</sup>För ökad läsbarhet utelämnades svenska prover utan mutationer, samt inkluderades bara ett exempel på internationellt rapporterade motsvarigheter.



## 4.4. Mutationer i ORF11

### 4.4.1. Isolat från utbrottet i Valencia 2021

PCR av ORF11 gav 64 konsensussekvenser utav 70 sekvenserade PCR-produkter, och två konsensussekvenser från helgenomsekvenseringar. Av dessa 66 konsensussekvenser kunde mutationer påträffas i 22 av dem (från 21 unika hästar, 17 unika utbrott) i totalt 8 olika positioner i 8 kombinationer (Tabell 11) i ORF11, se Tabell 10. Resterande 44 prover saknade mutationer.

Totalt 16 sekvenser hade mutation T156C. Av de fyra sekvenser som hade denna mutation som enda mutation i ORF11 kommer tre från ett utbrott i ett travstall med abortstorm i Halland 2016. Det fjärde kommer från ett travstall med febriga hästar i Stockholm under samma år. Samband mellan dessa stallar låter sig inte analyseras på ett enkelt sätt. Båda stallen hade flera sjuka hästar samt det faktum att travhästar ofta byter stallar (olika tränare och flera tävlingsbanor) vilket gör att komplexiteten snabbt ökar.

Ett isolat från Haninge i Stockholms län hade utöver mutation T156C även mutation C141T. C141T har aldrig tidigare rapporterats.

Tabell 10. Mutationer i ORF11. På andra raden anges den vanligaste kvävebasen (referensisolat Ab4) i respektive position. På sista raden ses totala antalet unika hästar påträffade i materialet med antal unika utbrott inom parantes.

Position	129	141	156	390	704	713	748	765
Svenska isolat	Ab4: A	C	T	A	G	A	G	G
SWE/Strängnäs2G/2020	G	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Haninge12G/2018	.	T	C	.	.	.	.	.
SWE/Halmstad7E/2016 <sup>1</sup>	.	.	C	.	.	.	.	.
SWE/Halmstad11A/2016 <sup>1</sup>	.	.	C	.	.	.	.	.
SWE/Halmstad11B/2016 <sup>1</sup>	.	.	C	.	.	.	.	.
SWE/Upplands Väsby7F/2016	.	.	C	.	.	.	.	.
SWE/8C/2013	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/8D/2013	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Norrtälje4F/2019	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Värmdö2D/2019 <sup>2</sup>	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Värmdö3B/2019 <sup>2</sup>	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Värmdö7C/2019 <sup>2</sup>	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/5F/2019	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/12D/2020	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Ale10C/2020	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Kristianstad9H/2021	.	.	C	.	T	.	.	.
SWE/Umeå12H/2019	.	.	.	G	.	.	.	.
SWE/Valencia9G/2021 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	G	.	.
SWE/Valencia10E/2021 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	G	.	.
SWE/1F/2013	.	.	.	.	.	.	T	.
SWE/Eda11G/2018	.	.	.	.	.	.	T	.
SWE/Skellefteå3E/2019	.	.	.	.	.	.	T	A
Antal unika hästar	1	1	15	1	10	2	3	1
(unika utbrott)	(1)	(1)	(12)	(1)	(9)	(1)	(3)	(1)

<sup>1</sup> Tre hästar kommer från samma stall.

<sup>2</sup> Två prov(3B och 7C) kommer från samma häst, alla tre proven kommer från samma stall.

<sup>3</sup> Två hästar var samtidigt i Valencia under utbrottet 2021.

Tio sekvenser hade mutationerna T156C och G704T (position A129 omuterad). Dessa kom från olika årtal; 2013, 2019, 2020, 2021. Ett prov kom från Norrtälje 2019, hästen kastade. Tre prov från två olika hästar kom från utbrottet på Värmdö 2019, den ena hästen hade respiratoriska symptom, den andra neurologiska. Fylogenetiskt kan stammarna påvisade i Norrtälje och på Värmdö vara besläktade med varandra, samband kan finnas (båda Stockholms län). Vidare var två prov från 2013 (orter okända); ett av dem kom från häst som kastat, det andra saknade information. Ett annat prov var taget av en norsk veterinär (SWE/5F/2019), oklart om det kom från en norsk eller svensk häst. Ett prov (SWE/12D/2020) saknade information om ort. Två prov från 2020–2021 gav båda respiratoriska symptom; proven togs i Skåne och Västra Götaland. En häst i Strängnäs 2020 hade utöver dessa mutationer även mutation A129G.

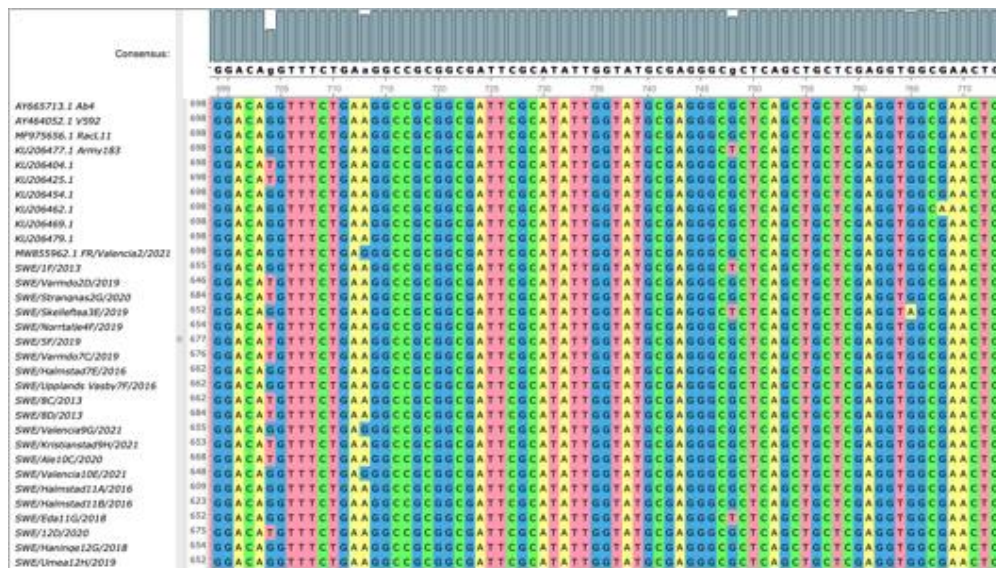
Mutation A390G påträffades endast i en sekvens, ett isolat från en häst i Västerbotten 2019.

Två prover hade mutationen A713G. Dessa kom från svenska hästar som var med i det neurologiska utbrottet i Valencia 2021.

Två av tre prov med mutation G748T kom från Värmland 2018 respektive Västerbotten 2019, båda travstom som aborterade. Provet från Västerbotten hade dock en mutation även i G765A som aldrig tidigare har rapporterats. Det tredje provet är från 2013 (okänt län) och även denna häst aborterade.

#### 4.4.2. Frekvent rapporterad mutation vanlig även i Sverige?

Multiple Sequence Alignment, MSA, har genomförts på sekvenserna i Tabell 10 tillsammans med ett antal referenssekvenser från GenBank (GenBank, 2021). Ett avsnitt av MSA (kvävebas 699–773) presenteras i Figur 21.



Figur 20. Avsnitt (kvävebas 699–773) av Multiple Sequence alignment (MSA) av de svenska proverna (SWE) som hade mutationer i ORF11. Utöver svenska isolat från denna studie presenteras tidigare rapporterade isolat från GenBank (NCBI, 2021) inklusive ett isolat från utbrottet i Valencia 2021. Översta raden är en grafisk profil som visar i vilken position mutationer påträffas och andelen mutationer. Raden därunder anges den vanligaste kvävebasen (ACTG) i respektive position. Siffran under respektive kvävebas indikerar position. I matrisen syns kvävebaserna (färgade) för varje position och för varje prov.

Mutationen T156C (utan andra mutationer i ORF11) har rapporterats flertalet gånger tidigare (NCBI, 2021). Bryant *et al.* (2018) har för denna mutation rapporterat in sex abortfall och ett fall med ataxi. De svenska hästar som hade denna mutation som enda mutation i ORF11 aborterade tre hästar och en hade respiratoriska symptom. En av hästarna som kastade hade också neurologiska symptom. T156C är en synonym mutation, från kodon AGT till AGC, vilka båda kodar för Serin (S) i aminosyra-position 52.

Mutationerna T156C och G704T i kombination har rapporterats 39 gånger i GenBank (NCBI, 2021), ingen annan mutation förekommer så ofta. Denna mutation definierar Clade 7 (Garvey *et al.*, 2019). Även i vårt studiematerial var detta den vanligaste mutationen, nio unika hästar samt en häst som även hade mutation A129G. G704T är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 235, från arginin (R) till metionin (M), R235M.

Mutationerna A129G, T156C och G704G i kombination har tidigare rapporterats av Bryant *et al.* (2018). Det påträffades hos ett brittiskt fullblod från 2013 som aborterade. Den enda svenska sekvens som hade denna variant av mutationskombination kom från ett svenskt halvblod som aborterade. A129G är en synonym mutation, från kodon CGA till CGG, vilka båda kodar för arginin (R) i aminosyra-position 43.

Mutation A713G rapporterades för första gången 2021, isolat från hästar som deltagit i tävlingarna i Valencia (Sutton *et al.*, 2021). Även svenska hästar som hade denna mutation hade varit på samma tävlingar och insjuknat. Inga andra svenska hästar hade denna mutation.

Mutation G748T har rapporterats nio gånger tidigare (GenBank, 2021). G748T är en icke-synonym mutation som orsakar skifte i aminosyra-position 250, från alanin (A) till serin (S), A250S.

Ingen svensk häst hade mutation C565. Det är den mutation som Nugent *et al.* (2006) definierade som Grupp 6 i ett tidigt försök till klassning av EHV-1-stammar.

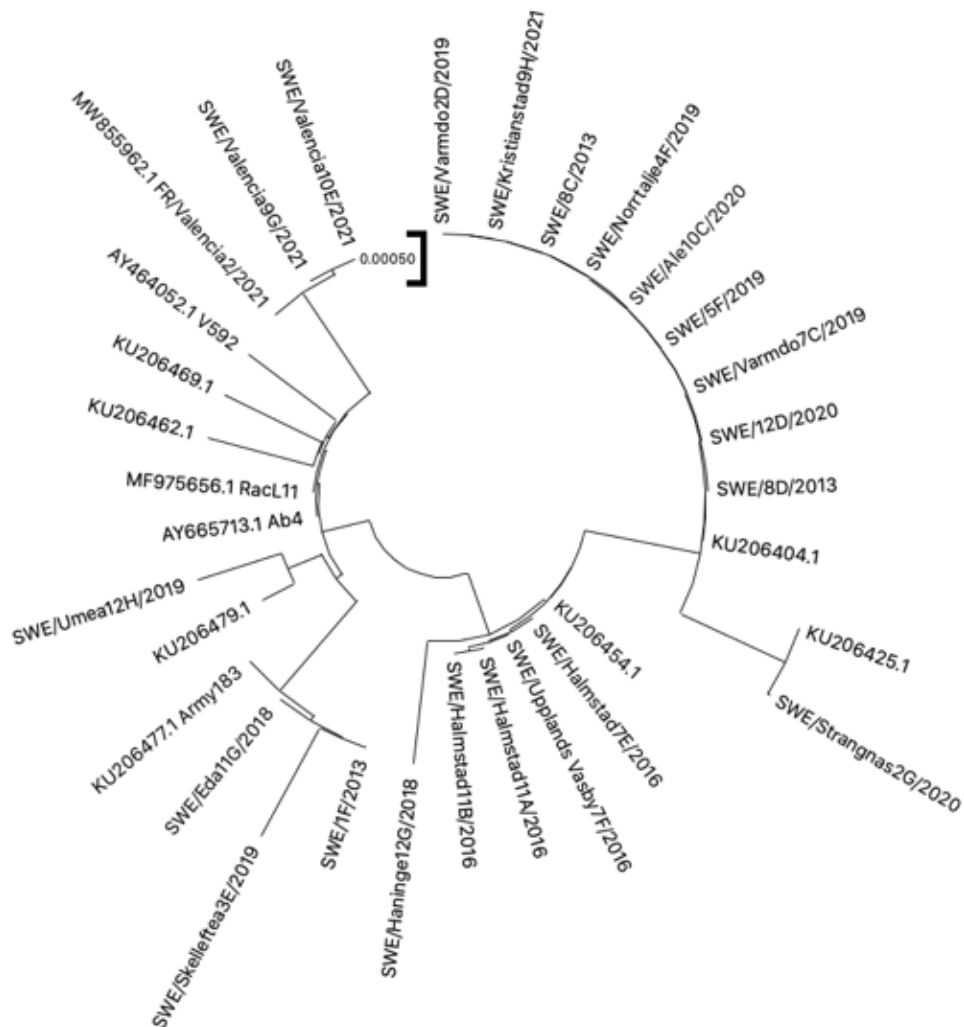
I Tabell 11 visas antalet sekvenserade prover med givna mutationer i ORF11 tillsammans med motsvarande antal rapporterade i GenBank (2021). De svenska sekvenserna är räknade per unik häst (fler hästar från samma stall förekommer), medan sekvenserna från GenBank saknar denna information. Som framgår av tabellen har mutationerna C141T, A390G och G765A aldrig rapporterats tidigare:

- C141T är en synonym mutation, från kodon CTC till CTT, vilka båda kodar för leucin (L) i aminosyra-position 47.
- A390G är en synonym mutation, från kodon GCA till GCG, vilka båda kodar för alanin (A) i aminosyra-position 130.
- G765A är en synonym mutation, från kodon GTG till GTA, vilka båda kodar för valin (V) i aminosyra-position 255.

De svenska sekvenserna med mutationer i ORF11 presenteras i ett fylogenetiskt träd tillsammans med referenssekvenser från GenBank (NCBI, 2021), se Figur 21. Det fylogenetiska trädet över ORF11 visar tydligt att det finns tre svenska prover som inte har någon känd internationell motsvarighet (SWE/Haninge12G/2018, SWE/Skellefteå3E/2019, SWE/Umeå12H/2019).

Tabell 11. Antal svenska isolat, unika hästar, med givna mutation(er) i ORF11 (antal unika utbrott inom parentes) samt antalet funna i GenBank (NCBI, 2021). Exempel på isolat från GenBank (med referens).

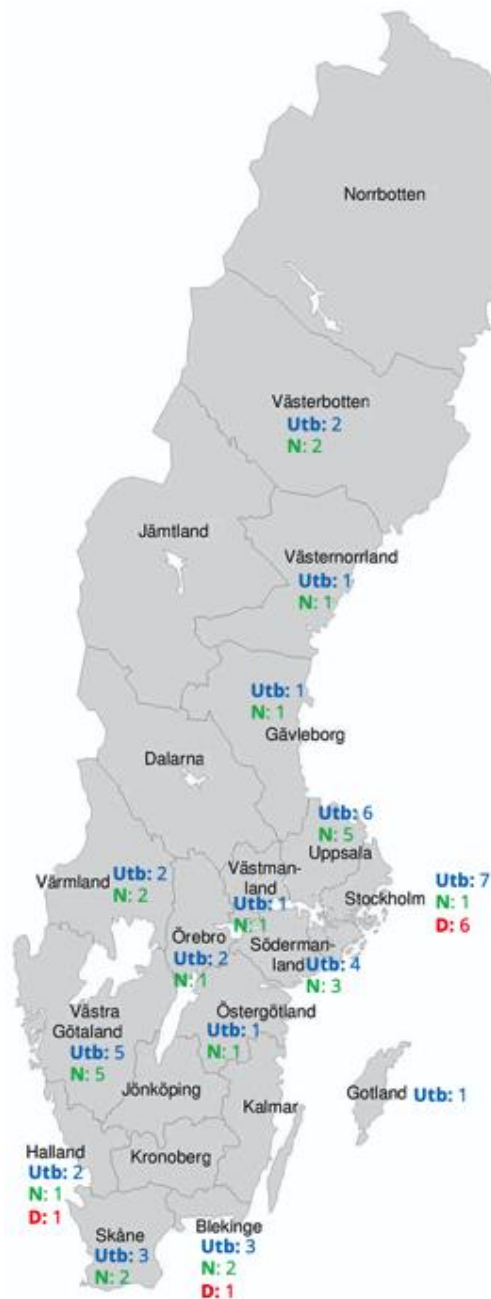
Mutationer i ORF11	Antal svenska	Antal i GenBank	Exempel på isolat från GenBank
A129G, T156C, G704T	1 (1)	1	KU206425 (Bryant <i>et al.</i> , 2018)
C141T, T156C	1 (1)	0	Ny mutation
T156C	4 (2)	8	KY852346 (Bryant <i>et al.</i> , 2018)
T156C, G704T	9 (8)	38	KU206439 (Bryant <i>et al.</i> , 2018)
A390G	1 (1)	0	Ny mutation
A713G	2 (1)	3	MW855962 (Sutton <i>et al.</i> , 2021)
G748T	2 (2)	9	KU206477 (Bryant <i>et al.</i> , 2018)
G748T, G765A	1 (1)	0	Ny mutation



Figur 21. Fylogenetiskt träd över ORF11. Utöver svenska isolat från denna studie presenteras tidigare rapporterade isolat från GenBank (NCBI, 2021). De stora stegen mellan olika proven är enskilda mutationer (en eller två). De små stegen mellan sekvenserna i en grupp är endast en artefakt av att sekvenserna som jämförs är olika långa, de sekvenserna har samma mutationer.

## 4.5. Geografisk utbredning av mutationerna

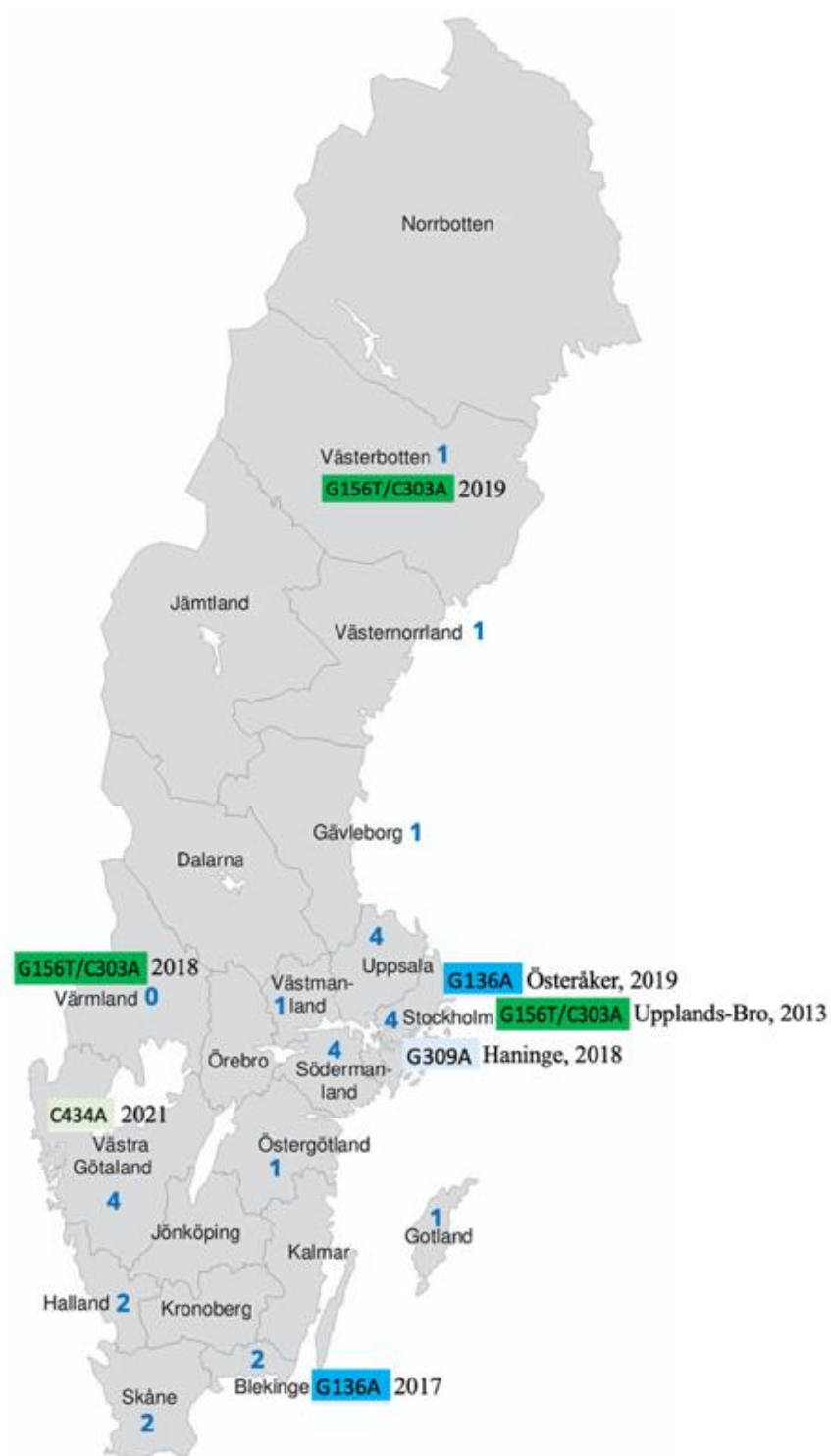
I Figur 22 ses antalet utbrott i studiepopulationen samt antal påträffade N752-/D752-mutation som diagnosticerats i respektive län. D752-mutationen påträffades endast i tre län; Stockholm (två olika kommuner), Halland och Blekinge. Tre analyserade prover på svenska hästar som deltog i Spanien 2021 hade virus med N752-mutation.



Figur 22. Positiva EHV-1-prov från unika utbrott (Utb) med N752- (N) respektive D752- (D) mutation fördelade över Sverige. D752-mutationen har endast påträffats i tre län vid denna studie. Mutation ORF30 T2225A påträffades i två prover från två olika orter i Södermanland (ej markerade på kartan). Publicerad i enlighet med Wikimedia Commons, författare Peggy22.<sup>1</sup>

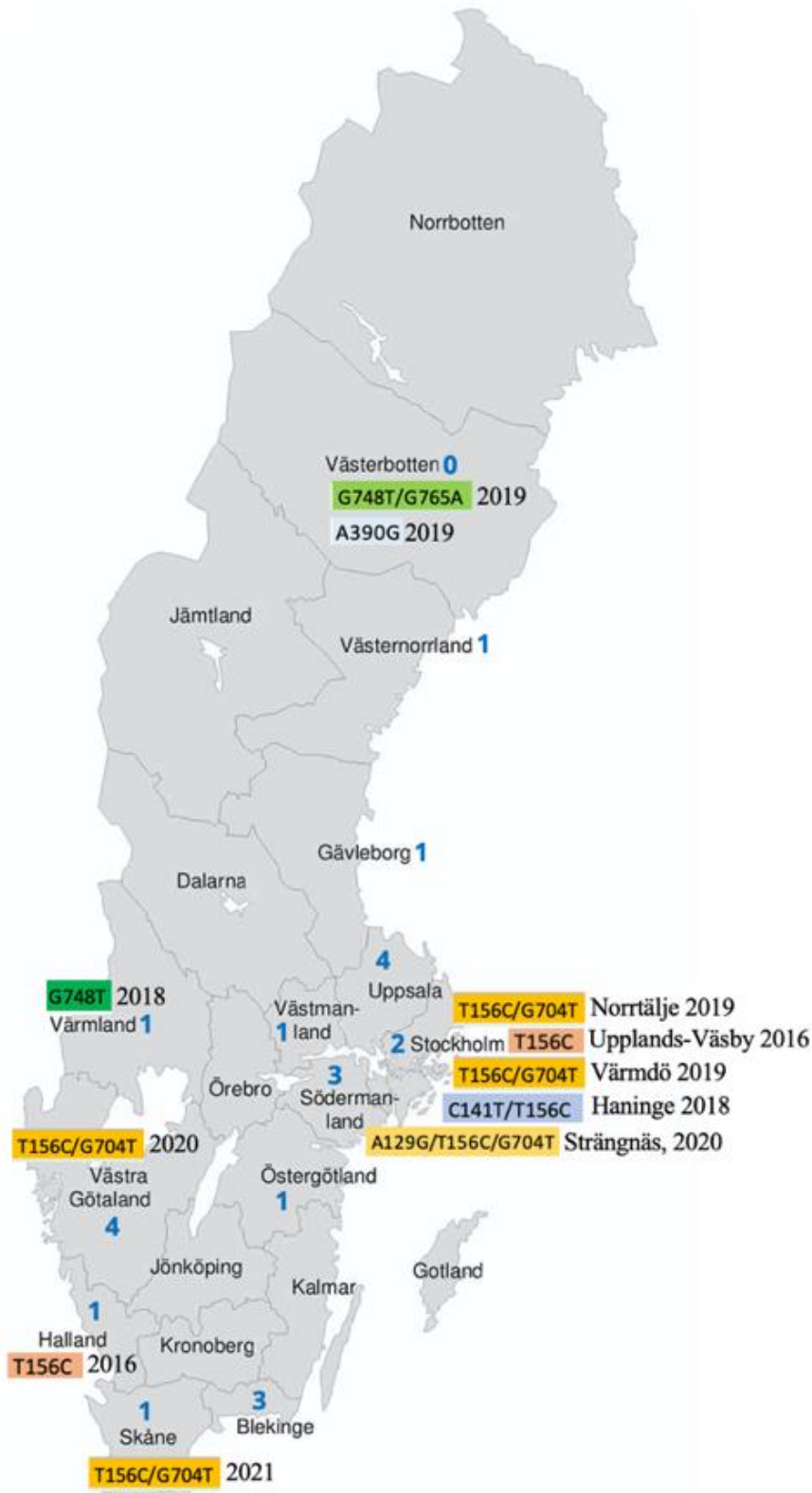
<sup>1</sup> Wikimedia Commons licensvillkor: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>

Denna studies geografiska spridning av mutationer i de polymorfa regionerna ORF34 och ORF11 av EHV-1:s DNA presenteras i Figur 23 respektive Figur 24.



Figur 23. Mutationer i ORF34 i svenska prover. Blå siffror anger antal prov per län utan mutation. Det saknas geografisk information om mutationerna ORF34 A148G, T282C och T408C. Publicerad i enlighet med Wikimedia Commons, författare Peggy22.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Wikimedia Commons licensvillkor: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>



Figur 24. Mutationer i ORF11 i svenska prover. Blå siffror anger antal prov per län utan mutation. Hästar som varit med i utbrottet i Valencia 2021 hade mutation A713G. Publicerad i enlighet med Wikimedia Commons, författare Pegy22.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Wikimedia Commons licensvillkor: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>

## 4.6. ORF30, ORF11 och ORF34 kombinerat

För 58 prov lyckades sekvensering för alla tre studerade ORF:ar. 31 av dessa hade mutationer i minst en ORF, 22 av dessa kom från unika utbrott. Se Tabell 12.

Tabell 12. Kombinationer av mutationer från de olika studerade ORF:arna. Antal utbrott med dessa kombinationer samt var och när dessa har upptäckts.

ORF30 N/D	Mutationer i ORF30, ORF34, ORF11	Antal utbrott	Kommun, län och årtal
N752	ORF30: T2225A	2	Strängnäs respektive Eskilstuna, Södermanland, båda 2021.
D752	ORF34: G156T, C303A ORF11: G748T	1	Okänd ort 2013. OBS! D752!
N752	ORF34: G156T, C303A ORF11: G748T	1	Värmland 2018. OBS! N752!
N752	ORF34: G156T, C303A ORF11: G748T, G765A	1	Västerbotten 2019. OBS! Extra mutation ORF11 G765A.
D752	ORF11: T156C	2	Halland respektive Stockholm (Upplands-Väsby), båda 2016.
D752	ORF34: G309A ORF11: C141T, T156C	1	Haninge 2018.
D752	ORF11: T156C, G704T	2	Värmdö respektive Norrtälje, Stockholm, båda 2019. OBS! D752!
N752	ORF11: T156C, G704T	6	Västra Götaland 2020 och Skåne 2021. OBS! N752! Fyra prov okänd ort (2013, 2019, 2020).
N752	ORF11: A129G, T156C, G704T	1	Strängnäs 2020.
D752	ORF34: G136A	2	Blekinge 2016 och Stockholm (Österåker) 2019.

### 4.6.1. Indirekt koppling mellan smittade hästar

Två ston, en ponny och en storhäst, som kastade i sen dräktighet under 2021, hade båda mutationen ORF30 T2225. Stona stod på olika stall i Södermanland. Storhästen hade besökt en anläggning tidigare under 2021 under samma period som en annan häst från ponnyns stall. Denna anläggning skulle kunna vara smittvägen mellan dessa ston.

### 4.6.2. Abort hos travston

Två av de tre proven med mutationerna ORF34 G156T/C303A och ORF11 G748T kom från abortstormar i stall med travhästar, ett i Värmland 2018 och ett i Västerbotten 2019. Provet från Västerbotten hade en mutation även i G765A som aldrig tidigare har rapporterats. Travstallet i Västerbotten hade fem dräktiga ston. Vid första kastningen flyttades tre av de andra stona omgående medan det fjärde stoet stannade i stallet och nedkom med ett friskt föl<sup>1</sup>. Av de tre andra stona födde (minst) ett sto ett dödfött föl. Två av de värmländska hästarna exporterades till Norge<sup>1</sup>. Ett par av hästar i stallet i Västerbotten var importerade från Norge. Om man antar att det finns ett samband mellan dessa två hästar, via Norge, betyder det att viruset har muterat vid något tillfälle mellan dessa hästar. Eftersom båda stallen hade flera



sjuka hästar samt det faktum att travhästar ofta byter stallar (olika tränare och flera tävlingsbanor) ökar komplexiteten snabbt. Denna analys utelämnades därmed.

Ett tredje prov från 2013 hade mutationerna ORF34 G156T/C303A och ORF11 G748T, men det hade D752-mutation i ORF30. Provet var från ett sto som hade kastat, ras okänd.

#### 4.6.3. Travhästar med olika symptom

Två prover med ORF11 T156C som enda mutation, D752-mutation i ORF30, gav olika symptom hos två travhästar 2016, ett sto och en valack. Stoet, som stod i Halland, både kastade och fick centralnervösa symptom. Valacken, som stod i Stockholm, fick respiratoriska symptom.

#### 4.6.4. Utbrotten i Stockholm 2019

Under 2019 pågick två uppmärksammade utbrott i Stockholm, ett på Värmdö och ett i Österåker. Båda dessa hade D752-mutationen i ORF30, vilket oftare orsakar centralnervösa symptom. Dock visade denna studie att proven från Värmdö hade två mutationer: ORF11 T156C och G704T. Proven från Österåker saknade mutationer i ORF11 såväl som ORF34.

Däremot påträffades i denna studie prov från en häst från Norrtälje norr om Stockholm, 2019, med samma mutationer som prov från Värmdö-utbrottet. Hästen från Norrtälje var ett sto som aborterade. Någon koppling mellan dessa stall undersöktes inte i denna studie.

#### 4.6.5. Ridhästar med abortform eller respiratorisk form

Sex utbrott under åren 2013, 2019, 2020 och 2021 hade mutationen ORF11 T156C, G704T samt N752-mutationen i ORF30. Utbrotten de senaste åren gav respiratoriska symptom, Västra Götaland 2020, Skåne 2021 samt okänd ort 2020. Ett prov från 2013 (okänd ort) kom från ett sto som aborterat. Några kopplingar mellan fallen undersöktes inte i denna studie.

Prov från en ridhäst från Södermanland 2020 hade även mutation ORF11 A129G. Hästen var ett sto som aborterade.

#### 4.6.6. Ridhästar med centralnervösa symptom

År 2017 fick två hopphästar i Blekinge centralnervösa symptom. Deras virus hade samma mutation som senare identifierats hos ridhästarna i det neurologiska utbrottet 2019 i Österåker. Denna mutation har tidigare aldrig rapporterats (NCBI, 2021). En av hästarna från Blekinge stod kvar i samma stall 2021 och var i tävlingsskick<sup>1</sup>. Den andra flyttade till Borås. Ingen koppling mellan stallen undersöktes i denna studie.

---

<sup>1</sup> Samtal med stallägaren 2021-11-01.

#### 4.6.7. Mutationer i ORF34/ORF11 beroende av N/D-mutation?

När jämförelse gjordes mellan ORF 30 N752- respektive D752-mutation med övriga ORF:ar påvisades ett samband. Prover med N752-mutation hade vid 29 utbrott inga mutationer i vare sig ORF11 eller ORF34, och vid 12 utbrott hade de mutationer i någon av dessa ORF:ar.

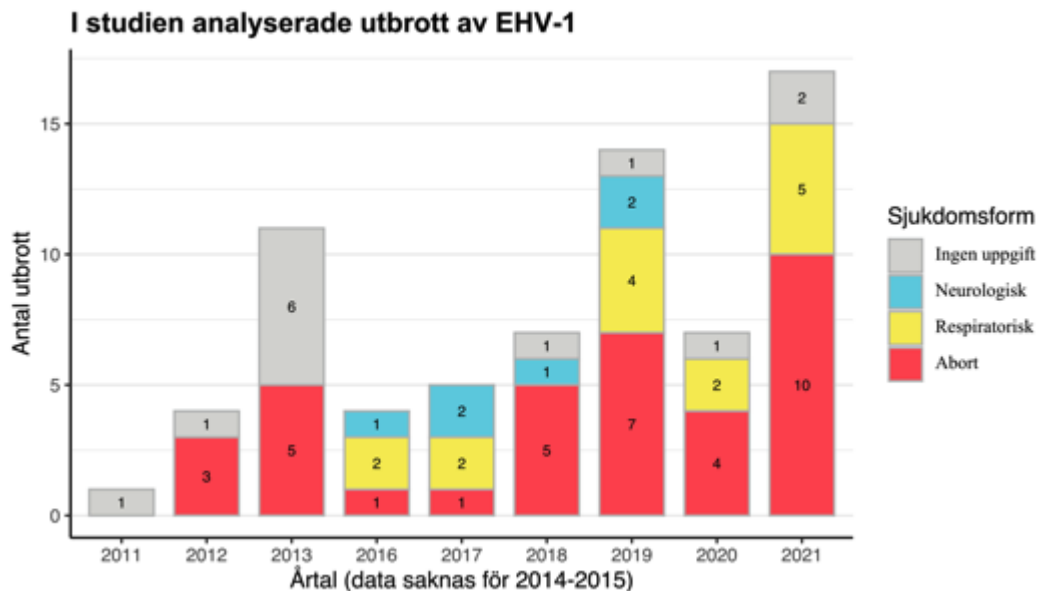
Samtliga prov från utbrott med D752-mutation, där även ORF 11 och ORF34 lyckades sekvenseras, hade mutationer i minst en av dessa ORF:ar. Inget prov var fritt från mutationer i ORF34 och ORF11.

#### 4.7. Epidemiologiska data från remisser

Från 85 positiva prov lyckades PCR för minst en ORF hos 77 unika hästar. Dessa hästar kom från 58 unika utbrott mellan åren 2011–2021 (samt ett från 1990-talet). Årtal, ålder, ras och kön från remisser studerades i förhållande till ställd klinisk diagnos (respiratorisk, abort respektive centralnervös form).

##### 4.7.1. Förändring över tid (2011–2021)

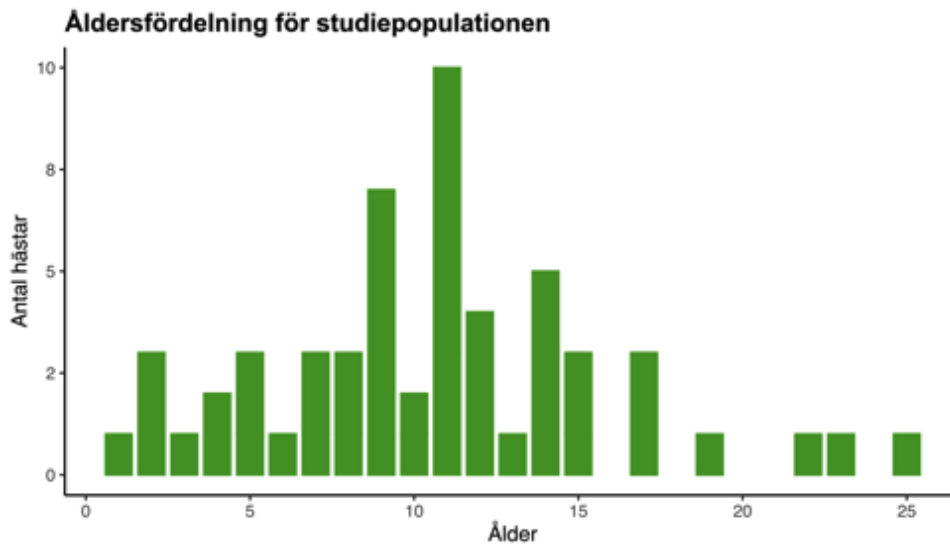
I Figur 25 ses vilka former av EHV-1 som påträffades i studiepopulationen respektive år. Eftersom remisserna inte står i proportion till det verkliga antalet verifierade utbrott ska denna graf inte ses som förändring över tiden. (Det är ungefär samma antal positiva prov från år till år.)



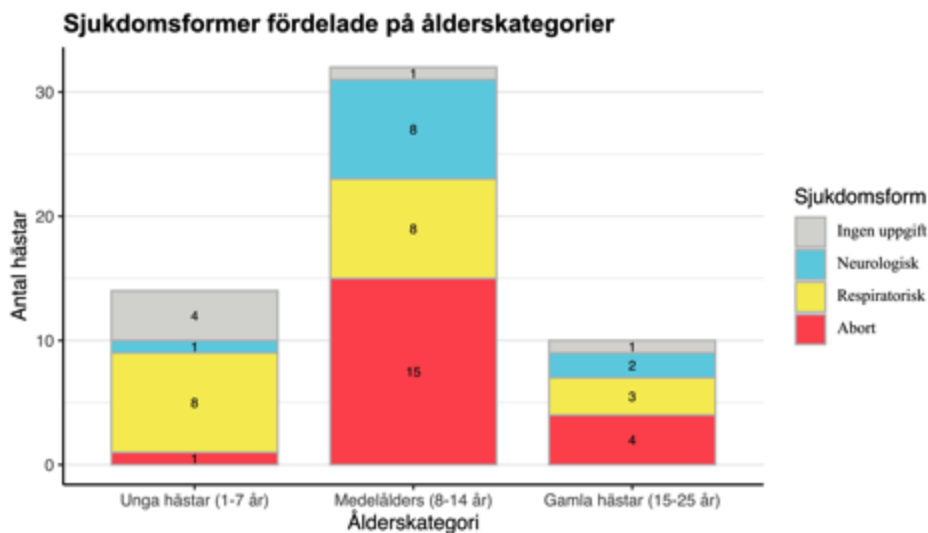
Figur 25. Antal utbrott i studiepopulationen fördelade över åren 2011–2021 (inga prov från 2014–2015).

### 4.7.2. Ålder

Åldersfördelningen hos hästarna i studiepopulationen presenteras i Figur 26. De kliniska symptombilderna fördelades på de olika ålderskategorierna presenteras i Figur 27.



Figur 26. Åldersfördelning i studiepopulationen (remisser).



Figur 27. Klinisk sjukdomsbild fördelat på de olika ålderskategorierna.

### 4.7.3. Raser

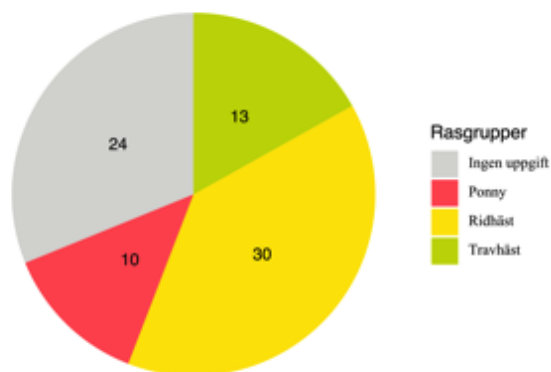
Fördelningen av antalet raser som diagnostiserats för EHV-1 på SVA påträffade i studiepopulationen presenteras i Tabell 13. Hästarna kategoriserades i tre olika rasgrupper; travhäst, ridhäst och ponny, se Figur 28. Ridhästar ser här ut att vara överrepresenterade, men ridhästar är den största gruppen i den svenska hästpopulationen

följt av varmblodig travhäst. I Figur 29 presenteras antalet hästar inom respektive raskategori som drabbats av de olika sjukdomsformerna av EHV-1.

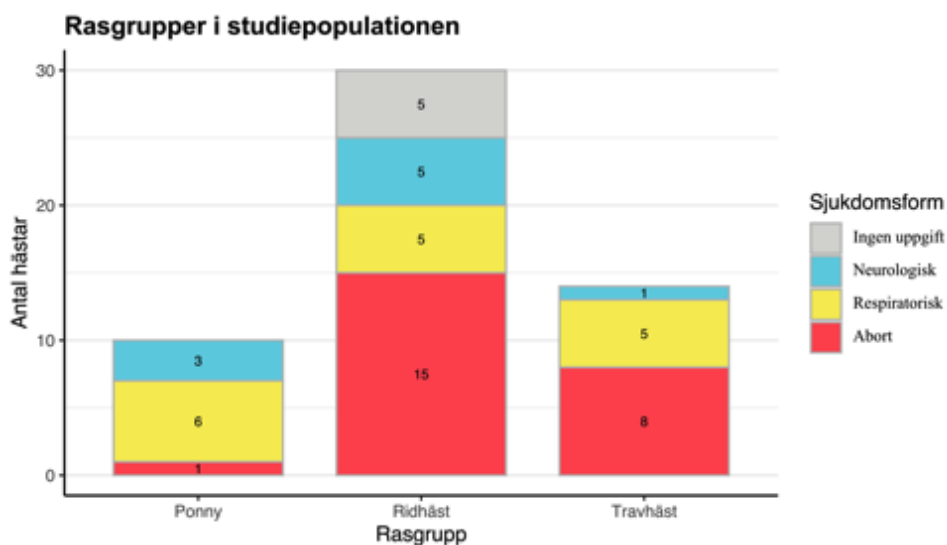
Tabell 13. Fördelning av raser som testat positivt för EHV-1 i studiepopulationen. Totalt 77 hästar. Varmblodig travare (blå) är enda rasen som kategoriserats i gruppen med samma namn. Utöver ponny (okänt vilken typ) kategoriserades Svensk ridponny och Shetlandspanny som Ponny (grön). Övriga hästar klassades som Ridhäst (svart), en mycket heterogen grupp.

Ras	Antal	Ras	Antal
Varmblodig travare	13	Hannoveraner	1
Svenskt varmblod (SWB)	13	Islandshäst	1
Halvblod	6	Korsningar, okänd ras	1
Varmblodig ridhäst	3	KWPN	1
Rysk Basjkir	2	Svensk ridponny	6
American Quarterhorse	1	Ponny	3
Arabiskt fulblod	1	Shetlandspanny	1

Raskategorier i studiepopulationen



Figur 28. Raskategorier som testat positivt för EHV-1 i studiepopulationen. Här redovisas alla unika hästar i studiepopulationen (182 hästar), inklusive de där uppgift om ras saknas.

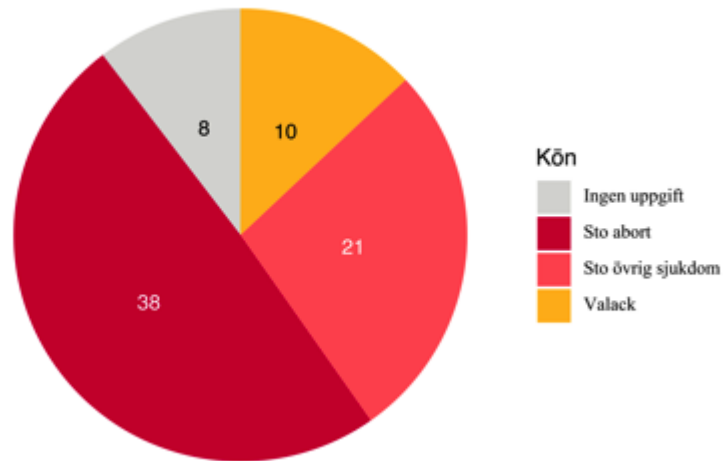


Figur 29. Klinisk sjukdomsbild fördelat på de olika raskategorierna i studiepopulationen.

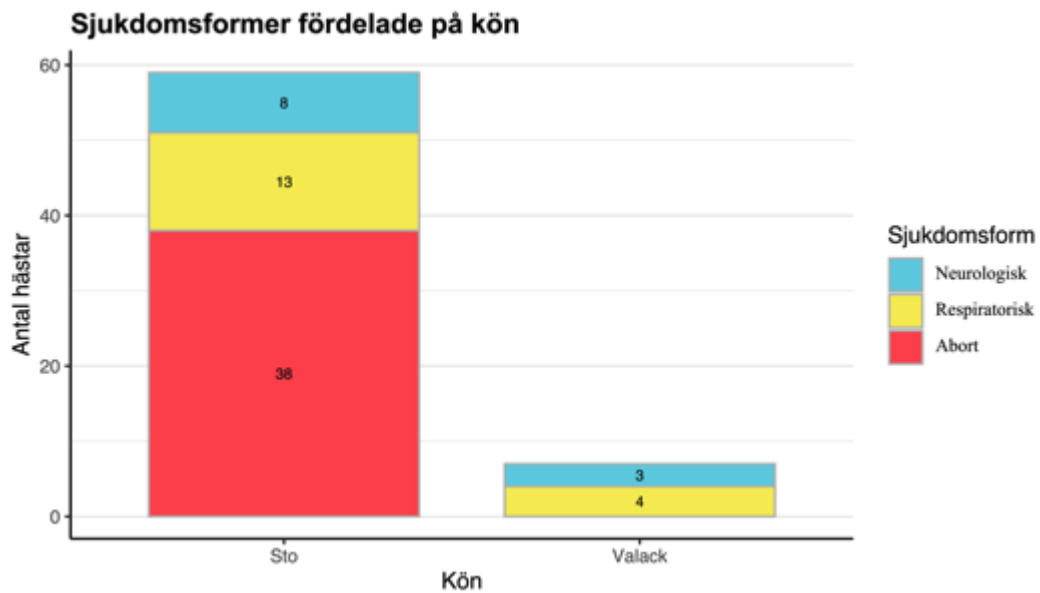
#### 4.7.4. Kön

Könsfördelningen av studiepopulationen redovisas i Figur 30. Sjukdomsformer fördelade på könen redovisas i Figur 31.

**Könsfördelning i studiepopulationen**



Figur 30. Könsfördelning i studiepopulationen.



Figur 31. Sjukdomsformer fördelade på ston och valacker.

## 5. Diskussion och slutsatser

### 5.1. Diskussion

I denna tvärsnittsstudie definierades målpopulationen som alla Sveriges hästar som provtagits vid luftvägsproblem, spontanaborter och/eller neurologisk sjukdom de senaste 10 åren. Vissa djurägare har en tätare kontakt med veterinär och en större benägenhet att vilja provta. Det finns troligtvis ett större mörkertal för lindrig respiratorisk form (febertopp) som missas av djurägaren eller där djurägaren väntar ut sjukdomsförloppet utan att behöva tillkalla veterinär. Detta är alltså inte en studie av alla Sveriges hästar.

#### 5.1.1. Identiska sekvenser tyder på dubbla stammar

I samtliga fall där isolat från fler än en häst från samma utbrott kunde sekvenseras hade isolaten identiska sekvenser. Detta noterar även Nugent *et al.* (2006).

Det talar för att hästar smittar varandra med nytt virus vid ett utbrott och inte att latent virus återaktiveras hos flera hästar samtidigt. Då prevalens av latent EHV-1 i hästpopulationen har visat sig så hög som 25,7-88 % (Carvalho *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2012), samt att dubbla stammar av EHV-1 hos den enskilda hästen inte är ovanlig, 56 % (Pusterla *et al.*, 2012), indikerar detta att hästar återinfekteras.

Dock finns det ingenting som tyder på att smittspridning mellan stallar skulle vara vanligare än reaktivering av latent virus hos en enskild häst som orsak till utbrott. Båda scenarierna är möjliga och troliga. Vi vet inte immunstatus på de hästar som deltog i liggande studie och kan därmed inte uttala oss om detta.

#### 5.1.2. Flertalet tidigare okända mutationer

Eftersom andelen hästar som latent bär på EHV-1 troligtvis är mycket stor är studiepopulationen i detta arbete relativt liten. Trots litet studiematerial påträffades flera nya mutationer som tidigare inte har rapporterats, framför allt i ORF34. Det tyder på att det finns fler okända mutationer än vad som antyds i litteraturen. Variabiliteten i aminosyrorna orsakade av mutationer i ORF34 presenteras av Bryant *et al.* (2018) i Figur 7, kapitel 2.8. Av de sex nya mutationer som föreliggande studie påträffat ger fyra ett skifte i aminosyrasekvensen. Detta ökar variabiliteten från 3,75 % (Bryant *et al.*, 2018) till 7,1 % (denna studie).

Då ORF34 är relativt polymorf och ett stort antal prover visar på unika mutationer ("unassigned", enligt Preziuso *et al.*, 2019) bör tidigare försök till

gruppering av isolaten tolkas med försiktighet. Allt eftersom fler isolat sekvenseras kommer de fylogenetiska strukturerna att förändras.

ORF11 T156C och G704T var den vanligaste mutationskombinationen i denna studie. Det är enligt Garvey *et al.* (2019) även den vanligaste mutationen bland isolaten i GenBank. Det finns endast några hundra isolat i GenBank (NCBI, 2021) och det ska ställas mot miljontals hästar världen över som bär på EHV-1 latent. Därmed är det för tidigt att fastslå att just denna kombination är den vanligaste i världens hästuppopulation.

### 5.1.3. Övriga mutationers påverkan på virulens

Utöver N752/D752-mutationen har inga bevis framlagts för att andra mutationer påverkar virusets virulens. Ingen studie har lyckats definiera en gruppering som särskiljer neurologiska isolat från icke-neurologiska (Nugent *et al.*, 2006; Preziuso *et al.*, 2019; Garvey *et al.*, 2019). Garvey *et al.* (2019) associerar neurologisk sjukdom främst till U<sub>L</sub> Clade 1 och U<sub>L</sub> Clade 3, men inte U<sub>L</sub> Clade 8 där D752 påträffas. U<sub>L</sub> Clade 8 associeras till hypervirulens, men är inte, enligt Garvey *et al.* (2019), associerat till centralnervös form av abortvirus.

Mutation ORF30 A2279G (Nugent *et al.*, 2006) gav centralnervösa symptom hos tre av fyra hästar (en häst aborterade). Dessa isolat hade N752-mutationen. Detta är en kandidat till ytterligare en mutation som predisponerar för centralnervös form av abortvirus. Inga svenska isolat hade denna mutation. Därmed är det inte möjligt att dra några slutsatser om ORF30 A2279G och ökad virulens.

Sutton *et al.* (2021) har påvisat en tidigare okänd mutation ORF11 A713G som upptäcktes i och med utbrottet i Valencia 2021. Inte heller hos svenska hästar, med undantag från de hästar som var i Valencia, påvisades denna mutation. Det är för tidigt att säga att just denna mutation medför ökad virulens. Vår studie visade att det ännu finns många oupptäckta mutationer hos EHV-1, därmed kan man inte dra slutsatsen att det är A713G som låg bakom de kraftiga symptomen hos drabbade hästar. Vidare behöver det inte vara virusstammen i sig som skapade den höga andelen hästar med centralnervösa symptom. Ett stort antal hästar på liten yta ökar den virusdos som varje häst andas in. Då stammen i Valencia hade N752-mutationen i ORF30 så är A713G förstås en intressant upptäckt som måste studeras vidare, till exempel genom helgenomssekvensering.

### 5.1.4. Spridning av olika stammar

I denna studie har vissa unika mutationer, eller kombinationer av mutationer, i ORF30, ORF34 och/eller ORF11 påvisats. Samma kombination ses sällan hos isolat från fler än ett utbrott. Då samma stam identifierats från olika stallar visade det sig emellanåt svårt att påvisa ett samband. Exempelvis kan travstall vara stora med många hästar som tränar och tävlar på olika platser. Antalet spridningsvägar ökar snabbt med antalet hästar och hög rörlighet.

Även då stallen varit mindre och med mindre rörlighet mellan stallen har det visat sig svårt att finna samband. Det kan bero på att vi endast testat en bråkdel av hästuppopulationen. Två identiska mutationskombinationer kan ha kopplingar till varandra långt tillbaka i tiden. Då smitta ofta sker från sto till föl kan denna koppling ligga flera generationer tillbaka. Till exempel, även om isolaten med mutation

ORF11 G748T från Värmland 2018 och ORF11 G748T och G765A från Västerbotten 2019 har ett samband (Norge), så betyder inte det att viruset har muterat just mellan dessa hästar. Den extra mutationen kan ha uppstått flera generationer tillbaka.

### 5.1.5. Epidemiologiskt separerade hästpopulationer

Vid samma mutationskombinationer i ORF30, ORF34 och ORF11 kan det emellanåt påträffas gemensamma faktorer. Till exempel är det enbart isolat från travhästar som har mutationerna ORF34 G156/C303A och ORF11 G748T, samt att dessa travhästar aborterade. Isolat från travhästar ses också med mutation ORF11 T156C. På samma sätt finns det mutationskombinationer med bara ridhästar. Ingen mutationskombination, i denna studie, kom från hästar från båda dessa hästgrupper.

Det här indikerar att travhästar och ridhästar är relativt separerade populationer, och att spridning av EHV-1 mellan dessa grupper är ovanlig. Det ses som ovanligt att en person tränar eller tävlar i båda sporterna (olika förbund). Äldre travhästar skolas emellanåt om till ridhästar och ridhästar kan vara inackorderade på travstall, men majoriteten av de två hästpopulationerna är troligtvis skilda åt ur ett epidemiologiskt perspektiv.

### 5.1.6. Utbrotten i Stockholm 2019

Vi ser ett större antal utbrott i de län med storstadsregioner där hästtäteten är som störst (Heldt *et al.*, 2018); Östra Svealand (Mälardalen, 52 400 hästar), samt Västra Götaland (56 400) och Skåne (58 100). Det är också i dessa regioner som avståndet till veterinär är kortast. Större stall med högre hästtätet och inte minst täta kontakter med andra besättningar ökar smittrycket och därmed risken för allvarligare utbrott.

En confounding factor kan vara olika benägenhet att tillkalla veterinär i olika delar av landet, till exempel avstånd och ekonomi. Hästägare i glesbygd med hästar av mindre ekonomiskt värde och stora avstånd till veterinär kan vara mindre benägna att tillkalla veterinär än de som har dyrare hästar och nära till veterinär.

Denna studie visade att de två utbrotten i Stockholm 2019, Österåker respektive Värmdö, inte hade någon epidemiologisk koppling till varandra. Båda utbrotten hade den allvarligare D752-mutationen, men Värmdö-isolaten saknade mutationer i ORF34 medan Österåker-isolaten hade mutation G136A. Det har funnits misstanke om att de två stora utbrotten i Stockholmstrakten 2019 hade ett samband, men det kunde i och med denna studie avfärdas. Dock påträffades G136A, samma stam som påträffades på Värmdö, i ett isolat från Norrtälje samma år; oklart dock om koppling fanns mellan stallen.

### 5.1.7. Ston mer drabbade?

I denna studie ses en klar övervikt av ston, både vad gäller respiratorisk såväl som neurologisk form. Goehring *et al.* (2006) visar en studie att ston är överrepresenterade vid *allvarliga* centralnervösa symptom (ORF = 3,8, 95 % KI 1,09–13,28). Frågan är om ston är mer känsliga eller om vi ser en summa av confounding factors.



Ston blir äldre än valacker, 22 år respektive 15 år (HNS, 2012), vilket leder till stoppopulationen är en större och äldre än valackpopulation. Det är visat att äldre hästar drabbas hårdare, till exempel visar Klouth & Göhring (2019) att åldersgruppen 15–19 år innebar högre risk för centralnervösa symptom (OR = 3,13, 95 % KI 1,30–7,52).

Det är bara ston (förstås) som kan abortera till följd av aktiv EHV-1-infektion. Vid abortstormar i avelsstall kan även icke-dräktiga ston smittas, vilket kan leda till respiratorisk eller centralnervös form av EHV-1.

Studiepopulationen är begränsad och urvalet inte randomiserat. Sammantaget kan det därför inte, i den här studien, dras några slutsatser om att ston skulle vara mer känsliga mot EHV-1 än valacker.

### 5.1.8. Standard för smittspårning

Införande av sekvensering av ORF30, ORF34 och/eller ORF11 på SVA som standard vid diagnostik av EHV-1 skulle kunna vara ett verktyg för smittspårning och kunskapsuppbyggnad. Det skulle kunna underlätta den komplicerade situationen i stora stall; antal smittvägar ökar snabbt med ökat antal hästar och ökad rörlighet.

Kostnaden för sekvensering skulle öka priset på diagnostik för EHV-1 markant (uppskattningsvis en fördubbling), vilket kan få negativ effekt på benägenheten hos djurägare och veterinär att provta. Dock behövs endast en sekvensering per stall. Ett annat sätt att reducera kostnaden är att endast sekvensera vid större och allvarligare utbrott (centralnervös form).

Ett nationellt finansierat provtagningsprogram skulle kunna öka fokus på EHV-1 och benägenheten att provta. Det skulle förstärka kunskapen om olika stammar och underlätta vid smittspårning. Då det förekommer abortstormar på avelsstall finns ett direkt ekonomiskt samhällsintresse att få sjukdomen under kontroll.

## 5.2. Vad kunde gjorts bättre i denna studie?

Val av ORF för analys landade på ORF30, ORF34 och ORF11. ORF30 gav ytterligare information om den viktiga N752/D752-mutationen, men också påträffades ytterligare en mutation. ORF34 och ORF11 visade på flertalet tidigare okända mutationer.

Ett initialt förslag att inkludera ORF33 och ORF68 utgick pga. bristande värde för fylogenetisk analys samt begränsad tid för arbetet. ORF33 utelämnades då den är en konservativ region och därmed är mindre lämplig för fylogenetisk analys. Den används främst för diagnostik av EHV-1 (och EHV-4), och eftersom proven från SVA var verifierade sedan tidigare tillförde inte detta ny information. ORF68 har visat sig mindre användbar för fylogenetisk analys på grund av en vanligt förekommande deletion på position 701–818 som ger ett ramskifte och försvårar möjligheten klassificera.

Vi kunde valt de ORF:ar som används för clades (Garvey *et al.*, 2019) för att bättre kunna jämföra med andra forskargrupper. Av ekonomiska och tidsmässiga skäl lät det sig inte göras.

Vid SVA:s PCR-analys var elva prover negativa. Några prov var sant negativa vid provtagningstillfället (uppföljning från tidigare sjukdom) och några hade degraderat och hade för låga halter av EHV-1 för att kunna detekteras ( $C_t > 40$ ). Den klassiska nestade PCR-metoden är inte lika känslig som Realtids-PCR. Av PCR-analyserna lyckades cirka 80 %. Realtids-PCR, med högre sensitivitet, skulle kunna öka denna andel. Den klassiska PCR-analysen skulle kunna förbättras för de prov som inte lyckades med så kallad touchdown-metod som ökar både specificiteten och känsligheten.

Studien analyserade isolat från 25 % av utbrotten. Urvalet var inte randomiserat, utan de prov som påträffades hos SVA var de som studerades. Någon uppenbar bias i bortfallen för isolat som sekvenserades kunde inte påvisas, utan det var till synes slumpmässigt vilka prov som fanns tillgängliga hos SVA.

## 5.3. Förslag på framtida studier

### 5.3.1. Fortsatt fylogenetisk kartläggning

Många forskargrupper har försökt gruppera eller bygga clades utifrån rapporterade sekvenser. Ett initiativ borde tas för att gemensamt slå fast en clade-struktur baserat på mutationer från ett antal ORF. Men för detta krävs mer kunskap om vilka mutationer som bidrar till virulens samt vilka ORF som bäst lämpar sig för smittspårning samt en bredare bild av vilka mutationer som finns i omlopp i världen.

### 5.3.2. Prevalensstudie: Provtagning av avlivade hästar

Av Sveriges 355 000 hästar bär troligtvis en stor andel på EHV-1 latent, men det är endast ett tiotal som testar positivt varje år. Ett sätt att bygga kunskap om prevalens och stammar är att provta avlivade eller slaktade hästar. Sekvensering av relevanta ORF:ar skulle ge ytterligare information om prevalens av latent EHV-1-infektion, prevalens av de olika stammarna, prevalens av dubbla virusstammar, med mera.

### 5.3.3. Koppling mellan virus och värd

Forskning på ekvin Major Histocompatibility Complex Klass 1 (MHC-I) visar på möjligheten att detta protein skulle utgöra receptor för EHV-1 (Ma *et al.*, 2013). MHC-I finns på alla celltyper vilket stämmer med att EHV-1 inte har tropism för specifika celler utan kan infektera flera olika typer.

Då hästpopulationen till stor del består av halvblod bör känsligheten för EHV-1 undersökas med andra metoder än analys av raser. En fylogenetisk studie av MHC-I från samma prov som EHV-1 skulle kunna ligga till grund för att påvisa korrelation mellan MHC-I-varianter och olika virusmutationer. Istället för att studera raser finns alltså möjlighet att finna värdspecifika orsaker till att centralnervösa symptom ska utvecklas.

#### 5.3.4. Orsakar D752-mutationen högre smittryck?

D752-mutation påträffades hos 35,6 % av alla isolaten från unika hästar, och 64,4 % hade N752-mutation. Då vi istället studerar unika utbrott (alla hästar inom ett utbrott har samma virusstam) hade endast 19,3 % den till centralnervös form associerade D752-mutationen och 80,7 % hade N752-mutation. Denna skillnad kan antingen förklaras med att D752-mutationen ger en effektivare smittspridning i ett stall, alternativt att den centralnervösa formen bedöms som allvarligare av djurägare och veterinärer med ökad provtagningsbenägenhet som följd.

D752-mutationen har associerats med *längre* duration av *högre* leukocyt-associerad viremi än N752 (Allen & Breathnach, 2006; Van de Walle *et al.*, 2009). Infekterade hästar utsöndrar likartad mängd virus från nasalmukosan, oaktat mutation, trots att stammarna associerats med olika patogenicitet (Goodman *et al.*, 2007). Därmed kan den lägre andel av D752-mutation räknat per utbrott, jämfört med andel av D752-mutation räknat på hästar, förklaras med högre smittryck. Alltså, ett utbrott med D752-mutation skulle därmed kunna orsaka fler sjuka hästar.

En confounding factor som däremot försvårat ett sådan konstaterande är benägenhet att provta. Den respiratoriska formen är inte sällan lindrig, ibland endast en febertopp som inte alltid uppmärksammas av djurägaren. Den centralnervösa formen, å andra sidan, bedöms troligtvis som mer allvarlig av djurägaren som då har större benägenhet att tillkalla veterinär. Alltså, andelen centralnervösa utbrott i förhållande till respiratoriska är troligtvis överskattad. Respiratoriska fall är troligtvis betydligt vanligare än vad denna studie visar eller vad litteraturen anger.

Övriga confounding factors är management, stallens utformning och hästarnas placering i stallet, vaccinationsgrad<sup>1</sup> och initiala smittskyddsåtgärder. Dessa biaser kan inte förringas och inga slutsatser om högre smittryck för D752-mutationen kan göra, utan en framtida studie skulle kunna adressera denna frågeställning.

#### 5.4. Slutsatser

Denna studie har lett fram till ett antal slutsatser angående svenska hästar som provtagits för luftvägsproblem, spontanaborter och/eller centralnervös sjukdom de senaste tio åren:

- Ny smitta trots tidigare infektion. I samtliga fall där isolat av EHV-1 från fler än en häst från samma utbrott kunde sekvenseras hade isolaten identiska sekvenser.
- EHV-1 är mer polymorft än vad som tidigare rapporterats. Nio nya mutationer identifierade i ORF34 och ORF11.
- Ytterligare fylogenetisk kartläggning av virusstammar krävs då det ännu upptäckts många nya mutationer internationellt.
- Det fanns ingen epidemiologisk koppling mellan utbrotten i Österåker respektive Värmdö 2019.
- Lätt att fria samband mellan utbrott av abortvirus, svårare att påvisa samband.

---

<sup>1</sup> Vaccinationsgraden är högre inom travsporten än hos ridhästar. Personlig kommunikation med Gittan Gröndal, tf statsveterinär, SVA, 2021-12-10.

- Travhästar och ridhästar är två hästuppopulationer som har begränsad epidemiologisk kontakt mellan varandra.
- Inga nya mutationer kunde kopplas till ökad virulens.

## Referenser

- Allen, G. P., Kydd, J. H., Slater, J. D. & Smith, K. C. (2004). Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. *Infectious Diseases of Livestock*, 2, 829-859.
- Allen, G. P. & Breathnach, C. C. (2006). Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Veterinary Journal*, 38(3), 252-257.
- Allen, G. P. (2008). Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 69(12), 1595-1600.
- Appling, D. R., Anthony-Cahill, S. J., & Mathews, C. K. (2016). *Biochemistry: Concepts and Connections*. Pearson Education.
- Ataseven, V. S., Dağalp, S. B., Güzel, M., Başaran, Z., Tan, M. T. & Geraghty, B. (2009). Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 339-344.
- Bresgen, C., Lämmer, M., Wagner, B., Osterrieder, N. & Damiani, A. M. (2012). Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 9-16.
- Bryant, N. A., Wilkie, G. S., Russell, C. A., Compston, L., Grafham, D., Clissold, L., McLay, K., Medcalf, L., Newton, R., Davison, A. J. & Elton, D. M. (2018). Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), 817-832.
- Carvalho, R., Oliveira, A. M., Souza, A. M., Passos, L. M. F. & Martins, A. S. (2000). Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, 145(9), 1773-1787.
- Crabb, B. S. & Studdert, M. J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Advances in Virus Research*, 45, 153-190.
- Damiani, A. M., de Vries, M., Reimers, G., Winkler, S. & Osterrieder, N. (2014). A severe equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion outbreak caused by a neuropathogenic strain at a breeding farm in northern Germany. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 555-562.

- Dimmock, N. J., Easton, A. J. & Leppard, K. N. (2007). *Introduction to Modern Virology*, 6th ed. Wiley-Blackwell. ISBN 1-4051-3645-6.
- Edington, N., Welch, H. M., & Griffiths, L. (1994). The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Veterinary Journal*, 26(2), 140-142.
- Gardiner, D. W., Lunn, D. P., Goehring, L. S., Chiang, Y. W., Cook, C., Osterrieder, N., McCue, P., Del Piero, F., Hussey, S. B. & Hussey, G. S. (2012). Strain impact on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion models: Viral loads in fetal and placental tissues and foals. *Vaccine*, 30(46), 6564-6572.
- Garvey, M., Suárez, N. M., Kerr, K., Hector, R., Moloney-Quinn, L., Arkins, S., Davison, A. J. & Cullinane, A. (2018). Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. *PLoS One*, 13(2), e0192301
- Garvey, M., Lyons, R., Hector, R. D., Walsh, C., Arkins, S. & Cullinane, A. (2019). Molecular characterisation of equine herpesvirus 1 isolates from cases of abortion, respiratory and neurological disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens*, 8(1), 7.
- Gilkerson, J. R., Whalley, J. M., Drummer, H. E., Studdert, M. J. & Love, D. N. (1999). Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Veterinary Microbiology*, 68(1-2), ss 27-34.
- Goehring, L. S. (2014). Chapter 90 – Equid herpesvirus-associated myeloencephalopathy. I: Sprayberry, K. A., & Robinson, N. E. (red.) *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences. 387-390.
- Goehring, L. S., van Winden, S. C., Van Maanen, C. & van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. S. (2006). Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 601-607.
- Goehring, L. S., Wagner, B., Bigbie, R., Hussey, S. B., Rao, S., Morley, P. S. & Lunn, D. P. (2010). Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine*, 28(32), 5203-5211.
- Goldsmith, C. S. & Miller, S. E (2009). Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clinical Microbiology Review*, 22(4), 552-563. doi:10.1128/CMR.00027-09.
- Goodman, L. B., Loregian, A., Perkins, G. A., Nugent, J., Buckles, E. L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palu, G., Smith, K.C., Osterrieder, N. & Davis-Poynter, N. (2007). A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathogens*, 3(11), e160.
- Heldt, T., Macuchova, Z., Alnyme, O. & Andersson, H. (2018). *Samhällsekonomiska effekter av hästnäringen - Skattningar baserat på en B.I. – modell av hästnäringen för 2016*. (2018:04). Dalarna University: Ed. Fleyeh, H., Working papers in transport, tourism, information technology and microdata, analysis, 2018\_04. Access via

Hästnäringens Nationella Stiftelse:

<https://hastnaringen.se/app/uploads/2018/11/samhallsekonomiska-effekter-av-hastnaringen.pdf>

Henninger, R. W., Reed, S. M., Saville, W. J., Allen, G. P., Hass, G. F., Kohn, C. W. & Sofaly, C. (2007). Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), 157-165.

HNS (2012). *Hästskattningar 2004 och 2010 – En analys utifrån näringens perspektiv*.

Hästnäringens Nationella Stiftelse.

<https://hastnaringen.se/dokument/hastskattningarna-2004-och-2010-en-analys-utifran-naringens-perspektiv/>

HNS (2017). *Hästar och uppfödare i Sverige – Nyckeltal för svensk hästuppfödning under åren 2012-2016*. Hästnäringens Nationella Stiftelse.

<https://hastnaringen.se/app/uploads/2017/10/hastar-och-uppfodare-i-sverige-avelsrapport-2017-mini.pdf>

HästSverige (2021). *Avelsstoet*. <https://hast sverige.se/om-hastar/hastavel-uppfodning/avelsstoet/> [2021-12-06]

Klouth, E. & Göhring, L. S. (2019). Untersuchungen zur Epidemiologie der EHV-1 Infektionen. *Leipziger Blaue Hefte*, 10. *Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2*, Pferd, 11th International Conference on Equine Reproductive Medicine, 187-188. <https://www.tieraerztekongress.de/epaper-band2/epaper/ausgabe.pdf>

Ma, G., Azab, W. & Osterrieder, N. (2013). Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) - masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Veterinary Microbiology*, 167(1-2), 123-134.

Maxie, M. G. (2015). *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, Volume 3, 6<sup>th</sup> ed, sid 435-437. Elsevier Health Sciences.

McGavin, M. D. & Zachary, J. F. (2007). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th ed. Mosby. ISBN 978-0-323-02870-7.

Mumford, J. A., Hannant, D., Jessett, D. M., O'Neil, T., Smith, K. C. & Ostlund, E. N. (1994). Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with Equid herpesvirus-1. *Equine infectious diseases VII: Proceedings of the Seventh International Conference*, Tokyo, Japan 8th-11th June. New market: R&W Publications Ltd. 261–275.

NCBI (2021). *BLAST – Basic Local Alignment Search Tool*.

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)> [18 okt- 7 dec 2021]

Neubauer, A., Rudolph, J., Brandmüller, C., Just, F. T. & Osterrieder, N. (2002). The equine herpesvirus 1 UL34 gene product is involved in an early step in virus egress and can be efficiently replaced by a UL34-GFP fusion protein. *Virology*, 300(2), 189-204.

- Newcomb, W. W., Trus, B. L., Booy, F. P., Steven, A. C., Wall, J. S. & Brown, J. C. (1993). Structure of the herpes simplex virus capsid – molecular composition of the pentons and the triplexes. *Journal of Molecular Biology*, 232(2), 499-511.
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K. C., Mumford, J. A., Swann, Z., Newton, J. R., Bowden, R.J., Allen, G.P. & Davis-Poynter, N. (2006). Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus non-neuropathogenic disease outbreaks. *Journal of Virology*, 80(8), 4047-4060.
- OIE (2017). *Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4)*. Chapter 2.5.9 OIE Terrestrial Manual 2017.
- Okada, A., Izume, S., Ohya, K. & Fukushi, H. (2015). Equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22 is not essential for pathogenicity in a hamster model, but is required for efficient viral growth in cultured cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(10), 1293-1297.
- Oladunni, F. S., Horohov, D. W. & Chambers, T. M. (2019). EHV-1: A constant threat to the horse industry. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2668.
- Orsini, J. A. & Divers, T. J. (2008). *Equine Emergencies, Treatment and Procedures*. 3rd ed., Saunders. ISBN 978-1-4160-3609-8.
- Paillot, R., Case, R., Ross, J., Newton, R. & Nugent, J. (2008). Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *The Open Veterinary Science Journal*, 2(1) 68-91.
- Paillot, R., Sutton, G., Thieulent, C., Marcillaud-Pitel, C. & Pronost, S. (2020). New EHV-1 variant identified. *Veterinary Record*, 186(17), 573.
- Patel, J. R. & Heldens, J. (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)–epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *The Veterinary Journal*, 170(1), 14-23.
- Perkins, G. A., Goodman, L. B., Tsujimura, K., Van de Walle, G. R., Kim, S. G., Dubovi, E. J. & Osterrieder, N. (2009). Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 375-378.
- Prezioso, S., Sgorbini, M., Marmorini, P. & Cuteri, V. (2019). Equid alphaherpesvirus 1 from Italian horses: Evaluation of the variability of the ORF30, ORF33, ORF34 and ORF68 Genes. *Viruses*, 11(9), 851.
- Pusterla, N., Mapes, S. & Wilson, W. D. (2012). Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses. *The Veterinary Journal*, 193(2), 579-582.
- Pusterla, N., Mapes, S., Akana, N., Barnett, C., MacKenzie, C., Gaughan, E., Craig, B., Chappell, D. & Vaala, W. (2016). Prevalence factors associated with equine herpesvirus type 1 infection in equids with upper respiratory tract infection and/or acute onset of neurological signs from 2008 to 2014. *Veterinary Record*, 178(3), 70-70.



- Reed, S. M. & Toribio, R. E. (2004). Equine herpesvirus 1 and 4. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 20(3), 631-642.
- Rybachuk, G. V. (2009). *Antiviral chemotherapeutic agents against equine herpesvirus type 1: the mechanism of antiviral effects of porphyrin derivatives*. Diss. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.  
[https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool\\_dissertations/2545](https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/2545)
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S. & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed., Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-5823-7.
- SJVFS 2021:10 *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om biosäkerhetsåtgärder samt anmälan och övervakning av djursjukdomar och smittämnen*, Saknr K12 (2021).
- Slater, J. D. (2007). Equine herpesviruses. I: Sellon, D. & Long, M. (red.) *Equine Infectious Diseases*, Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA. 134-153.
- Slater, J. D., Borchers, K., Thackray, A. M. & Field, H. J. (1994). The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology*, 75(8), 2007-2016
- Smith, K. L., Allen, G. P., Branscum, A. J., Cook, R. F., Vickers, M. L., Timoney, P. J. & Balasuriya, U. B. (2010). The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Veterinary Microbiology*, 141(1-2), 5-11.
- Stasiak, K., Dunowska, M. & Rola, J. (2020). Outbreak of equid herpesvirus 1 abortions at the Arabian stud in Poland. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-8.
- Studdert, M. J., Simpson, T. & Roizman, B. (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, 214(4520), 562-564.
- Sutton, G., Thieulent, C., Fortier, C., Hue, E. S., Marcillaud-Pitel, C., Pléau, A., Deslis, A., Guitton, E., Paillot, R. & Pronost, S. (2020). Identification of a new equid herpesvirus 1 DNA polymerase (ORF30) genotype with the isolation of a C2254/H752 strain in French horses showing no major impact on the strain behaviour. *Viruses*, 12(10), 1160.
- Sutton, G., Normand, C., Carnet, F., Couroucé, A., Garvey, M., Castagnet, S., Fortier, C. I., Hue, E. S., Marcillaud-Pitel, C., Legrand, L., Paillot, R., Pitel, P.-H., Cullinane, A. & Pronost, S. (2021). Equine herpesvirus 1 variant and new marker for epidemiologic surveillance, Europe, 2021. *Emerging Infectious Diseases*, 27(10), 2738.
- SVA (2021). *Virusabort (EHV-1) hos häst - Ekvint herpesvirus-1 (EHV-1), Abortvirus (EHV-1)*. <https://www.sva.se/djurhalsa/djursjukdomar-a-o/virusabort-ehv-1-hos-hast/> [2021-02-10]
- Telford, E. A., Watson, M. S., McBride, K., & Davison, A. J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, 189(1), 304-316.

- Tizzard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9th ed., Elsevier. ISBN 978-1-4557-0362-3.
- Van de Walle, G. R., Goupil, R., Wishon, C., Damiani, A., Perkins, G. A. & Osterrieder, N. (2009). A single-nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to cause lethal neurological disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(1), 20-25.
- Van Maanen, C., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. S., Damen, E. A. & Derksen, A. G. P. (2001). Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Veterinary Journal*, 33(2), 191-196.
- Vandekerckhove, A., Glorieux, S., Gryspeerdt, A., Steukers, L., Duchateau, L., Osterrieder, N., Van de Walle, G. R. & Nauwynck, H. (2010). Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. *Journal of General Virology*, 91(8), 2019-2028.
- Wu, L., Cheng, A., Wang, M., Jia, R., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Zhao, X., Chen, S., Liu, M., Zhang, S., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., Sun, D., Wen, X., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., Tian, B., Pan, L. & Chen, X. (2020). Alphaherpesvirus major tegument protein VP22: Its precise function in the viral life cycle. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1908.

# Tack

Det är lätt och roligt att arbeta med engagerade och kompetenta medarbetare! Ett stort tack till min bihandledare Harindranath Cholleti, SLU, som ordnade med allt praktiskt inför den laborativa delen av studien och som lärde upp mig och stöttade mig hela vägen med PCR, sekvensering och fylogenetisk analys.

Stort tack även till min andra bihandledare Gittan Gröndahl på SVA för det driv, engagemang och kompetens du har bistått med under arbetets gång. Och förstås proven, remisserna och de långa mejlkonversationerna dygnet runt, alla dagar i veckan. Samt alla kommentarer på min text (jag blundade för några)...

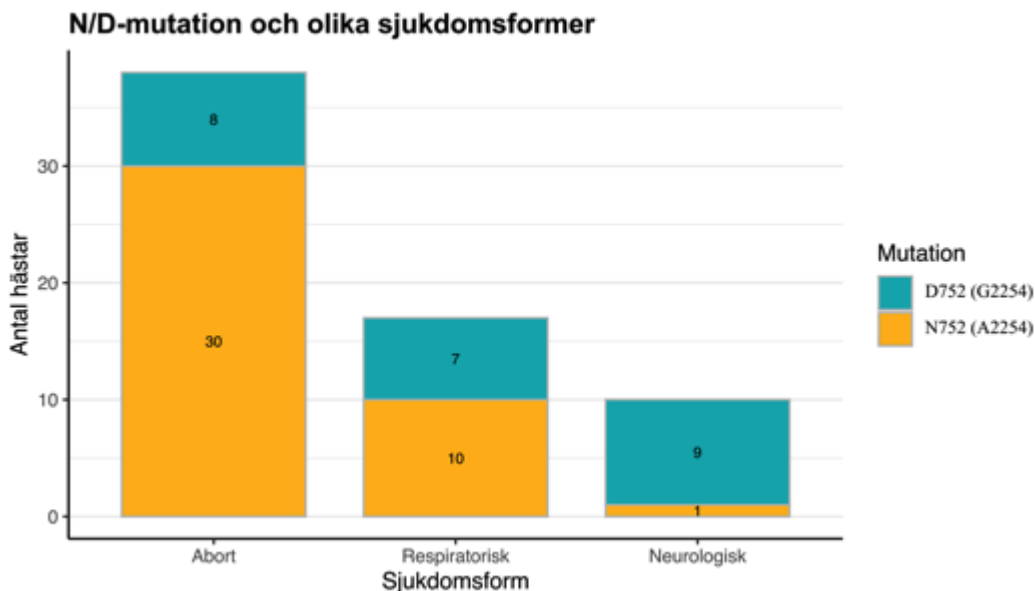
Tack till Anna-Karin Theelke, SVA, för preparering av prover, Ann Nyman för stöd med statistik och epidemiologi, Detti Hegedüs för alla tips med statistikverktyget R och Magnus Åbrink för långa diskussioner om immunologi.

Sist men inte minst, ett stort och varmt tack till min huvudhandledare Mikael Berg för att jag fick chansen att genomföra mitt examensarbete hos dig! Det har känts tryggt och stabilt hela vägen. Trots tydliga ramar för projektet råkade jag sväva iväg lite och arbetet blev kanske lite större än det var tänkt. Tack även för värdefulla synpunkter både på rapport och arbetet som sådant. Det är nästan att jag frågar dig om en doktorandtjänst.

## Populärvetenskaplig sammanfattning

Ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1) är ett vanligt virus som infekterar hästar världen över. Sjukdomen kallas virusabort trots att viruset kan orsaka flera kliniska former; feber, svullna bakben, förkylning, abort, död- eller svagfödda föl samt neurologisk sjukdom. Vid neurologisk form ses feber, rörelsestörningar i bakkroppen, svårt att urinera med mera. Viruset försvinner aldrig från kroppen utan lägger sig vilande (latent) i cellerna och kan väckas till liv och orsaka sjukdom närsomhelst under hästens liv. En stor andel av världens hästar är latent infekterade. I Sverige sker omkring 10-30 utbrott per år.

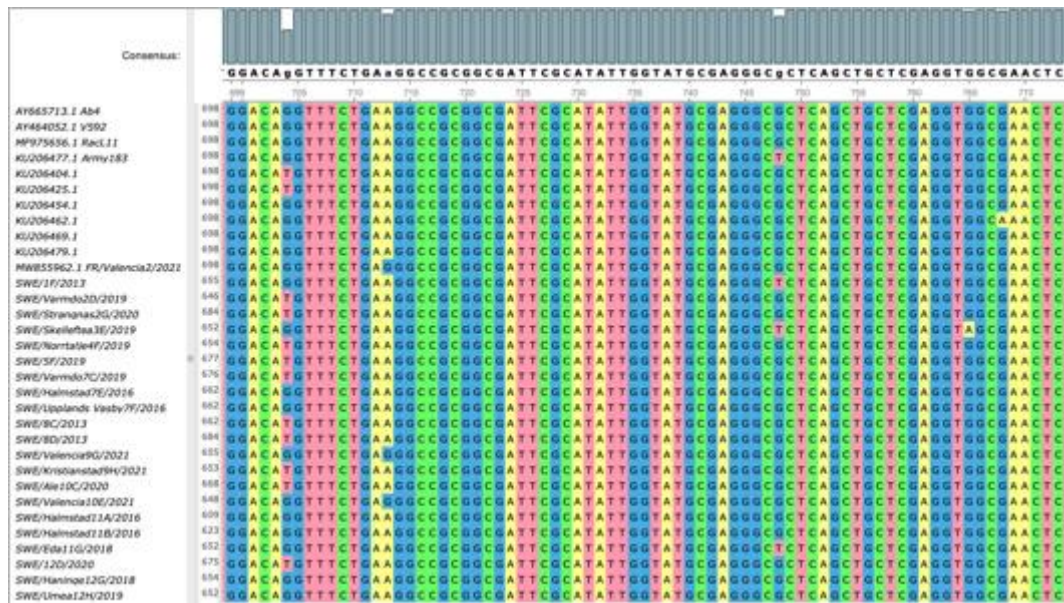
Precis som alla andra virus uppstår mutationer hos EHV-1. Flera studier har påvisat ett samband mellan neurologiska symptom och virus med en mutation som kallas D752. Mutationen har associerats med att viruset förökar och sprider sig snabbare. Dock finns fall av neurologisk form där mutationen saknas. Det finns också exempel på det omvända, där mutationen finns men viruset endast orsakar lindrig förkylning. Sanningen ligger med andra ord inte bara hos viruset, utan även hos hästen eller i omgivande miljöfaktorer.



*N752-mutationen är den vanligaste mutationen. Den ger oftast luftvägssymptom eller aborter hos dräktiga ston. D752-mutationen ger oftare neurologiska symptom, men inte alltid.*

Genom att kartlägga olika stammar av viruset kan epidemiologiska studier göras till exempel i syfte att kunna smittspåra. Denna studie studerade de olika virusstammarnas släktskap. Trots att endast ett 80-tal prover analyserades påträffades

flera nya mutationer som tidigare aldrig har rapporterats. Troligtvis finns fler cirkulerande virusstammar som ännu inte är upptäckta och ytterligare kartläggning av virusstammar krävs i det framtida arbetet med EHV-1.



*Mutationer i en del av EHV-1:s stora DNA. Varje position i DNA:t kan anta A, T, C eller G. Varje rad visar ett prov. En mutation definieras vi här som en förändring mot referensstammen Ab4 (översta raden). Svenska prov börjar med "SWE", övriga prov är från internationella studier.*

I samtliga fall där virus från flera hästar från samma utbrott analyserades hade de identisk stam. Det var alltså en enda virusstam som spreds i varje utbrott.

Under 2019 drabbades stall i Österåker och på Värmdö av den neurologiska formen av EHV-1. Flera hästar avlivades som en följd av detta, medan vissa hästar inte uppvisade några symptom alls. Virus från hästar från båda stallen jämfördes. Då virusen hade olika mutationer kunde denna studie avfärda spekulationer om att dessa utbrott hade ett samband med varandra. Trots att utbrott med neurologiska symptom är ovanliga, skedde det alltså tätt inpå inom samma län. Båda virusstammarna hade dock D752-mutation.

Hoppeliten i Europa drabbades av ett stort utbrott av EHV-1 i samband med tävlingar i Valencia vårvintern 2021. Ett stort antal hästar insjuknade, många uppvisade neurologiska symptom, 18 dog eller fick avlivas. I Valencia påträffades en ny mutation. Den virusstammen hade inte D752-mutationen, men ändå fick många hästar svår sjukdom. Det går dock inte att säga att den nya mutationen i sig orsakade den svåra symptombilden. Förklaringen kan även ligga i att många hästar samlades på liten yta i stallarna, och därmed skapades en hög nivå av smitta i luften.

Studien observerade också att en virusstam som påträffats vid olika utbrott antingen kom från bara stall med travhästar eller bara stall med ridhästar, aldrig både och. Förklaringen till detta ligger troligtvis i att det är två skilda hästpopulationer med begränsat samröre.