

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU

Andrea S. Radalj

IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA HERPESVIRUSA
KONJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY**

Andrea S. Radalj

**IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF EQUINE
HERPESVIRUSES**

PhD thesis
Belgrade, 2018.

MENTOR:

Dr Nenad Milić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
2. Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
3. Dr Miroslav Valčić, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
4. Dr Tanja Jovanović, redovni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA HERPESVIRUSA KONJA

REZIME

Cilj ove doktorske disertacije je identifikacija i molekularna karakterizacija sojeva herpesvirusa konja poreklom iz uzoraka od konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske (BiH) kao i arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Arhivirani sojevi EHV-1 su liofilizati pomenutog virusa izolovani osamdesetih godina prošlog veka iz uzoraka pobačenih fetusa konja, kao i iz uginule novorođene ždrebadi sa ergele „Ljubičevo“. Ispitivani su uzorci poreklom od ukupno 137 nevakcinisanih konja sa ergela i iz privatnog sektora koji su obuhvatali 112 uzoraka nosnih briseva i 100 uzoraka organa - submandibularnih limfnih čvorova, slezine, produžene moždine i kičmene moždine prikupljenih od 25 konja. Prikupljeni uzorci nosnih briseva i organa konja su primenom klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike ispitivani na prisustvo konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 (EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5), dok su arhivirani sojevi ispitivani primenom molekularnih metoda u cilju molekularne karakterizacije.

Posle izolacije i identifikacije virusa na kulturi tkiva primenom testa virus neutralizacije, direktne imunofluorescencije i metode Nested multiplex PCR od ukupno 212 ispitivanih uzoraka organa i nosnih briseva konja prisustvo konjskog herpesvirusa 1 je utvrđeno u 72 uzorka, dok je metodom izolacije virusa na kulturi ćelija sa identifikacijom primenom metode Nested multiplex PCR iz prethodno navedenih uzoraka konjski herpesvirus 5 detektovan u 7 uzoraka, a konjski herpesvirusi 4 i 2 nisu izolovani ni iz jednog uzorka nosnih briseva i organa konja. Primenom metode Nested multiplex PCR za ispitivanje prisustva nukleinskih kiselina konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 direktno u uzorcima ispitivanog materijala (organa i nosnih briseva konja) detektovano je ukupno 162 uzorka pri čemu je EHV-1 detektovan u 153 uzorka, EHV-4 u 11, EHV-2 u 4, a EHV-5 u 23 uzorka ispitivanog materijala. Od ukupnog broja pozitivnih uzoraka mešovite infekcije sa dva ili više konjska herpesvirusa utvrđene su u

16,67% uzoraka, pri čemu su EHV-2 i EHV-4 identifikovani isključivo u okviru mešovitih infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5.

Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih sojeva EHV-1 kao i homologija njihovih sekvenci sa sekvencama sojeva navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%. Analizom sastavljenog filogenetskog stabla ustanovljeno je njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske, Velike Britanije, SAD i Japana. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-4 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je 99%, a na filogenetskom stablu navedeni soj EHV-4 grupisan je sa turskim sojevima i odvojeno od sojeva EHV-4 iz Evrope i Japana. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-2 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 80 do 99%, a analizom dobijenog filogenetskog stabla utvrđeno je njegovo grupisanje sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike Britanije, pri čemu su sojevi iz drugih evropskih zemalja bili odvojeni od navedene grupe. Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih sojeva EHV-5 kao i njihova sličnost sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%. Na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci delova gB gena sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama sojeva EHV-5 iz međunarodne banke gena ustanovljeno je njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske i SAD.

Sekvence dela gena ORF30 11 analiziranih sojeva EHV-1 (91,67%) su posedovale neurovirulentni genetski marker (G₂₂₅₄) što je posledica supstitucije adenina guaninom na poziciji 2254, pri čemu su među identifikovanim neurovirulentnim sojevima EHV-1 bila i četiri arhivirana soja EHV-1 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju. U sekvencama delova ORF68 gena arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju utvrđene su mutacije na nivou pojedinačnih nukleotida karakteristične za sojeve EHV-1 koji pripadaju četvrtoj geografskoj grupi, odnosno evropskim sojevima pomenutog virusa. Kod ostalih dobijenih sekvenci ustanovljen je veliki broj mutacija na osnovu čije analize se isti nisu mogli svrstati ni u jednu geografsku grupu što ukazuje da ORF68 ne predstavlja pogodan molekularni marker za proučavanje sojeva EHV-1 sa ovih prostora.

Ključne reči: EHV-1, EHV-4, EHV-2, EHV-5, konji, izolacija virusa, imunofluorescencija, Nested multiplex PCR, sekvenciranje, molekularna karakterizacija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija sa imunologijom

UDK broj: 579.62:578.825:636.1

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EQUINE HERPESVIRUSES

ABSTRACT

The aim of this PhD thesis was the identification and molecular characterization of equine herpesviruses from horses originating from the Republic of Serbia and The Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina), as well as archived EHV-1 strains in the possession of The Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade. Archived EHV-1 strains were isolated during abortion storms that occurred on „Ljubičevo“ stud farm during the 1980s. Samples originating from 137 unvaccinated horses from stud farms and private breeders, i.e. 112 nasal swab samples and 100 organ samples from 25 horses (submandibular lymph nodes, spleen, spinal cord and medulla) were examined for the presence of equine herpesviruses 1, 4, 2 and 5 (EHV-1, EHV-4, EHV-2 and EHV-5) using standard and molecular virological methods. Archived EHV-1 samples were examined by molecular methods in order to perform their genetic characterization.

Equine herpesvirus 1 was isolated and identified by virus neutralization test, direct immunofluorescence and Nested multiplex PCR in 72 samples. Equine herpesvirus 5 was isolated from 7 examined samples and identified by Nested multiplex PCR, whilst the isolation of EHV-4 and EHV-2 was not successful. The direct examination of the presence of equine herpesviruses 1, 4, 2 and 5 was performed by Nested multiplex PCR directly from the samples of organs and nasal swabs and confirmed 162 positive samples of which 16.67% accounted for mixed infections with multiple equine herpesviruses. Equine herpesvirus 1 was confirmed in 153 samples, EHV-4 in 11, EHV-2 in 4 and EHV-5 in 23 samples, whilst EHV-2 and EHV-4 were only detected in mixed infections with EHV-1 and/or EHV-5.

Partial gB gene nucleotide sequences of identified EHV-1 strains were 98 to 100% homologous amongst each other and with sequences from GenBank whilst their phylogenetic analysis showed grouping with strains from Turkey, UK, USA and Japan.

Nucleotide homology of partial gB gene sequence of the identified EHV-4 strain with other GenBank strains was 99%, whilst it grouped with Turkish EHV-4 strains and separately from the strains from Europe and Japan. The homology of partial gB gene sequence of the identified EHV-2 strain with reference strains from GenBank was from 80 to 99%, whilst it grouped separately from most of European strains and along with Turkish and UK EHV-2 strains on the phylogenetic tree. The analysis of partial gB gene nucleotide sequences of identified EHV-5 strains showed 98 to 100% homology with strains from GenBank and grouping with EHV-5 strains from Turkey and USA.

Sequences of the part of ORF30 gene of 11 analyzed EHV-1 strains (91,67%), 4 of which were archival EHV-1 strains, were marked as neurovirulent (G₂₂₅₄). According to the appearance of single nucleotide polymorphisms, the analysis of partial ORF68 sequences of archival EHV-1 strains showed their grouping with European strains (group 4). Other examined EHV-1 strains in this study had numerous mutations based on which their geographical grouping was not possible, furthermore indicating that ORF68 grouping is not suitable for the analysis of domestic EHV-1 strains.

Keywords: EHV-1, EHV-4, EHV-2, EHV-5, horses, virus isolation, immunofluorescence, Nested multiplex PCR, sequencing, molecular characterization

Scientific area: Veterinary Medicine

Scientific field: Microbiology and Immunology

UDK: 579.62:578.825:636.1

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
Taksonomska kategorizacija herpesvirusa	1
Morfologija i genetika konjskih herpesvirusa	3
Replikacija konjskih herpesvirusa; Litički i latentni ciklus infekcije	9
Konjski herpesvirusi 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4).....	12
Konjski herpesvirusi 2 i 5 (EHV-2 i EHV-5).....	24
Dijagnostika herpesvirusnih infekcija konja	30
2. PREGLED LITERATURE	36
Konjski herpesvirusi 1 i 4.....	36
Konjski herpesvirusi 2 i 5	52
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA.....	60
4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA	62
Materijal za ispitivanje	62
Uzorci – početni materijal za ispitivanje	62
Materijal koji je korišćen u metodi izolacije virusa i testa virus neutralizacije	63
Materijal koji je korišćen u metodi direktne imunofluorescencije (TFA).....	64
Materijal koji je korišćen za metodu lančane reakcije polimeraze (PCR) i metodu Nested multiplex PCR	65
Materijal korišćen za elektroforezu PCR produkata:	69
Materijal korišćen za prečišćavanje DNK iz agaroznog gela:.....	69
Materijal korišćen za prečišćavanje PCR produkata:	70
Materijal korišćen za sekvenciranje PCR produkata:.....	70
Materijal korišćen za određivanje nukleotidne homologije/ redosleda nukleotida i/ili formiranje filogenetskih stabala:.....	71
Metode	72
Metoda izolacije virusa i testa virus neutralizacije.....	72
Metoda direktne imunofluorescencije (TFA)	75
Metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i Nested multiplex PCR.....	76
Metoda izvođenja elektroforeze PCR produkata.....	82

Metoda prečišćavanja DNK iz agaroznog gela	82
Metoda prečišćavanja PCR produkata.....	83
Metoda sekvenciranja PCR produkata	84
Utvrđivanje homologije nukleotidnih sekvenci odabranih sojeva EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 sa sekvencama navedenih virusa registrovanim u banci gena	86
Određivanje redosleda nukleotida u regionima ORF30 i ORF68 genoma EHV-1	87
Izrada filogenetskih stabala odabranih i izolovanih sojeva herpesvirusa konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske	87
5. REZULTATI	88
Rezultati izolacije virusa	88
Rezultati identifikacije izolovanih sojeva EHV-1/EHV-4 primenom testa virus neutralizacije.....	93
Rezultati identifikacije izolovanih sojeva EHV-1/EHV-4 metodom direktne imunofluorescencije.....	95
Rezultati identifikacije izolata konjskih herpesvirusa primenom metode Nested multiplex PCR	98
Rezultati Nested multiplex PCR – detekcija EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u uzorcima organa i nosnih briseva konja	99
Rezultati amplifikacije dela gena ORF30 EHV-1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR).....	104
Rezultati amplifikacije dela gena ORF68 EHV-1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR).....	105
Rezultati sekvenciranja delova gB gena EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5.....	106
Rezultati sekvenciranja delova gena ORF30 i ORF68 EHV-1	120
Rezultati utvrđivanja redosleda nukleotida u regionu ORF30 genoma EHV-1 ...	125
Rezultati utvrđivanja redosleda nukleotida u regionu ORF68 genoma EHV-1 sa filogenetskom analizom.....	127
Filogenetska analiza izolata i sojeva konjskih herpesvirusa poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske	130
6. DISKUSIJA	135
7. ZAKLJUČCI	150
8. SPISAK LITERATURE.....	152

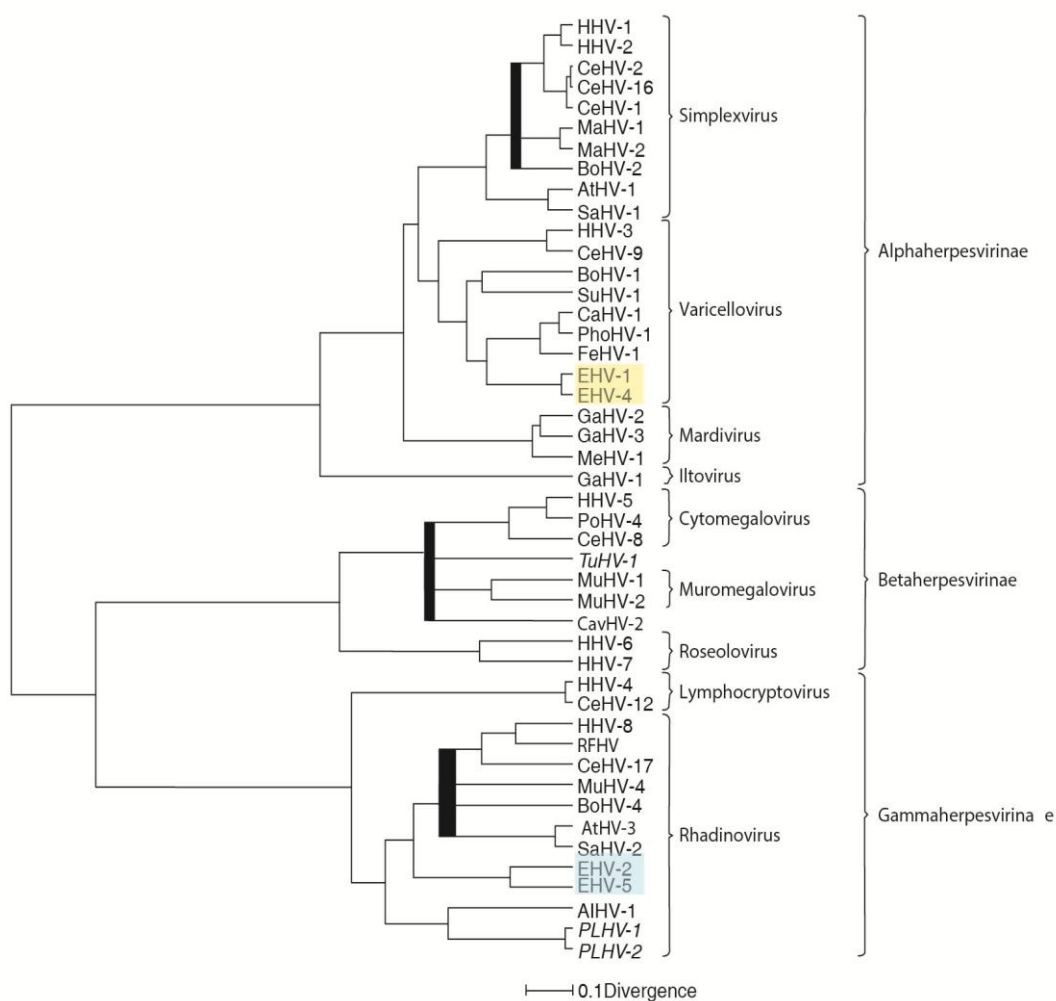
1. UVOD

Herpesvirusi predstavljaju jedne od najznačajnijih patogena svih pripadnika familije *Equidae* širom sveta i do danas ih je identifikovano ukupno četrnaest, pri čemu su u patologiji konja zastupljeni konjski herpesvirusi 1, 2, 3, 4 i 5 (EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4 i EHV-5) (Bryans i Allen, 1986; Borchers i sar., 1999; Nordengrahn i sar., 2002; Reed i Toribio, 2004). Slično ostalim pripadnicima familije *Herpesviridae* koji inficiraju životinje i ljude, herpesvirusi konja poseduju karakterističan životni ciklus koji im obezbeđuje perzistenciju u inficiranoj populaciji. Navedeni virusi inficiraju više vrsta ćelija organizma, pri čemu izbegavaju imunološki odgovor domaćina na različite načine od kojih je uspostavljanje latentne infekcije najznačajniji mehanizam koji herpesvirusima obezbeđuje održavanje u inficiranoj populaciji konja, kao i mogućnost prenošenja virusa u nezaražena krda uvođenjem latentno inficiranih jedinki (Slater, 2014). Herpesvirusi su identifikovani kod insekata, gmizavaca, vodozemaca i mekušaca, kao i većine ptica i sisara, a barem jedna značajna bolest svake vrste domaćih životinja, izuzev ovaca, izazvana je virusom iz familije *Herpesviridae* (Murphy i sar., 1999).

Taksonomska kategorizacija herpesvirusa

Prema najnovijoj taksonomskoj kategorizaciji, familija *Herpesviridae* je zajedno sa novim familijama *Alloherpesviridae* i *Malacoherpesviridae* uvrštena u novoformirani red *Herpesvirales*. Familija *Herpesviridae* je podeljena u tri podfamilije - *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae*, a sadrži viruse gmizavaca, ptica i kičmenjaka, dok familije *Alloherpesviridae* i *Malacoherpesviridae* sadrže viruse žaba i riba, odnosno virus školjki (Minson i sar., 2000, Davison i sar., 2009, van Beurden i Engelsma, 2012) (Slika 1). Klasifikacija herpesvirusa u podfamilije je izvršena na osnovu njihovog tropizma prema određenim ćelijama, vrste oboljenja koju izazivaju, načina uspostavljanja latentne infekcije kao i nukleotidnih sekvenci (van Regenmortel i sar., 2000). Virusi iz podfamilije *Alphaherpesvirinae* inficiraju veliki broj vrsta domaćina, imaju kratak ciklus replikacije, brzo se umnožavaju i dovode do pojave citopatogenog efekta u ćelijskim kulturama i uspostavljaju latentnu infekciju u senzornim ganglijama (Roizman i sar., 1981). Konjski herpesvirusi 1 i 4 se nalaze u

okviru roda *Varicellovirus* navedene podfamilije zajedno sa virusom koitalnog egzantema konja (EHV-3), magarećim herpesvirusom 3 (EHV-8), herpesvirusom gazela (EHV-9), goveđim herpesvirusom 1 (BoHV-1), goveđim herpesvirusom 5 (BoHV-5), herpesvirusom pasa (CaHV-1), virusom rinotraheitisa mačaka (FeHV-1), varicella-zoster virusom (humani herpesvirus 3; HHV-3), kao i uzročnikom Aujeckijeve bolesti (SuHV-1) (Patel i Heldens, 2005; Davison i sar., 2009). Virusi iz roda *Varicellovirus* se razlikuju prema tropizmu od isključivo neurotrofnih virusa kao što je HHV-3 do virusa koji su isključivo limfotropni.



Slika 1. Filogenetsko stablo familije *Herpesviridae* (Davison, 2008)

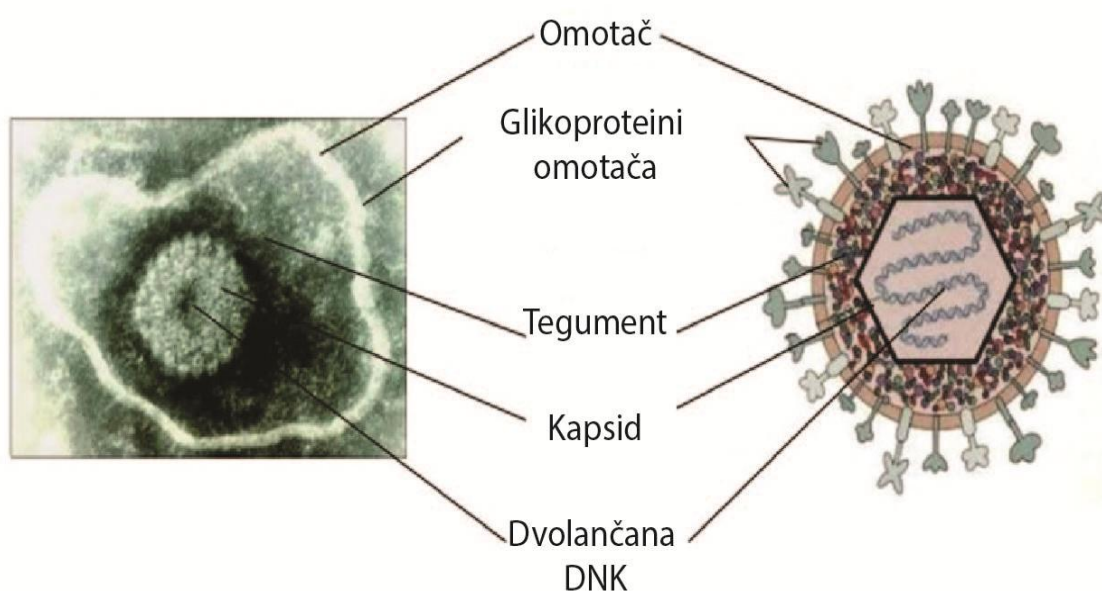
Konjski herpesvirusi 1 i 4 se prema tropizmu nalaze na sredini u odnosu na navedene ekstreme s obzirom da tokom ciklusa infekcije inficiraju kako nervno, tako i limfno tkivo (Slater, 2014). U okviru roda *Simplexvirus* navedene podfamilije su

svrstani virus goveđeg mamilitisa (BoHV-2) i humani herpesvirusi 1 i 2 (HHV-1 i HHV-2), dok rodovima *Mardivirus* i *Iltovirus* pripadaju uzročnik Marekove bolesti živine (GaHV-2), odnosno uzročnik infektivnog laringotraheitisa živine (GaHV-1). *Betaherpesvirinae* karakteriše ograničen broj vrsta prijemčivih domaćina, duži replikativni ciklus u inficiranom organizmu, odnosno ćelijskoj kulturi. Ćelije inficirane navedenim virusima su često uvećane (citomegalija), a latenciju uspostavljaju u limfocitima, sekretornim ćelijama, bubrezima i drugim tipovima ćelija (Roizman i Sears, 1996; Murphy i sar., 1999). U rod *Cytomegalovirus* navedene podfamilije su svrstani humani citomegalovirus (HHV-5) i citomegalovirusi primata (CeHV-5, McHV-3, PnHV-2), u rodu *Muromegalovirus* su citomegalovirusi miševa (MuHV-1 i MuHV-2), a u okviru roda *Roseolovirus* su humani herpesvirusi 6 i 7 (HHV-6 i HHV-7). U novoformirani rod *Proboscivirus* u okviru podfamilije *Betaherpesvirinae* svrstan je skoro opisani endoteliotropni herpesvirus slonova (ElHV-1) odgovoran za fatalno perinatalno oboljenje afričkih i azijskih slonova (Richman i sar., 1999; Davison i sar., 2009). U ovu podfamiliju su ranije bili svrstani i konjski herpesvirusi 2 i 5 koji su danas smešteni u podfamiliju *Gammaherpesvirinae*, a ranije su u literaturi navođeni kao citomegalovirusi (Erasmus, 1970; Studdert, 1974; Browning i Studdert, 1988; Staczek, 1990; Telford i sar., 1993). Gamaherpesvirusi se replikuju i ostvaruju latentnu infekciju u limfoidnim tkivima (uglavnom T ili B limfocitima), međutim dokazano je da neki virusi iz ove podfamilije imaju tropizam i prema fibroblastima, epitelnim i endotelnim ćelijama (Roizman i sar., 1981; Kieff i Liebowitz, 1990; Drummer i sar., 1996). Podfamilija *Gammaherpesvirinae* se prema novoj klasifikaciji deli na rodove *Lymphocryptovirus* gde je svrstan Epstein-Barr virus (HHV-4) i *Rhadinovirus* gde se nalaze goveđi herpesvirus 4 (BoHV-4) i humani herpesvirus 8 (HHV-8) povezan sa Kapošijevim sarkomom, kao i na dva novoformirana roda i to: *Macavirus* čiji je predstavnik virus maligne kataralne groznice (AIHV-1) i *Percavirus* u koji su iz roda *Rhadinovirus* zajedno sa herpesvirusom jazavaca (MusHV-1) premešteni i konjski herpesvirusi 2 i 5 (Davison i sar., 2009).

Morfologija i genetika konjskih herpesvirusa

Uprkos velikom broju opisanih vrsta herpesvirusa, svi imaju zajedničke karakteristike koje se odnose na morfologiju viriona, građu genoma i biološke osobine uključujući način replikacije u inficiranim ćelijama i sposobnost izazivanja latentne

infekcije u organizmima prijemčivih jedinki (Roizman i Pellett, 2001). Herpesvirusi su morfološki različiti od svih drugih poznatih virusa. Virione prečnika u proseku 150 nm (120 do 300 nm) okružuje lipidni omotač sa velikim brojem imunološki značajnih glikoproteinskih peplomera koje imaju važnu ulogu u procesu infekcije ćelija domaćina. Virioni herpesvirusa se sastoje iz nukleokapsida ikosaedrične simetrije sastavljenog iz 162 kapsomere koga okružuje proteinski matriks – tegument (Slika 2). Smatra se da je uloga tegumenta povezivanje kapsida i virusnog omotača kao i da služi kao rezervoar virusnih proteina neophodnih tokom inicijalne faze infekcije. Pored toga, veličina zrelih virusnih čestica je varijabilna u zavisnosti od vrste herpesvirusa i zavisi upravo od veličine tegumenta. Unutar kapsida herpesvirusa nalazi se virusni genom u vidu dvolančane DNK od 125-290 kb (Batterson i Roizman, 1983; Pellett i sar., 1985; Spear, 1985; Roizman i Sears, 1993; Murphy i sar., 1999; Pellett i Roizman, 2006).



Slika 2. Građa herpesvirusa (Gryspeerdt, 2011)

Ustanovljene su velike razlike u sastavu, veličini i organizaciji genoma herpesvirusa: procentualni odnos parova guanina i citozina varira između 32 i 74%, što je više nego u okviru DNK svih eukariota; veličina genoma herpesvirusa varira od 125 do 290 kb i organizacija genoma pojedinačnih virusa je veoma raznolika (Murphy i sar., 1999; Pellett i Roizman, 2006). Ponavljajuće DNK sekvence se javljaju na različitim mestima u genomu herpesvirusa deleći ga pri tom na dva jedinstvena dela, odnosno na

jedinstveni kratki (U_S) i jedinstveni dugački segment (U_L). Raspored i broj navedenih unutrašnjih (I_R) i terminalnih (T_R) ponavljajućih sekvenci se menja u zavisnosti od pojave rekombinacija unutar i između gena i uslovljava tolike razlike u veličinama genoma pojedinačnih herpesvirusa (Roizman i Sears, 1996; Murphy i sar., 1999). Geni herpesvirusa se u širem smislu mogu podeliti na gene koji kodiraju sintezu proteina odgovornih za virusnu replikaciju (rane gene), gene koji kodiraju sintezu strukturnih proteina virusa (kasne gene) i heterologne gene koji nisu ključni za proces replikacije herpesvirusa u ćelijskim kulturama i nisu prisutni kod svih herpesvirusa (Murphy i sar., 1999).

Virioni herpesvirusa sadrže preko 30 strukturnih proteina od kojih je 6 prisutno u nukleokapsidu, a dva su direktno vezana za virusnu DNK. Glikoproteini herpesvirusa kojih ima ukupno 12, nalaze se u sastavu virusnog omotača (peplosa) odakle se većina projektuje u vidu peplomera. Glikoproteini herpesvirusa predstavljaju epitope koje prepoznaju virus-neutralizujuća antitela. Navedeni glikoproteini B, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gN) i gp2 (gp300) imaju uloge u adsorpciji i penetraciji virusa kao i u fuziji inficiranih ćelija i širenju virusa između ćelija (Turtinen i Allen, 1982; Welch i sar., 1992; Murphy i sar., 1999). U esencijalne glikoproteine herpesvirusa spadaju gB, gD, gH, gK i gL koji su neophodni za proces replikacije virusa u ćelijskoj kulturi, dok su preostali glikoproteini označeni kao neesencijalni jer nisu potrebni za *in vitro* replikaciju virusa. Uprkos činjenici da se neutralizujuća antitela stvaraju protiv svih glikoproteina, gB, gC i gD su imunodominantni (O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Azab i sar., 2010). Glikoproteini B, H i L su konzervirani kod svih herpesvirusa i esencijalni za procese penetracije virusa i fuzije sa membranom prijemčivih ćelija domaćina (Crabb i Studdert, 1995; Subramanian i sar., 2007). Glikoprotein B EHV-1, kao i gB ostalih humanih i animalnih herpesvirusa, ima ulogu u procesima penetracije virusa i ćelijske fuzije (Crabb i Studdert, 1995; Wellington i sar., 1996). Glikoprotein C igra važnu ulogu u ranoj fazi infekcije i adsorpciji virusa na prijemčive ćelije, procesu oslobađanja viriona iz inficiranih ćelija, ali i kao receptor za C3 komponentu komplementa na površini ćelija inficiranih EHV-1 (Crabb i Studdert, 1995; Huemer i sar., 1995; Osterrieder, 1999; Azab i sar., 2010). Dokazano je da monoklonska antitela protiv gD sprečavaju penetraciju virusa u prijemčive ćelije, a funkcija navedenog glikoproteina se dovodi u

vezu i sa fuzijom ćelija tokom širenja virusa u ćelijskoj kulturi (Whittaker i sar., 1992; Crabb i Studdert, 1995; Csellner i sar., 2000; Van de Walle i sar., 2008). Glikoprotein G ima imunomodulatornu funkciju, dok je gH važan u širenju virusa između prijemčivih ćelija nezavisno od prisustva integrina (Azab i sar., 2012; Thormann i sar., 2012). Glikoprotein gp2 ne poseduje analoga kod herpesvirusa drugih vrsta životinja i ljudi, odnosno zajednički je konjskim herpesvirusima 1, 4 i 8 (herpesvirus magaraca 3) i predstavlja jedan od najbrojnijih imunogenih glikoproteina u sastavu EHV-1 i EHV-4 (Crabb i Studdert, 1990; Crabb i sar., 1991). Dokazano je da je kod mutanata EHV-1 sa delecijom gena koji kodira gp2 oslabljena sposobnost napuštanja inficirane ćelije, ali je očuvana sposobnost direktnog širenja virusa između ćelija (Sun i sar., 1996; Rudolph i Osterrieder, 2002).

Genomi EHV-1, EHV-4 i EHV-2 su kompletno sekvencirani, pri čemu su za EHV-5 do 2015. godine bile prijavljene samo sekvence koje kodiraju sintezu pojedinačnih glikoproteina (Telford i sar., 1992; Telford i sar., 1995; Telford i sar., 1998; Holloway i sar., 1999; Dunowska i sar., 2000; Thorsteinsdóttir i sar., 2010; Wilkie i sar., 2015). Konjski herpesvirusi 1 i 4 poseduju istu konformaciju genoma, pri čemu se sa obe strane US segmenta nalaze identične ponavljajuće sekvence (unutrašnje - I_R i terminalne -T_R) tako da se geni koji se nalaze u okviru ovih sekvenci ponavljaju dva puta u genomu. Genom EHV-1 je veličine 150 kilobaza (kb) i kodira 76 gena tj. 80 otvorenih okvira čitanja (*eng.* open reading frame; ORF) od kojih se 63 nalaze u okviru U_L segmenta, 9 u U_S segmentu i po 4 u ponavljajućim segmentima (I_R i T_R). U Tabeli 1. su prikazani neki značajni geni EHV-1 i EHV-4 u korelaciji sa proteinima čiju sintezu kodiraju i njihovom funkcijom (Telford i sar., 1998).

Tabela 1 Funkcije nekih gena konjskih herpesvirusa 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4) i njihove međusobne sličnosti

Gen (ORF)	Funkcija	Sličnost sekvence u genomima EHV-1 i EHV-4
10	Protein virusnog omotača	88%
11	Protein tegumenta	78%
16	gC	81,4%
22	Protein kapsida	91,8%
30	DNK polimeraza	88,3%
33	gB	89,6%
38	Timidin kinaza	88,9%
39	gH	85,7%
42	Protein kapsida u sastavu heksona i pentona	96,4%
43	Protein kapsida	94,6%
44	Pakovanje virusne DNK	93,7%
47		
52	gM	86,7%
57	Komponenta DNK helikaze	92,6%
62	gL	74,2%
68	Nepoznata funkcija	60%
70	gG	72,2%
71	gp2	61,1%
72	gD	76,6%
73	gI	74%
74	gE	85,4%
76	Protein tegumenta	54,9%

Konjski herpesvirus 4 poseduje nešto manji genom od 145 kb sa 79 otvorenih okvira čitanja od kojih su 3 u duplikatu u okviru ponavljajućih sekvenci, odnosno 76 gena koji prema poziciji u potpunosti odgovaraju istim u genomu EHV-1. Procentualni odnos parova guanina i citozina kod EHV-4 iznosi 50,5% u poređenju sa 56,7% kod EHV-1. Stepenn sličnosti aminokiselinskih sekvenci proteina EHV-1 i EHV-4 iznosi od 55 do 96% pri čemu su najmanja odstupanja utvrđena kod proteina koji su konzervirani kod svih herpesvirusa sisara uključenih u replikaciju virusne DNK i formiranje kapsida. Navedene proteine kodiraju geni 42 i 43 (proteini kapsida), 44 i 47 (uloga u pakovanju virusne DNK) i 57 - komponenta DNK helikaze (Tabela 1.). Genomi oba navedena virusa su slične veličine i poseduju veliki broj homolognih sekvenci, međutim

predstavljaju genetski i fenotipski različite viruse (Telford i sar., 1992; Telford i sar., 1998; O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Značajne su razlike u sekvencama zabeležene u delu gena 70 koji kodira sintezu glikoproteina G (gG), s obzirom da je isti imunološki veoma značajan jer dovodi do sinteze specifičnih antitela u organizmima inficiranih konja (Crabb i Studdert, 1993). Na osnovu ovih saznanja napravljen je imunoenzimski test - ELISA (*eng.* enzyme linked immunosorbent assay) čija je primena po prvi put omogućila diferencijaciju između specifičnih antitela protiv EHV-1 i EHV-4 u ispitivanim serumima konja (Crabb i Studdert, 1993; Crabb i sar., 1995).

Postoje velike razlike u virulenciji između izolata EHV-1 i EHV-4. Visokovirulentni sojevi EHV-1 kao što su Ab4 i Army-183 su endoteliotropni, dovode do pojave viremije i pobačaja, a posle eksperimentalne infekcije konja do pobačaja i neurološkog oboljenja. Drugi izolati, npr. V592 su slabije virulentni, sa manje izraženim endoteliotropizmom, dovode do niskih nivoa viremije i ređe izazivaju teške kliničke simptome karakteristične za visokovirulentne sojeve EHV-1. Navedeni sojevi se često koriste kao kontrole u radovima u kojima se ispituju neurovirulentni sojevi EHV-1 (Smith i sar., 2000; Tearle i sar., 2003; Stasiak i sar., 2015). Na primer, nukleotidne sekvence sojeva EHV-1 Ab4 i V592 se razlikuju za 0,1% i to uglavnom na nivou pojedinačnih nukleotida. U okviru gena 68 (ORF68) EHV-1 je ustanovljen najveći procenat varijacija (oko 2%) i iz navedenog razloga se isti koristi kao marker u epizootiološkim studijama. Međutim, patogeni potencijal sojeva nije doveden u vezu sa različitim grupama sojeva EHV-1 koje se formiraju na osnovu navedenog markera (Nugent i sar., 2006).

Konjski herpesvirusi 2 i 5 su genetski i antigenski različiti od EHV-1 i EHV-4 pri čemu nije utvrđeno postojanje ukrštene reaktivnosti između neutralizacionih antitela protiv navedenih grupa virusa (Plummer i sar., 1973; Studdert., 1974; Browning i Studdert, 1988; Agius i Studdert, 1994). Virusi iz podfamilije *Gammaherpesvirinae* se morfološki ne razlikuju od ostalih herpesvirusa, dok su genomi EHV-2 i EHV-5 nešto veći nego kod EHV-1 i EHV-4 i iznose oko 184, odnosno 182 kb (Plummer i Waterson, 1963; Telford sar., 1995; Wilkie i sar., 2015). Genom EHV-2 se sastoji iz velike centralne sekvence (149 kb) oivičene sa dve terminalne ponavljajuće sekvence i iz nekoliko kratkih I_R na različitim pozicijama pri čemu približno trećina sekvence genoma navedenog virusa ne kodira sintezu proteina (Browning i Studdert, 1989;

Telford i sar., 1995). Broj funkcionalnih otvorenih okvira čitanja (ORF) iznosi 78 (jedan se ponavlja u okviru T_R) u genomu EHV-2, odnosno 79 u genomu EHV-5. Pored toga, terminalne ponavljajuće sekvence u genomu EHV-2 su znatno veće (17,5 – 18,3 kb) nego u okviru genoma EHV-5 (10 kb). Konjski herpesvirusi 2 i 5 su na nivou genetskih sekvenci, odnosno proteina slični oko 60% (Agius i sar., 1992; Wilkie i sar., 1995; O'Callaghan i Osterrieder, 2008).

Replikacija konjskih herpesvirusa; Litički i latentni ciklus infekcije

Replikacija herpesvirusa je najbolje proučena kod humanih herpesvirusa, odnosno HSV-1 koji predstavlja model za izučavanje replikacije herpesvirusa drugih vrsta. Smatra se da se virusi iz podfamilija *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* replikuju na sličan način samo sporije od predstavnika podfamilije *Alphaherpesvirinae* (Murphy i sar., 1999). Jedan ciklus replikacije virusa (litički ciklus) traje oko 20 h tokom kojih se sve odigrava navedenim redosledom: adsorpcija virusa na ćelijsku membranu domaćina, fuzija omotača virusa sa ćelijskom membranom i penetracija virusa u citoplazmu ćelije, ulazak virusne DNK u jedro, replikacija virusne DNK, sinteza virusnih proteina, sinteza kapsida virusa, napuštanje ćelijskog jedra, sticanje spoljašnjeg omotača napuštanjem ćelije i njena smrt. Tokom ovih faza infekcije, transkripcija virusnih gena je postupno regulisana u 3 različite faze: prva rana (*eng.* immediate early – IE), rana (*eng.* early – E) i kasna (*eng.* late – L), a u skladu sa tim se razlikuju IE, E i L geni, odnosno proteini virusa (Murphy i sar., 1999; Stokes i sar., 1996; Knopf, 2000). Produkti gena iz svake od navedenih faza imaju regulatorne uloge koje, zajedno sa proteinima ćelije domaćina, podstiču ekspresiju gena drugih faza (Slater, 2014). Vezivanje EHV-1 i EHV-4 za ćeliju domaćina je posredovano glikoproteinima B, C, D i ćelijskim receptorima (npr. heparin sulfat) (Murphy i sar., 1999; O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Azab i sar., 2010; Azab i Osterrieder, 2012). Ulazak EHV-1 u prijemčive ćelije je kao i kod drugih herpesvirusa posredovan gD, dok posle vezivanja glikoproteinskih peplomera virusa za receptore ćelija domaćina, nukleokapsid prodire u citoplazmu pomoću fuzije virusnog omotača i ćelijske membrane ili endofagocitoze (Murphy i sar., 1999; Csellner i sar., 2000; Van de Walle i sar., 2008; Azab i Osterrieder, 2012). Nukleokapsid se pomoću sistema mikrotubula transportuje do pora ćelijskog jedra gde se virusna DNK oslobađa nukleokapsida i ulazi u jedro prekidajući pri tom mehanizme sinteze makromolekula ćelije domaćina

(Murphy i sar., 1999; Frampton i sar., 2010). Ekspresija ranih gena se odigrava pre replikacije virusne DNK i u ovoj fazi se sintetišu proteini kao što su DNK polimeraza i enzimi kao što je timidin kinaza. Replikacija virusne DNK je zavisna od prisustva virusne DNK polimeraze i otpočinje posle oko 4 h, dok se pojava virusnih kapsida zapaža već 6 h posle infekcije (Mettenleiter i sar., 2006; O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Transkripcija virusnog genoma, replikacija virusne DNK i stvaranje kapsida se odigravaju u jedru, međutim virusni proteini se sintetišu u citoplazmi ćelije domaćina. Transkripcija virusne DNK se odigrava uz pomoć ćelijske RNK polimeraze II i kaskadno je regulisana kroz IE, E i L fazu (Caughman i sar., 1985; Murphy i sar., 1999). Kasni geni se eksprimiraju kad otpočne replikacija DNK, a kodiraju sintezu strukturnih komponenti viriona kao što su proteini kapsida ili glikoproteini spoljašnjeg omotača. Sazrevanje viriona uključuje enkapsidaciju virusne DNK praćenu napuštanjem ćelije domaćina i sticanjem spoljašnjeg omotača. Posle translacije i ekspresije u citoplazmi ćelije domaćina kapsidni proteini ulaze u jedro gde se odvija enkapsidacija, dok se u citoplazmi oko virusnih nukleokapsida dodaje najveći deo tegumenta. Za razliku od proteina kapsida, glikoproteini virusnog omotača se sintetišu u endoplazmatičnom retikulumu ćelije domaćina. Zreli virioni se nakupljaju u vakuolama unutar citoplazme i oslobađaju procesima egzocitoze ili citolize, a intranuklearna inkluziona telašca su karakteristična pojava kod herpesvirusnih infekcija ćelije (Murphy i sar., 1999; Mettenleiter, 2002; Mettenleiter i sar., 2006).

Posle penetracije u ćeliju domaćina, herpesvirusi ulaze u litički ili latentni ciklus infekcije koji predstavljaju dva nezavisna procesa. Posledica litičkog ciklusa infekcije je oslobađanje novih infektivnih viriona iz ćelije, dok za uspostavljanje latentnog ciklusa nije neophodna replikacija virusa. Latentnu infekciju karakteriše prisustvo virusne DNK u ćelijskom jedru, a kaskadna transkripcija i translacija IE, E i L klasa gena je blokirana, sa izuzetkom malog regiona u okviru IE gena što rezultira ekspresijom transkripata vezanih za latenciju (*eng.* latency-associated transcript - LAT) (Spivack i Fraser, 1988; Chesters i sar., 1997; Borchers i sar., 1999). Pored toga, kod latentno inficiranih jedinki nije moguća detekcija virusnog gena 33 (ORF33) koji kodira sintezu gB (Allen i sar., 2008). Tokom latentnog ciklusa infekcije, genom virusa se nalazi u cirkularnoj formi u jedru inficiranih ćelija. Latentno inficirane ćelije ne eksprimiraju virusne antigene tako da se ne mogu detektovati imunološkim metodama. Neuroni kao i CD5+ i CD8+ T

limfociti predstavljaju ćelije u kojima EHV-1 i EHV-4 ostvaruju latenciju, dok su konjski herpesvirusi iz podfamilije *Gammaherpesvirinae* ustanovljeni u B i T limfocitima latentno inficiranih konja (Welch i sar., 1992; Edington i sar., 1994; Slater i sar., 1994; Drummer i sar., 1996; Smith i sar., 1998; Borchers i sar., 1999; Pusterla i sar., 2010). Nije poznat razlog neprekidne transkripcije LAT u neaktivnom virusnom genomu pri čemu nijedna sekvenca navedenih gena nije značajna za održavanje latencije niti reaktivaciju virusa. Međutim, pretpostavlja se da LAT imaju ulogu u preživljavanju inficiranih neurona (Kent i sar., 2003). U cirkulaciji su latentno inficirani limfociti retki i procenjeno je da se javljaju u učestanosti od 1 u 10^4 ili 10^5 navedenih ćelija, pri čemu im broj vremenom opada, a uvećava se prilikom reaktivacije virusa i/ili pojave drugih infekcija. Smatra se da prisustvo EHV-2 dovodi do reaktivacije EHV-1 i EHV-4 kod latentno inficiranih konja (Drummer i sar., 1996; Dunowska i sar., 1999; Slater, 2014). Pretpostavlja se da je broj latentno inficiranih neurona stabilan s obzirom da se radi o dugoživećim ćelijama i ne zna se da li ponovljeni ciklusi reaktivacije herpesvirusa dovode do povećanja njihovog broja (Slater, 2014). Do reaktivacije latentno prisutnih konjskih herpesvirusa dolazi usled delovanja stresogenih faktora kao što su transport i druge infekcije ili posle aplikacije kortikosteroida (Edington i sar., 1985; Gibson i sar., 1992a; Smith i sar., 1998; Patel i sar., 2005). Pretpostavlja se da na površini latentno inficiranih limfocita i neurona dolazi do ekspresije virusnih proteina koji omogućuju fuziju i direktno prenošenje virusa između ćelija. U periodičnim ciklusima reaktivacije herpesvirusa virusi se prenose do epitelnih ćelija respiratornog trakta gde stiču spoljašnji omotač i nastaju infektivni virioni koje će neutralisati efektori lokalnog imuniteta ili će doći do ponovnog uspostavljanja produktivne infekcije sa izlučivanjem virusa u spoljašnju sredinu i njegovim posledičnim širenjem u populaciji konja (Edington i sar., 1985; Allen i sar., 1998; Smith i sar., 1998; Murphy i sar., 1999). Najveći broj prebolelih konja predstavljaju doživotne latentne nosioce virusa. Latencija i reaktivacija predstavljaju ključne mehanizme u epizootologiji herpesvirusnih infekcija konja zahvaljujući kojima su navedeni virusi ubikvitarno prisutni u populacijama prijemčivih životinja, pri čemu brojne studije pokazuju da većina odraslih konja tokom svog života bude izložena EHV-1, -2, -4 i -5 (Welch i sar., 1992; Edington i sar., 1994; Slater i sar., 2014).

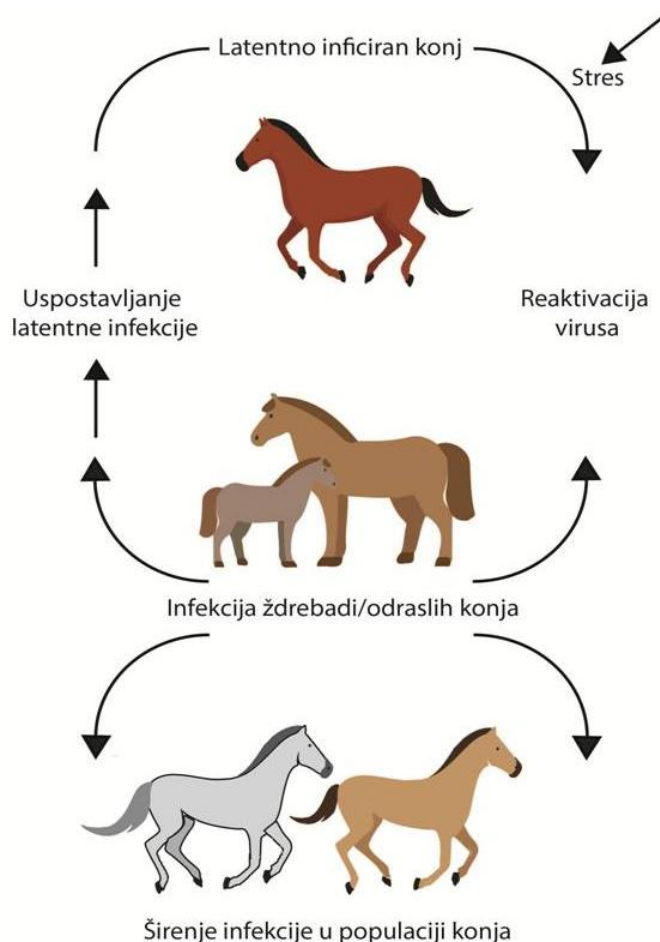
Konjski herpesvirusi 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4)

Konjski herpesvirus 1 se u literaturi prvi put spominje u studiji Dimock i Edwards (1932) koji su proučavali virusnu etiologiju pobačaja kobila, međutim navedeni virus je klasifikovan kao herpesvirus i uspešno izolovan godinama kasnije (Tajima, 1961; Saxegaard, 1966; Jackson i Kendrick, 1971). Prvu uspešnu izolaciju i identifikaciju EHV-1 u Srbiji izvršili su Mihajlović i sar. (1987). Do 1981. godine se smatralo da EHV-1 i EHV-4 predstavljaju dva podtipa EHV-1, nazivanog “virus konjskog rinopneumonitisa” i “virus abortusa kobila” (Studdert i sar., 1981; Allen i Bryans, 1986; Crabb i Studdert, 1996). Uprkos činjenici da je diferencijacija navedena dva virusa izvršena pomoću metode polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) još 1981. godine, ovo saznanje je zvanično prihvaćeno tek 1992. godine (Roizman i sar., 1992). Informacije dobijene pomoću metode sekvenciranja genoma potvrđuju da su EHV-1 i EHV-4 dva srodna, ali različita virusa, sa sličnošću aminokiselinskih sekvenci između 54,9% i 96,4% (Telford i sar., 1998).

Epizootiologija

Infekcije konjskim herpesvirusima 1 i 4 su endemski prisutne u populacijama konja širom sveta, a većina životinja se inficira tokom prve godine života (Allen i Bryans, 1986; Reed i Toribio, 2004; Marenzoni i sar., 2008). Latentno inficirani konji predstavljaju najvažniji rezervoar infekcije navedenim virusima. Konjski herpesvirusi 1 i 4 se u populaciji konja brzo šire direktnim i indirektnim kontaktom (ingestijom ili inhalacijom) i izlučuju se putem nosnog sekreta oko 3-4 nedelje posle primarne infekcije, a prisutni su u velikim količinama i u abortiranim fetusima i placenti. Uloga aerosola u prenošenju ovih infekcija zavisi od količine oslobođenog infektivnog virusa, klimatskih uslova, provetrenosti prostorija u kojima se konji nalaze kao i udaljenosti među životinjama. Širenje ovih infekcija indirektnim putem ima najveći značaj kod konja koji se drže u malom ili zatvorenom prostoru, a od manje je važnosti za održavanje herpesvirusa u populaciji životinja (Friday i sar., 2000; Van Maanen, 2002; O’Callaghan i Osterrieder, 2008; Slater, 2014). U ogledu intranazalne veštačke infekcije ogleđnih ponija, prisustvo EHV-1 je detektovano i u semenu pastuva koje može predstavljati izvor virusa i nakon prestanka viremije, odnosno 17 do 25 dana posle infekcije (Tearle i sar., 1996). Do primarne infekcije dolazi u prvim nedeljama i

mesecima života, a ždrebadi se inficiraju u kontaktu sa kobilama koje izlučuju virus bez pojave kliničkih simptoma oboljenja (Gilkerson i sar., 1999a; Foote i sar., 2004). Tokom prvih 6 do 8 meseci života posle odlučjenja, kod većine ždrebadi se javljaju rekurentne respiratorne infekcije izazvane EHV-4, pri čemu veliki broj takvih infekcija prolazi nezapaženo (Allen i Bryans, 1986). Prisustvo infekcije konjskim herpesvirusom 1 zabeleženo je kod ždrebadi stare 30 dana, pri čemu su izvor infekcije predstavljale kobile u laktaciji, a dalje širenje virusa se odvijalo direktnim kontaktom među ždrebadima pre odlučjenja (Gilkerson i sar., 1998; Gilkerson i sar., 1999a; Gilkerson i sar., 1999b). Konji kod kojih usled dejstva stresa ili drugih infekcija periodično dolazi do reaktivacije latentno prisutnih virusa predstavljaju izvor infekcije u populaciji (Slika 3). Navedeni periodi reaktivacije uglavnom protiču asimptomatski, što je značajan mehanizam održavanja endemskih ciklusa infekcije i iznenadne pojave oboljenja u zatvorenim populacijama konja (Burrows i Goodridge, 1984; Gilkerson i sar., 1999a; Patel i Heldens 2005; Pusterla i sar., 2010; Slater i sar., 2014). Međutim, postoje pretpostavke i da širenje EHV-1 u populacijama odraslih konja uglavnom prate klinički manifestni simptomi (respiratorni poremećaji, abortusi ili herpesvirusna mijeloencefalopatija - EHM) (Wang i sar, 2007; Pusterla i sar., 2008; Lunn i sar., 2009). Infekcije izazvane EHV-1 i EHV-4 karakteriše rana infekcija velikog broja mladih konja i visoka prevalencija latentno inficiranih grla koja predstavljaju stalan izvor virusa za nove generacije konja (Slater, 2014).



Slika 3. Širenje infekcije konjskim herpesvirusima 1 i 4 u populaciji konja

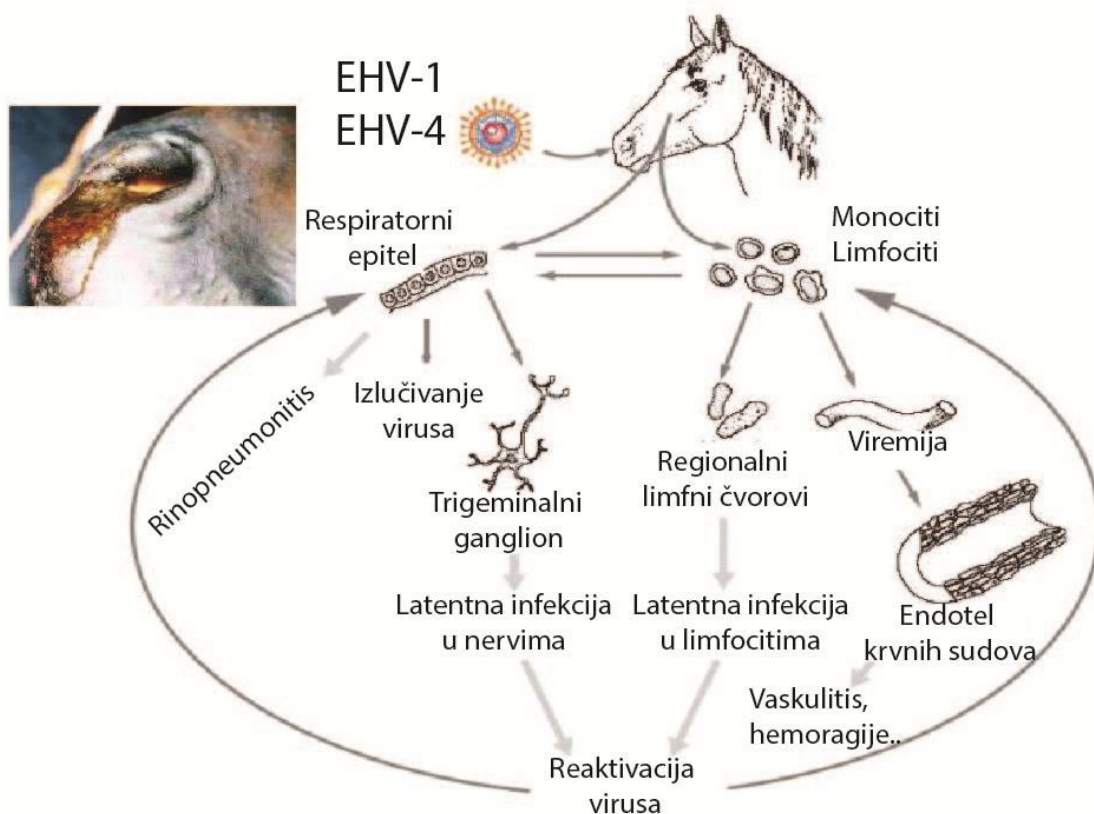
Konjski herpesvirus 1 predstavlja jedan od najvažnijih uzročnika abortusa gravidnih kobila, dok se EHV-4 najčešće dovodi u vezu sa respiratornim oboljenjima mladih konja. Uprkos činjenici da oba virusa izazivaju respiratorno oboljenje, pobačaje i mijeloencefalopatiju, EHV-4 se veoma retko dovodi u vezu sa pojavom neuroloških i reproduktivnih poremećaja (Allen i Bryans, 1986; Crabb i Studdert, 1995; Van Maanen i sar., 2000a; Slater, 2014). Dokazano je da EHV-4 u jako malom broju slučajeva dovodi do pojave abortusa ili mijeloencefalopatije i u tom smislu se smatra manje značajnim uzročnikom od EHV-1. Međutim, navedeni virus predstavlja veoma značajan patogen ždrebadi i omadi kod kojih jako često izaziva oboljenja gornjih partija respiratornog trakta (Allen i Bryans, 1986; Van Maanen, 2001a). Infekcije izazvane konjskim herpesvirusom 1 imaju veliki ekonomski značaj u konjarstvu. Sporadične pojave respiratornog oboljenja praćene povišenom telesnom temperaturom kod mlađih

konja dovode do prekida u treningu trkačkih grla ili smanjene radne sposobnosti. S druge strane, pobačaji koji se uglavnom javljaju tokom trećeg trimestra graviditeta predstavljaju još veće ekonomske gubitke. Međutim, pojava mijeloencefalopatije dovodi do teških kliničkih komplikacija koje se često letalno završavaju, dok utrošena sredstva za terapiju bolesnih grla, ograničenja vezana za parenje, prodaju i transport obolelih i rekoalescentnih konja nanose velike štete ergelama (USDA, 2007; Lunn i sar., 2009). Pojava pobačaja ili neurološkog oboljenja kod konja mogu biti posledice lokalne reaktivacije latentno prisutnog virusa kao na primer u krvnim sudovima materice, placente ili centralnog nervnog sistema (CNS) čiji je ishod infekcija endotelnih ćelija sa posledičnom trombozom i ishemijom. U navedenim situacijama do oboljenja dolazi i bez prethodne pojave kliničkih simptoma, viremije ili izlučivanja virusa putem nosnog sekreta (Smith i sar., 1996; Smith i sar., 1997; Smith i Borchers, 2001). Pobačaji izazvani EHV-1 se javljaju kao pojedinačni slučajevi, ali i u vidu epizootija kod većeg broja kobila na određenom području (Mumford, 2001; Van Maanen i sar., 2000b; Turan i sar., 2012). Samo određeni sojevi EHV-1 imaju neurovirulentni potencijal, tako da uprkos činjenici da je navedeni virus ubikvitarni patogen konja, pojave oboljenja sa neurološkim simptomima su ranijih godina relativno retko beležene (Wilson, 1997; Murphy i sar., 1999). Novija ispitivanja genoma EHV-1 su pokazala da je supstitucija adenina (A) guaninom (G) na poziciji 2254 gena virusne DNK polimeraze (koju kodira ORF 30 genetski fragment) povezana sa pojavom neurološkog oboljenja kod inficiranih konja (Nugent i sar., 2006; Leutenegger i sar., 2008; Van de Walle i sar., 2009). Navedena nukleotidna supstitucija dovodi do zamene asparagina (N) asparaginskom kiselinom (D) na poziciji 752 u okviru DNK polimeraze EHV-1 tako da se neurovirulentni sojevi u literaturi obeležavaju kao D₇₅₂ EHV-1 (Nugent i sar., 2006). Izolati EHV-1 poreklom od konja sa neurološkom formom oboljenja uvek pripadaju D₇₅₂ genotipu, međutim, pojava ove mutacije je zapažena i kod obolelih konja sa respiratornim simptomima ili u slučajevima pojave abortusa. Ovakvi sojevi uglavnom poseduju dodatne mutacije u drugim delovima ORF30 gena (Pronost i sar., 2010; Smith i sar., 2010; Pronost i sar., 2011; Smith i sar., 2012). Mnoge retrospektivne studije su potvrdile prisustvo ovih sojeva u populaciji konja već dugi niz godina, dok su rezultati skorijih epizootioloških ispitivanja herpesvirusnih infekcija konja ukazali na porast prevalencije nervne forme oboljenja izazvane neurovirulentnim

sojevima EHV-1 u celom svetu, pri čemu se smatra da će navedeni oblik oboljenja u bliskoj budućnosti predstavljati ozbiljan problem (USDA, 2007; Malik et al., 2010; Pronost i sar., 2010; Smith i sar., 2010; Fritsche i Borchers, 2011; Gryspeerdt i sar., 2011; Yilmaz i sar., 2012; Costa i sar., 2015; Stasiak i sar., 2015; McFadden i sar., 2016; Negussie i sar., 2017).

Patogeneza

Osnovna razlika u patogenezi oboljenja izazvanih sa konjskim herpesvirusima 1 i 4 je što infekcija EHV-1 dovodi do sistemske viremije koja uzrokuje pojavu abortusa i/ili neurološke poremećaje. S druge strane, infekcija EHV-4 u najvećem broju slučajeva ostaje vezana za tkiva gornjih partija respiratornog trakta (O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Gornje partije respiratornog trakta predstavljaju vrata infekcije za oba virusa, pri čemu se primarna replikacija odigrava u ćelijama respiratornog epitela i regionalnim limfnim čvorovima gde se virus može detektovati posle 24 do 48 h od infekcije. Period viremije koji karakteriše umnožavanje EHV-1 u leukocitima traje najmanje 14 dana (Allen i Bryans, 1986; Kydd i sar., 1994; van Maanen, 2002; Allen i sar., 2004; Lunn i sar., 2009). U isto vreme, EHV-1 prelazi u neurone trigeminalnog nerva, a detektuje se u trigeminalnom ganglionu posle 48 h od infekcije gde isto kao i EHV-4, uspostavlja latenciju (Slater i sar., 1994; Borchers i sar., 1997) (Slika 4).



Slika 4. Patogeneza infekcija izazvanih konjskim herpesvirusima 1 i 4 (www.cuteri.eu/lezioni/equine_herpesvirus.pdf)

Tokom viremije EHV-1 perzistira u neinfektivnoj formi u leukocitima sve do trenutka aktivacije pri čemu većina inficiranih leukocita ne eksprimira virusne antigene na svojoj površini, a CD8⁺ T limfociti i B limfociti su najčešće inficirane ćelije (Gleeson i Coggins, 1980; van der Meulen et al., i sar., 2006; van der Meulen i sar., 2003; Wilsterman i sar., 2010). Usled pojave viremije prisustvo virusa se može dokazati i u mnogim tkivima organizma u kojima pri tom ne dovodi do pojave patoloških promena. S obzirom da je viremija vezana za leukocite, EHV-1 se retko može detektovati slobodno u cirkulaciji (Wilsterman i sar., 2011; Slater, 2014). Prelazak EHV-1 iz leukocita u endotelne ćelije tokom viremije dovodi do replikacije virusa i posledičnog oštećenja krvnih sudova, odnosno organa koje vaskularizuju. Infekcija endotelnih ćelija pupčane vrpce najverovatnije predstavlja putanju diseminacije EHV-1 u fetalna tkiva. Dalje širenje virusa sa posledičnim vaskulitisom, trombozom, infekcijom kotiledona i ishemičnim oštećenjima endometrijuma sa replikacijom EHV-1 u tkivima fetusa dovodi do pobačaja. Navedeni mehanizam dovodi do pobačaja i posle

primarne infekcije, odnosno prilikom reaktivacije virusa latentno prisutnog u leukocitima (Edington i sar., 1991; Smith i sar., 1993). EHV-1 može proći uteroplacentarnu barijeru kod gravidnih kobila, pri čemu se prisustvo virusa može utvrditi i u pobačenom fetusu. U slučaju da dođe do transplacentarne infekcije u kasnom stadijumu graviditeta, rađaju se živa ždrebad koja najčešće uginu u prvim danima života usled teške intersticijalne pneumonije, dok kod pobačaja do 6. meseca dolazi do autolize fetusa (Doll i Bryans 1962; Smith i sar., 1992; Smith i sar., 1993; Crabb i sar., 1996). U najvećem broju slučajeva virus se može izolovati direktno iz fetalnih tkiva, ali u nekim situacijama infekcija može da bude ograničena samo na placentu (Smith i sar., 2004). Endotelne ćelije materice su osetljivije na infekciju konjskim herpesvirusom 1 kod visoko gravidnih kobila u poređenju sa ranijim fazama graviditeta i iz navedenog razloga do pobačaja dolazi najčešće u periodu od 6. do 11. meseca gestacije (Bryans, 1978; Slater, 2014). Ispitivanja su pokazala da nivoi fibrinogena i faktora koagulacije kod gravidnih kobila postepeno rastu od sredine gestacionog perioda do porođaja što doprinosi pojavi tromboze u inficiranim endometrijalnim endotelnim ćelijama koja može dovesti do pobačaja u poslednjoj trećini graviditeta (Gentry i sar., 1992). Adhezioni molekuli na površini endotelnih ćelija i leukocita igraju značajnu ulogu u infekciji vaskularnog endotela, a njihova ekspresija u uterusu se dovodi u vezu sa hormonskim promenama tokom graviditeta (Smith i sar., 2001). Za razliku od drugih neurotropnih virusa iz podfamilije *Alphaherpesvirinae* koji dovode do pojave encefalitisa, EHV-1 do patoloških promena u nervnom tkivu dovodi oštećenjem vaskulature, odnosno usled izraženog endoteliotropizma virusa (Edington i sar., 1986; Thein i sar., 1993; Wilson, 1997). Slično promenama u krvnim sudovima materice, lezije u centralnom nervnom sistemu (CNS) koje izazivaju nervne poremećaje kod obolelih konja se karakterišu fokalnim vaskulitisom, hemoragijama i trombozom, pri čemu dolazi do pojave fokalne aksonske i mijelinske degeneracije (Platt i sar., 1980; Nowotny, 1987; Allen i sar., 2004). Siva i bela masa kičmene moždine su najčešće zahvaćene diseminovanim ishemičnim nekrotičnim promenama koje se ređe zapažaju u delovima moždanog stabla. Međutim, pokazano je da neki sojevi EHV-1 imaju sposobnost umnožavanja u neuronima i glija ćelijama posle intracerebralne inokulacije eksperimentalnim miševima, pri čemu je zapaženo i uspostavljanje latentne infekcije u neuronima (Nowotny i sar., 1987; Marshall i Field, 1997). Pored toga, posle

eksperimentalne infekcije ponija određenim sojevima EHV-1 zapažena je pojava neuronskih lezija kao posledica neurotropizma navedenih virusa, međutim, virus se retko izoluje iz nervnog tkiva (Slater i sar., 1992; Schultheiss i sar., 1997). Uprkos činjenici da je viremija uobičajena kod infekcije EHV-1, ne dolazi uvek do razvoja EHM, odnosno prelaska virusa u endotel CNS (Goehring i sar., 2006; Slater, 2014). Faktori od kojih zavisi razvoj EHM još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da D₇₅₂ sojevi dovode do opsežnije i dugotrajnije viremije (Allen i sar., 2006; Goodman i sar., 2007; Allen, 2008), a pobačaji izazvani infekcijom konjskim herpesvirusom 1 se najčešće dovode u vezu sa N₇₅₂ sojevima navedenog virusa (Nugent i sar., 2006). Faktori zavisni od domaćina i okoline koji se dovode u vezu sa EHM su takođe slabo opisani. Stariji konji su podložniji razvoju neuroloških simptoma, tako da je moguće da imunološki status jedinke igra ulogu u patogenezi EHM (Goehring i sar., 2006; Paillot i sar., 2007; Allen, 2008).

U poređenju sa EHV-1, EHV-4 poseduje niži afinitet prema endotelnim ćelijama, a prilikom infekcije većinom sojeva ovog virusa u uglavnom ne dolazi do pojave viremije (Whitwell i sar., 1994). Pored toga, izlučivanje EHV-4 u spoljašnju sredinu putem nosnog sekreta obolelih konja je kratkotrajnije nego u slučaju infekcije konjskim herpesvirusom 1 (Pusterla i sar., 2005; Hussey i sar., 2006). Tačna patogeneza infekcija konjskim herpesvirusom 4 nije u potpunosti poznata pri čemu se sličnosti sa infekcijom konjskim herpesvirusom 1 ogledaju u ranoj fazi infekcije respiratornog trakta i regionalnih limfnih čvorova kao i u mestima organizma gde navedena dva virusa ostvaruju latenciju (trigeminalne ganglije i određene subpopulacije T limfocita) (Welch i sar., 1992; Borchers i sar., 1997).

Klinička slika

Klinički sindromi infekcije konjskim herpesvirusima 1 i 4 imaju sličnosti u određenim segmentima. Oba virusa izazivaju pojavu respiratornog oboljenja, pobačaja i neurološkog oboljenja, međutim EHV-1 se dovodi u vezu sa sva tri sindroma, a EHV-4 uglavnom dovodi samo do pojave respiratorne infekcije konja (Slater, 2014) (Slika 5).



Slika 5. Klinički simptomi infekcije konjskim herpesvirusom 1: A – respiratorno oboljenje; B-neurološko oboljenje; C-rađanje slabovitalne ždrebadi; D-pobačaj (Gryspeerdt, 2011; Slater, 2014).

Infekcija ždrebadi virulentnim sojevima EHV-1 se karakteriše klinički aparentnim respiratornim oboljenjem praćenim depresijom i anoreksijom, a kratak period inkubacije od oko 1 dan prati bifazno povišenje telesne temperature (39 do 41 °C) 1-2 i 6-7 dana posle infekcije (Gibson i sar., 1992a; Gibson i sar., 1999b; O'Callaghan i Osterrieder, 2008). U nekim slučajevima period inkubacije može trajati do 10 dana. Na samom početku toka bolesti javlja se serozni iscedak iz nosa sa jakim konjunktivitisom, pri čemu usled sekundarne bakterijske infekcije nosni iscedak dobija mukozni do mukopurulentni karakter. Javlja se i progresivna limfadenopatija najčešće submandibularnih i retrofaringealnih limfnih čvorova, a karakteristična je pojava limfopenije i neutropenije koje pre pada telesne temperature smenjuje limfocitoza (Gibson i sar., 1992a; O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Kapoor i sar., 2014). Za razliku od infekcije virusom influence konja, herpesvirusne infekcije ne karakteriše izražen kašalj. Kod starijih konja, ukoliko nisu imunološki kompromitovani, respiratorna infekcija može biti asptomatska i takve životinje predstavljaju kliconoše (Goehring i sar., 2005; O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Slater, 2014). Po oporavku od respiratorne

forme oboljenja izazvane EHV-1 ili EHV-4, kod nekih konja može doći do slabljenja radne sposobnosti, ali se obolele životinje uglavnom u potpunosti oporavljaju (O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Slater, 2014).

Opisana je nova forma EHV-1 infekcije kod mladih konja označena kao plućni vaskulotropni oblik oboljenja. U navedenim slučajevima dolazi do replikacije virusa u endotelnim ćelijama krvnih sudova pluća, a zabeleženi su klinički simptomi teškog oboljenja distalnih partija respiratornog trakta uglavnom praćeni smrtnim ishodom. Navedenu formu oboljenja karakteriše vaskulitis sa posledičnim hemoragijama i edemom pluća, a antigen EHV-1 se može detektovati u jedru i citoplazmi inficiranih ćelija (Del Piero i sar., 2000; Del Piero i Wilkins, 2001).

Gravidne kobile inficirane konjskim herpesvirusom 1 uglavnom abortiraju u poslednjoj trećini graviditeta (od 8. do 11. meseca) bez prethodne pojave drugih kliničkih simptoma, dok inficirana ždrebad uginu u prvim danima života (Gleeson i Coggins, 1980; Smith i sar., 1992; Giles i sar., 1993; Patel i Hledens, 2005; O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Do pobačaja uglavnom dolazi za 2 do 12 nedelja od infekcije u kasnijem stadijumu graviditeta, pri čemu ne dolazi do oštećenja reproduktivnog trakta obolelih kobila. Većina kobila se posle herpesvirusnog pobačaja oporavlja i ždrebi normalno naredne godine. Retka je pojava dva vezana herpesvirusna pobačaja, međutim svaki naredni graviditet kod latentno inficirane jedinke nosi veći rizik. Obolela ždrebad se rađaju živa, ali obole najkasnije 1 do 2 dana nakon rođenja sa teškim simptomima progresivne pneumonije, pri čemu kod ovako rođenih jedinki ubrzo dolazi do hipoksije i smrti. Ždrebad koja prežive više od 2 do 3 dana oboljevaju od sekundarne bakterijske pneumonije, ali uglavnom uginu za 10 do 14 dana usled komplikacija respiratornog oboljenja i teške leukopenije (Perkins i sar., 1999; Slater, 2014).

Oboljenje pastuva inficiranih konjskim herpesvirusom 1 se karakteriše razvojem skrotalnog edema, smanjenim libidom, redukcijom kvaliteta sperme, kao i izlučivanjem inficiranih leukocita u seme koji se detektuju i 3 nedelje posle infekcije (Tearle i sar., 1996; Walter i sar., 2012).

Manninger (1949) je prvi opisao pojavu neuroloških simptoma kod konja tokom ispitivanja patogeneze virusnog pobačaja kobila, pri čemu je EHV-1 izolovan iz kliničkih slučajeva mijeloencefalitisa konja godinama kasnije (Saxegaard, 1966;

Jackson i Kendrick, 1971). Herpesvirusni mijeloencefalitis konja predstavlja najteži sindrom koji se primarno dovodi u vezu sa EHV-1, a ređe sa infekcijom konjskim herpesvirusom 4. Neurološki simptomi su posledica ishemičnih oštećenja nervnog tkiva koja u zavisnosti od zahvaćenog predela CNS dovode do pojave mijelopatije, encefalopatije ili mijeloencefalopatije (Slater, 2014). Pojava EHM se ne dovodi u vezu sa faktorima zavisnim od pola, uzrasta ili graviditeta (Greenwood i Simson, 1980). Klinički simptomi se javljaju pred sam kraj viremične faze infekcije (između 6. i 10. dana), međutim inkubacioni period može trajati i samo jedan dan. Pojavi neuroloških simptoma oboljenja, slično kao i u slučaju pojave pobačaja, ne prethode nikakvi klinički simptomi izuzev porasta telesne temperature (Jackson i sar., 1977; Goehring i sar., 2010; Burgess i sar., 2012). Kliničke manifestacije neuroloških simptoma variraju u zavisnosti od veličine i lokalizacije zahvaćenog predela CNS pri čemu su u najvećem broju slučajeva patološke promene ustanovljene u kaudalnim segmentima kičmene moždine i sakralnim ganglijama, ali su zabeleženi i slučajevi akutne paralize sa brzim letalnim ishodom izazvane promenama u velikom mozgu. Klinički simptomi se javljaju u vidu privremene ataksije i pareze do potpune paralize pri čemu su zahvaćene uglavnom zadnje noge, a moguća je i pojava kvadriplegije. Usled oštećenja sakralnih nerava dolazi do disfunkcije mokraćne bešike sa posledičnom atonijom i urinarnom retencijom ili inkontinencijom, kao i oštećenjem funkcije površinskih senzornih nerava perineuma i zadnjih udova. Prognoza kod konja koji su u ležećem položaju je loša usled razvoja miopatije, hipostatske pneumonije, ruptуре mokraćne bešike itd. i takve životinje se najčešće eutanaziraju (Jackson i sar., 1977; Van Maanen i sar., 2001b; Stierstorfer i sar., 2002; Studdert i sar., 2003; Goehring i sar., 2005, Slater, 2014).

Terapija i profilaksa

Terapija obolelih konja sa simptomima respiratornog oboljenja u najvećem broju slučajeva obuhvata primenu antibiotika širokog spektra u cilju sprečavanja komplikacija usled sekundarne bakterijske infekcije. Kontrola infekcija izazvanih konjskim herpesvirusima 1 i 4 u populaciji konja podrazumeva izolaciju i stavljanje obolelih grla u karantin uz primenu strogih biosigurnosnih mera. S obzirom da većina vakcina protiv EHV-1 i EHV-4 ne daje zadovoljavajuće rezultate, najvažniji korak u prevenciji navedenih infekcija predstavlja svakodnevna adekvatna nega i briga o životinjama, smanjenje uticaja stresa kao i sprečavanje bliskog kontakta velikih grupa konja (van

Maanen, 2002; O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Konjski herpesvirusi u spoljašnjoj sredini uglavnom opstaju manje od 7 dana, a osetljivi su na uticaj toplote i dezinficijensa pomoću kojih se lako inaktiviraju (Doll i sar., 1959). Terapija herpesvirusnih infekcija konja je uglavnom simptomatskog karaktera, s obzirom da antivirusna terapija aciklovirom daje nekonzistentne rezultate i da su potrebne veće doze da bi se potencijalno postigao željeni terapijski efekat što nije ekonomski isplativo (Friday i sar., 2000; van der Meulen i sar., 2003; Garré i sar., 2007). Postabortivne komplikacije kod kobila su retke, tako da terapija u navedenim slučajevima nije neophodna i sporovode se samo preventivne mere u cilju sprečavanja kontaminacije šire okoline virusom, odnosno infekcije drugih konja (Goulden i sar., 1989; Slater, 2014). Konjima sa neurološkim simptomima je potrebna intenzivna nega, a u slučaju pojave ataksije i nemogućnosti stajanja potrebno je održavati životinju u sternalnom položaju sa dostupnom hranom i vodom. S obzirom da je upotreba kortikosteroida u terapiji EHM kontraindikovana, obolelim konjima se aplikuju drugi antiinflamatorni lekovi kao što je dimetil sulfoksid (DMSO) ili nesteroidni antiinflamatorni lekovi kao što je fluniksini. Oporavak je uglavnom kompletan nakon nekoliko meseci, pri čemu je prognoza nepovoljna kod jedinki koje u ležećem položaju više od 24h (Slater i sar., 1994; Friday i sar., 2000; Slater, 2014). Pored adekvatne terapije, oboleli konji moraju biti izolovani od ostalih životinja tokom najmanje 14 dana od pojave kliničkih simptoma u cilju sprečavanja širenja virusa putem aerosola, ali i indirektno preko hrane, vode ili opreme (Goehring i sar., 2010).

Konjski herpesvirus 1 predstavlja jedan od najvažnijih uzročnika respiratornih infekcija, pobačaja i neuroloških poremećaja konja širom sveta uprkos upotrebi velikog broja komercijalnih vakcina (Allen i sar., 1999; Kydd i sar., 2006). Postoji veliki broj vakcina protiv infekcija izazvanih konjskim herpesvirusom 1 i/ili konjskim herpesvirusom 4, kao što su: modifikovane žive vakcine (npr. Rhinomune i Prevaccinol), inaktivisane vakcine (npr. Pneumabort K i Prestige), inaktivisane polivalentne vakcine (npr. Innovator, Resequin i Duvaxyn_{1,4}) i subjedinične vakcine (npr. Cavalon IR). Većina navedenih vakcina može dovesti do neželjenih efekata kao što su lokalne reakcije na mestu aplikacije imunogena, izostanak očekivanog imunološkog odgovora zaštitnog karaktera ili ako su u pitanju žive atenuisane, odnosno modifikovane vakcine postoji rizik od povratka virulencije vakcinalnog soja virusa

njegovim retrogradnim pasażama kroz prijemčive jedinke (O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Vakcinacija se uglavnom sporovodi kod trkačkih i visoko vrednih grla u svrhu smanjenja dužine trajanja viremije kao i perioda izlučivanja virusa iz organizma, s obzirom da nijedna komercijalna vakcina nije pokazala dovoljnu efikasnost u sprečavanju pojave infekcije izazvane konjskim herpesvirusom 1 (Kapoor i sar., 2014). Kobile se vakcinišu u 3., 5., 7. i 9. mesecu graviditeta da bi se sprečila eventualna pojava pobačaja, dok se konji u cilju zaštite od respiratornog oboljenja, odnosno rinopneumonitisa vakcinišu svakih 3 do 6 meseci (O'Callaghan i Osterrieder, 2008). Programom mera zdravstvene zaštite životinja koji se svake godine sprovodi u Republici Srbiji i čiji je cilj zdravstvena zaštita životinja od pojedinih zaraznih bolesti, nije predviđena obavezna vakcinacija konja protiv herpesvirusnih infekcija (rinopneumonitisa i virusnog abortusa konja) i ista se sprovodi u skladu sa epizootiološkom situacijom u pojedinim područjima i zaptima. Komercijalno dostupna inaktivisana vakcina Duvaxyn EHV_{1,4} dovodi do smanjenja inteziteta i pojave kliničkih simptoma oboljenja, kao i trajanja izlučivanja virusa u spoljašnju sredinu, a pored toga zapažena je smanjena učestanost pojave abortusa kod gravidnih kobila. Uprkos tome, vakcinacija konja u terenskim uslovima ne sprečava cirkulaciju EHV-1 i EHV-4 u populaciji konja (Foote i sar., 2006). Vakcine protiv EHV-1 dovode do smanjenja učestanosti pojave kliničkih manifestacija infekcije kao što su respiratorno oboljenje ili pobačaji, međutim nijedna dostupna vakcina ne pruža zaštitu od neurološke forme oboljenja (Kapoor i sar., 2014).

Konjski herpesvirusi 2 i 5 (EHV-2 i EHV-5)

Konjski herpesvirusi 2 i 5 su endemski prisutni u populacijama konja u celom svetu (Torfason i sar., 2008; Ataseven i sar., 2010; Negussie i sar., 2017), međutim njihovo prisustvo u Srbiji nikada nije dokumentovano. Navedeni herpesvirusi su antigenski srodni, a često se zajedno detektuju u okviru mešanih infekcija (Nordengrahn i sar., 2002; Torfason i sar., 2008; Negussie i sar., 2017). Soj LK konjskog herpesvirusa 2 je 1962. godine izolovan iz sekreta respiratornog trakta ždrebeta i predstavlja prvi izolovani gamaherpesvirus konja (Plummer i Waterson, 1963). U literaturi koja datira iz perioda pre 1987. godine, EHV-2 je klasifikovan kao betaherpesvirus i nije pravljen razlika između EHV-2 i EHV-5 (Roizman i sar., 1981; Browning i Studdert, 1987a; Browning i Studdert, 1989). Konjski herpesvirus 5 nije mogao da se razlikuje od

heterogene grupe izolata EHV-2 sve do početka primene molekularnih metoda u svrhu proučavanja infekcija navedenim virusima (Browning i Studdert, 1987b; Agius i sar., 1992; Reubel i sar., 1995; Rizvi i sar., 1997). Pomenuti virusi predstavljaju dva različita, ali srodna herpesvirusa konja sa sličnošću aminokiselinskih sekvenci od 60% (Telford i sar., 1993; Agius i Studdert, 1994).

Epizootiologija

Mnoga ispitivanja su pokazala da je veliki broj konja širom sveta latentno inficiran konjskim gamaherpesvirusima, pri čemu se često javljaju i produktivne infekcije epitelnih ćelija nazofarinksa, konjuntive i kornee konja kao stalan izvor infekcije za ždrebadi, odnosno za nove generacije životinja uprkos postojanju pasivnog imuniteta poreklom od majke (McGuire i sar., 1974; Wilks i Studdert, 1974; Fu i sar., 1986; Browning i Studdert, 1987b; Murray i sar., 1996; Torfason i sar., 2008). Epizootiologija EHV-2 i EHV-5 se karakteriše infekcijom mlade ždrebadi sa nespecifičnim kliničkim manifestacijama oboljenja i doživotnom latentnom infekcijom sa sporadičnim ciklusima reaktivacije virusa tokom kojih se velika količina infektivnog virusa izlučuje u spoljašnju sredinu, a odrasle uglavnom asimptomatski inficirane jedinke predstavljaju rezervoar infekcije (Wilks i sar., 1974; Browning i Studdert, 1987b; Browning i Studdert, 1988; Edington i sar., 1994; Murray i sar., 1996; Borchers i sar., 1997; Allen i Murray, 2004). Do infekcije ždrebadi konjskim herpesvirusom 2 dolazi već u prvih 25 – 30 dana života, dok do infekcije konjskim herpesvirusom 5 u najvećem broju slučajeva dolazi nešto kasnije, pri čemu je prisustvo oba navedena virusa ustanovljeno u leukocitima ždrebadi u prvih 6 meseci života (Fu i sar., 1986; Murray i sar., 1996; Nordengrahn i sar., 2002; Bell i sar., 2006a). Ždrebadi izlučuju veće količine EHV-2 od odraslih konja, pri čemu prevalencija infekcije navedenim virusom znatno opada u uzrastu od oko 9 meseci, a što se podudara sa periodom povećanja titra specifičnih antitela u krvnom serumu ovih životinja (Fu i sar., 1987; Nordengrahn i sar., 2001; Marenzoni i sar., 2007; Hartley i sar., 2013). Prevalencija infekcije konjskim herpesvirusom 5 je veća kod ždrebadi u vreme i nakon odlučanja, a uprkos činjenici da procenat inficiranih konja opada sa uzrastom, titri virusa koji se izlučuje u spoljašnju sredinu uglavnom ostaju ujednačeni (Dunowska i sar., 2002; Nordengrahn i sar., 2002; Bell i sar., 2006a; Wang i sar., 2007; Marenzoni i sar., 2010; Hue i sar., 2014). Posle infekcije, odnosno tokom ciklusa reaktivacije virusa, EHV-2 dovodi do dugotrajne

produktivne infekcije epitelnih ćelija nazofarinksa. Konjski gamaherpesvirusi koji se intermitentno izlučuju putem nosnog sekreta inficiranih konja prisutni su i u neposrednoj okolini ždrebadi (Allen i Murray, 2004; Torfason i sar., 2008). Prenosjenje EHV-2 se u populaciji konja odvija horizontalno, odnosno sa kobile na ždrebe ili između ždrebadi (Browning i Studdert, 1987a; Browning i Studdert, 1987b; Allen i Murray, 2004; Bell i sar., 2006a). U jednom ispitivanju EHV-2 je izolovan iz pluća pobačenog fetusa ukazujući na mogućnost virusa da prođe placentalnu barijeru, međutim isti nije doveden u vezu sa abortusima i vertikalno prenošenje EHV-2 do sad nije ustanovljeno, kao ni prisustvo pomenutog virusa u kolostrumu ili mleku kobila (Allen i Murray, 2004; Galosi i sar., 2005). Zapaženo je da veći broj genetski različitih sojeva EHV-2 može da cirkuliše u jednoj populaciji konja, pri čemu se u uzorcima poreklom od jednog konja detektuje i do osam različitih sojeva navedenog virusa (Browning i Studdert, 1987b; Brault i Maclachlan, 2011). Među izolatima EHV-5 je zabeležen određeni stepen genetske varijabilnosti, međutim u manjoj meri u odnosu na EHV-2 (Dunowska i sar., 2000; Bell i sar., 2006a; Thorsteinsdóttir i sar., 2010; Thorsteinsdóttir i sar., 2013). Mešane infekcije sa EHV-2 i EHV-5 su uobičajene, pri čemu se EHV-2 samostalno ili u sadejstvu sa EHV-5 dovodi u vezu sa aktivacijom latentno prisutnih EHV-1 i EHV-4 kod inficiranih konja (Reubel i sar., 1995; Nordegrahn i sar., 2002; Banbura i sar., 2004; Dzieciatkowski, 2005; Marenzoni sar., 2013; McBrearty i sar., 2013; Hue i sar., 2014). Ne postoji dovoljno dokaza o putu prenošenja multinodularne fibroze pluća konja, oboljenja koje se poslednjih godina povezuje sa infekcijom EHV-5, naročito zato što je utvrđen veliki broj slučajeva obolelih konja koji su bili smešteni sa drugim životinjama kod kojih nije došlo do razvoja bolesti. Do danas nisu sprovedena ozbiljnija epizootiološka ispitivanja vezana za ovo oboljenje kod konja (Dunkel, 2012).

Patogeneza

Konjski gamaherpesvirusi se izlučuju putem aerosola iz respiratornog trakta inficiranih jedinki, a EHV-2 je dokazan i u sekretu epitela konjunktiva. Infektivne virusne čestice se najčešće replikuju u epitelu gornjih partija respiratornog trakta konja, pri čemu se EHV-2 često izoluje iz limfnih folikula ždrela (Studdert i sar., 1970; Wilks i Studdert, 1974; Fu i sar., 1986; Browning i Studdert, 1987b; Collinson i sar., 1994). Posle prodora EHV-2 u ćelije epitela respiratornog trakta, dolazi do sekundarne

infekcije leukocita subepitelnog sloja, limfnih folikula ždrela i regionalnih limfnih čvorova, pri čemu inficirani limfociti prelaze u cirkulaciju dovodeći do primarne viremije. Prilikom endogene reaktivacije EHV-2 glavnu ulogu imaju latentno inficirani B limfociti koji dolaze u kontakt sa ćelijama respiratornog epitela, dovodeći do produktivne infekcije respiratornog trakta konja sa posledičnim izlučivanjem virusa u spoljašnju sredinu (Drummer i sar., 1996). Nukleinska kiselina EHV-2 se u retkim slučajevima može detektovati u trigeminalnim ganglijama latentno inficiranih konja (Eddington i sar., 1994; Rizvi i sar., 1997). U dostupnoj literaturi su EHV-2 i EHV-5 često prikazivani kao jedan virus, odnosno EHV-2 i iz navedenog razloga patogeneza oboljenja izazvanih konjskim herpesvirusom 5 nije dovoljno opisana. Konjski herpesvirus 5 se dovodi u vezu sa respiratornim oboljenjima, međutim često se izoluje i iz nosnih briseva i leukocita klinički zdravih konja (Dunowska i sar., 2000; Wang, 2003; Bell i sar., 2006b; Wang i sar., 2007). Pored toga, navedeni virus je skorije doveden u vezu sa multinodularnom fibrozom pluća konja (*eng.* equine multinodular pulmonary fibrosis - EPMF), međutim patogeneza ovog oboljenja do danas nije utvrđena (Williams i sar., 2007). Smatra se da u ciklusima reaktivacije latentno prisutnog EHV-5 u plućima može doći do hroničnog oštećenja plućnog tkiva sa posledičnom aktivacijom ćelija imunološkog sistema (Dunkel, 2012). Homolog gena koji kodira imunosupresivni citokin interleukin 10 (IL-10) ljudi je pronađen u genomima EHV-2 i EHV-5 što u sprezi sa infekcijom limfocita dovodi do supresije imunološkog odgovora domaćina i pojave čestih sekundarnih bakterijskih i virusnih infekcija inficiranih konja (Drummer i sar., 1996; Nordengrahn i sar., 1996; Dunowska i sar., 2000).

Klinička slika

Klinički značaj gamaherpesvirusa konja do danas predstavlja predmet opsežnih ispitivanja, međutim postoje brojni dokazi da su EHV-2 i EHV-5 respiratorni i okularni patogeni. Pomenuti virusi dovode do imunosupresije predisponirajući pri tom inficirane konje prema razvoju sekundarnih infekcija, a često su uključeni u patogenezu sindroma hroničnog zamora ovih životinja (Slater i sar., 2014). Konjski herpesvirus 2 dovodi do pojave imunosupresije, limfadenopatije, oboljenja gornjih partija respiratornog trakta, faringitisa, pneumonije i keratokonjuktivitisa, a predstavlja i predisponirajući faktor za razvoj sekundarnih bakterijskih infekcija izazvanih bakterijama *Streptococcus equi*, *S.*

zooepidemicus i *Rhodococcus equi* (Nordengrahn i sar., 1996; Kershaw i sar., 2001; Allen i Murray, 2004; Fortier i sar., 2013). Pored toga, u literaturi se navodi moguća veza između infekcije konja konjskim herpesvirusom 2 i hronične opstruktivne bolesti pluća (*eng. chronic obstructive pulmonary disease, COPD*) (Schlocker i sar., 1995). Konjski herpesvirus 5 se često izoluje i detektuje u uzorcima poreklom od zdravih životinja, međutim njegova uloga u patogenezi oboljenja konja i danas predstavlja predmet ispitivanja širom sveta (Reubel i sar., 1995; Dunowska i sar., 1999; Nordengrahn i sar., 2002; Bell i sar., 2006a; Wang i sar., 2007; Torfason i sar., 2008; Thorsteinsdóttir i sar., 2010). Multinodularna fibroza pluća konja (EPMF) predstavlja oboljenje koje je 2007. godine povezano sa EHV-5 kao potencijalnim uzročnikom, a od tada su u mnogim zemljama prijavljeni sporadični slučajevi koji podržavaju pomenutu pretpostavku (Williams i sar., 2007; Soare i sar., 2011; Back i sar., 2012; Schwarz i sar., 2013; Dunowska i sar., 2014). EPMF najverovatnije ne predstavlja novo oboljenje već je samo skorije izdvojeno iz velikog broja patoloških stanja konja sa sličnom kliničkom slikom i patomorfološkim nalazom (Wilkins, 2008). Posle prve uspešne eksperimentalne infekcije konja sojevima EHV-5 izolovanim iz uzoraka poreklom od životinja sa dijagnostikovanom EPMF zaključeno je da navedeni virus tokom latentne faze infekcije dovodi do razvoja fibroznih promena u plućima (Williams i sar., 2013). Patohistološki pregled tkiva pluća obolelih konja pokazuje visok stepen intersticijalne fibroze, pri čemu se u respiratornim putevima nalazi veliki broj neutrofilnih granulocita i makrofaga od koji pojedini sadrže eozinofilna inkluziona telašca (Marenzoni sar., 2011; Soare i sar., 2011; Wilkins, 2013). Promenjeni delovi pluća su jasno demarkirani od nepromenjenog parenhima (Slika 6), a u okviru nodula se zapaža zadebljanje intersticijuma usled difuznog deponovanja kolagena kao i infiltracija perivaskularnog i interlobularnog prostora inflamatornim ćelijama, od kojih najveći broj pripada populaciji limfocita (Schwarz i sar., 2013). Prilikom virusoloških ispitivanja patološki izmenjenog plućnog tkiva obolelih životinja primenom kvantitativne molekularne metode Real-Time PCR poakzana je pozitivna korelacija između ozbiljnosti lezija i količine detektovanog EHV-5 (Marenzoni i sar., 2011). Multinodularna fibroza pluća se kod konja karakteriše gubitkom telesne težine, slabom kondicijom, inapetencijom i progresivnim pogoršanjem kliničkih simptoma uprkos terapiji protiv infektivne bronhopneumonije i COPD. Prilikom kliničkog pregleda

oboelih životinja zapaža se tahikardija, varijabilna hipertermija, tahipneja i dispneja sa teškom arterijskom hipoksemijom u pojedinim slučajevima (Marenzoni i sar., 2011; Schwarz i sar., 2013). Slično Epstein-Barr virusu, EHV-5 se često nalazi kod klinički zdravih jedinki, ali se dovodi u vezu limfoproliferativnim oboljenjima, odnosno pojavom leukemije i limfoma kod konja (Wang i sar., 2007; Torfason i sar., 2008; Vander Werf i sar., 2014; Schwarz i sar., 2012).



Slika 6. Multinodularna fibroza pluća izazvana infekcijom konjskim herpesvirusom 5; Krupni noduli oštih ivica između kojih je nepromenjeno tkivo pluća (Williams i sar., 2007).

Terapija i profilaksa

Specifične terapijske i profilaktičke mere protiv infekcija izazvanih konjskim herpesvirusima 2 i 5 još uvek nisu dovoljno ispitane. Terapija obolelih životinja je uglavnom simptomatska i sprovodi se prema pojedinačnim slučajevima. Konjunktivitis ždrebadu izazvan infekcijom konjskim herpesvirusom 2 se sa uspehom leči očnim mastima na bazi idoksuridina uz terapiju antibioticima i nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (Matthews i Handscombe, 1983; Collinson i sar., 1994; Kershaw i sar., 2001). Na osnovu dostupnih literaturnih podataka ustanovljeno je da konji kojima je dijagnostikovana multinodularna fibroza pluća u oko 50% slučajeva sa uspehom odgovaraju na terapiju, naročito kada se dijagnoza postavi u ranoj fazi razvoja bolesti. Uprkos tome i dalje nije moguće sa sigurnošću tvrditi da infekcija konjskim herpesvirusom 5 dovodi do razvoja EPMF, međutim rezultati nekih ispitivanja su

pokazali da je došlo do ozdravljenja obolelih konja posle terapije aciklovirom i valaciklovirom (Wong i sar., 2008; Schwarz i sar., 2012).

Dijagnostika herpesvirusnih infekcija konja

Na osnovu prikupljenih anamnestičkih podataka, poznavanja epizootiološke situacije na terenu i prepoznavanja kliničkih simptoma može se postaviti sumnja na infekciju konjskim herpesvirusima. Etiološka dijagnoza se dobija primenom laboratorijskih metoda koje obuhvataju izolaciju virusa, metode serološke i molekularne dijagnostike. Izuzev infekcija ždrebadi i mladih konja, konjski herpesvirusi retko dovode do pojave kliničkih simptoma respiratornog oboljenja koji se ne mogu razlikovati od istih izazvanih drugim patogenima virusne ili bakterijske etiologije. Do pojave pobačaja i mijeloencefalopatije najčešće dolazi bez bilo kakvih prethodnih kliničkih simptoma izuzev porasta telesne temperature. Iznenadna pojava abortusa u zadnjoj trećini graviditeta upućuje na herpesvirusnu etiologiju, ali ne može predstavljati osnov za definitivnu dijagnozu. U slučaju pojave kliničkih simptoma mijeloencefalopatije kod većeg broja konja, osnovano je pretpostaviti da se radi o infekciji konjskim herpesvirusom 1, međutim kao i u ostalim slučajevima, jedino pozitivan nalaz primenom virusoloških dijagnostičkih metoda osigurava postavljanje tačne dijagnoze (Slater, 2014).

Konjski herpesvirusi 1 i 4 se mogu otkriti u velikom broju različitih uzoraka poreklom od konja kao što su pluća, bubrezi, slezina, jetra, trigeminalne ganglije, submandibularni limfni čvorovi, kao i nosni brisevi, krv i placenta živih životinja (Borchers i sar., 1999; Dunowska i sar., 2002; Diallo i sar., 2007; Wang i sar., 2007; Pusterla i sar., 2010; Pusterla i sar., 2012; Turan i sar., 2012). Metode koje se koriste za detekciju i diferencijaciju EHV-1 i EHV-4 u kliničkim uzorcima obuhvataju izolaciju virusa, serološke metode, lančanu reakciju polimeraze (PCR), lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR) i metodu sekvenciranja genoma (Yasunaga i sar., 1998; Diallo i sar., 2007; Wang i sar., 2007; Turan i sar., 2012; OIE, 2008). Gamaherpesvirusi konja EHV-2 i EHV-5 se mogu detektovati u uzorcima nosnih briseva, sekreta konjunktiva ili respiratornog trakta, leukocitima, limfoidnom tkivu, trigeminalnim ganglijama, plućima, jetri, bubrezima i drugim unutrašnjim organima pri čemu se koristi veliki broj standardnih i molekularnih dijagnostičkih metoda (Edington i sar., 1994; Dunowska i sar., 1999; Dunowska i sar., 2002; Bell i sar., 2006a; Dyonon i

sar., 2007; Wang i sar., 2007; Torfason i sar., 2008; Fortier i sar., 2009; Ataseven i sar., 2010; Thorsteinsdottir i sar., 2013; Negussie i sar., 2017).

Serološke metode

Prilikom uzorkovanja materijala za serološku dijagnostiku herpesvirusnih infekcija konja od velikog značaja je prethodno poznavanje vakcinalnog statusa odraslih jedinki, odnosno eventualnog prisustva maternalnih antitela kod ždrebadi. Serološke dijagnostičke metode se uglavnom koriste u retrospektivnim epizootiološkim studijama (Slater, 2014). Ubrzo posle infekcije dolazi do porasta titra IgM antitela koja se mogu detektovati u uzorcima krvnog seruma već posle 4 do 5 dana, pri čemu su u porastu do oko 30. dana nakon čega postepeno opadaju uglavnom do 80. dana od početka infekcije (Thomson i sar., 1976). Povećanje titra IgG antitela se može utvrditi između 8 i 10. dana od infekcije, pri čemu najviše vrednosti titra dostižu oko 30. dana i za razliku od IgM mogu se ustanoviti u krvnim serumima konja i posle perioda od od 9 meseci. Reakcija vezivanja komplementa (RVK) je metoda izbora za ispitivanje titra IgM, a samim tim porast titra navedenih antitela detektovan ovom metodom u ispitivanim serumima konja predstavlja preliminarni dokaz o prisustvu aktivne infekcije u populaciji životinja (Doll i sar., 1953; Slater, 2014). Virus neutralizacioni test (VNT) se upotrebljava za utvrđivanje prisustva i titra IgG antitela, međutim ne predstavlja adekvatnu metodu za dijagnostikovanje akutne infekcije konjskim herpesvirusima s obzirom na dugačak poluživot IgG u krvnom serumu konja. Iz navedenog razloga, VNT se uglavnom upotrebljava u studijama koje imaju za cilj ispitivanje prevalencije herpesvirusnih infekcija u populaciji konja (Slater, 2014). Povećanje titra antitela (četvorostruko ili više) detektovano u parnim uzorcima krvnog seruma konja pomoću metoda VNT i RVK predstavlja dokaz skorije infekcije konjskim herpesvirusima (Kydd i sar., 2006). Najveći nedostatak ove dve metode je nemogućnost razlikovanja specifičnih antitela protiv EHV-1 i EHV-4 (Carvalho i sar., 2000; Hartley i sar., 2005; Kydd i sar., 2006; OIE, 2008). Imunoenzimski test (ELISA) zasnovan na primeni fuzionih proteina koji eksprimiraju varijabilne regione glikoproteina G je omogućio razlikovanje specifičnih antitela protiv navedena dva virusa u krvnim serumima konja, a njegova primenljivost je potvrđena u mnogobrojnim studijama (Crabb i Studdert, 1993 Crabb i sar., 1995; Yasunaga i sar., 2000). Danas su komercijalno dostupni ELISA testovi kao što je

Svanovir EHV-1/EHV-4-Ab ELISA koji omogućuju brzu i laku diferencijaciju antitela protiv EHV-1 i EHV-4 (Hartley i sar., 2005; Ataseven i sar., 2009).

Nasuprot činjenici da su EHV-2 i EHV-5 dve različite vrste virusa, njihove antigenske sličnosti otežavaju primenu serologije u cilju dijagnostike gamaherpesvirusnih infekcija konja (Telford i sar., 1993). Titri neutralizujućih antitela protiv EHV-2 se mogu detektovati primenom serum neutralizujućeg testa na RK-13 ćelijskoj liniji ili primenom imunoenzimskog testa (ELISA) (Murray i sar., 1996; Nordengrahn i sar., 2001). Pored toga, razvijen je i imunoenzimski test koji omogućuje razlikovanje prisustva specifičnih antitela protiv EHV-2 i EHV-5 u krvnim serumima konja (Svansson i sar., 2009). Serološke metode u cilju otkrivanja akutne infekcije konjskim gamaherpesvirusima su primenjive u ograničenom broju slučajeva s obzirom da se većina ždrebadi inficira konjskim herpesvirusima 2 i 5 u prvih 6 meseci života, ostajući pri tom perzistentno ili latentno inficirana dugo vremena. Pored toga, neutralizujuća antitela protiv EHV-2 su često prisutna u niskim titrima i zbog velike genetske heterogenosti ne mogu da neutralizuju referentne sojeve navedenog virusa. Iz pomenutih razloga je izolacija virusa efikasnija dijagnostička metoda od serologije za gamaherpesviruse konja (Turner i Studdert, 1970; Plummer i sar., 1973).

Standardne virusološke metode

Izolacija virusa na kulturi ćelija predstavlja zlatni standard u dijagnostici herpesvirusnih infekcija konja uprkos činjenici da je vremenski zahtevnija od novijih molekularnih tehnika i prilikom ispitivanja novih dijagnostičkih metoda uvek predstavlja standard za poređenje. Konačna identifikacija virusa se može izvršiti pomoću više različitih tehnika – primenom elektronske mikroskopije, direktne ili indirektno imunofluorescencije, testa virus neutralizacije ili lančane reakcije polimeraze (Ballagi Pordany i sar., 1990; O' Keefe i sar., 1991; Welch i sar., 1992; Borchers i Slater, 1993; Kirisawa i sar., 1993; Lawrence i sar., 1994; Reubel i sar., 1995; Carvalho i sar., 2000). Direktna imunofluorescencija se upotrebljava za identifikaciju konjskih herpesvirusa 1 i 4 direktno u uzorcima tkiva ili na inokulisanim ćelijskim kulturama, međutim komercijalno je dostupan poliklonski antiserum konjugovan fluorescein izotiocijanatom koji unakrsno reaguje sa EHV-1 i EHV-4 i nije pogodan za serotipizaciju koja se naknadno najčešće vrši primenom lančane reakcije polimeraze (OIE, 2008). Unakrsna reaktivnost između antitela protiv EHV-1 i EHV-4, odnosno

EHV-2 i EHV-5, otežava primenu testova virus neutralizacije u cilju identifikacije izolata. Konjski herpesvirusi 2 i 5 se mogu lako razlikovati od EHV-1 i EHV-4, s obzirom na njihove različite antigenske strukture (Hartley i sar., 2005; Slater, 2014). S obzirom da herpesvirusi konja uspostavljaju latentnu infekciju u limfocitima i nervnom tkivu, metoda kokultivacije uzoraka sa osetljivim ćelijskim linijama kao što su EEL (*eng.* equine embryonic lung), ED (*eng.* equine dermis) ili RK-13 (*eng.* rabbit kidney 13) se može koristiti u cilju reaktivacije prisutnog virusa (Welch i sar., 1992; Edington i sar., 1994).

Konjski herpesvirus 1 se u laboratorijskim uslovima može kultivisati primenom velikog broja različitih ćelijskih linija kao što su Vero, RK-13, BHK-21 (*eng.* baby hamster kidney 21), MDBK (*eng.* Madin Darby bovine kidney), kao i ćelija poreklom od konja kao što su EK (*eng.* equine kidney), EEL ili ED ćelije. Za razliku od EHV-1, konjski herpesvirus 4 ima ograničen tropizam prema ćelijskim linijama drugih vrsta i najčešće se izoluje na ćelijama konja (ED, EEL, EK), pri čemu se primenom drugih ćelijskih kultura otežano izoluje i umnožava se u niskom titru. U cilju razlikovanja EHV-1 i EHV-4, ranije je korišćeno upravo navedeno svojstvo ovih virusa (Heldens i sar., 2001; Diallo i sar., 2008). Konjski herpesvirusi 2 i 5 se mogu kultivisati kako na ćelijskim linijama poreklom od konja, tako i na RK-13 ćelijama (Dunowska i sar., 2002; Bell et al., 2006).

Uzorkovani klinički materijal se potapa u transportnu podlogu i transportuje na 4°C do laboratorije. Pre inokulacije u ćelijsku kulturu, uzorci se obrađuju i filtriraju kroz filtere promera 0,45 µm da bi se eliminisala mogućnost kontaminacije ćelija (Giles i sar., 1993; Kydd i sar., 1994; Crabb i Studdert, 1995).

Konjski herpesvirusi 1 i 4 dovode do pojave citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim kulturama uglavnom nakon 24 do 48h posle inokulacije, a navedene promene se karakterišu zaokrugljavanjem i skupljanjem ćelija, njihovim odvajanjem od podloge i formiranjem višejedarnih sincicijuma (Mihajlović i sar., 1987; Crabb i Studdert, 1995). Do pojave citopatogenog efekta sa zaokrugljivanjem ćelija prilikom izolacije konjskih herpesvirusa 2 i 5 dolazi nešto kasnije, često i nakon nekoliko pasaža suspektog materijala, (Reubel i sar., 1995; Williams i sar., 2007).

Molekularne metode

Rezultati sekvenciranja genoma konjskih herpesvirusa pokazali su značajne razlike u njihovim nukleotidnim sekvencama na osnovu kojih je omogućeno razlikovanje EHV-1, EHV-4, odnosno EHV-2 i EHV-5 u kliničkim uzorcima primenom različitih molekularnih metoda. Primena lančane reakcije polimeraze (PCR) za identifikaciju konjskih herpesvirusa ima brojne prednosti u poređenju sa standardnim virusološkim metodama - predstavlja visokospecifičnu i osetljivu metodu što je naročito značajno u slučajevima kada je u uzorku prisutna mala koncentracija virusa, ekonomična je i brza, a rezultati PCR ne zavise od prisustva živog virusa u ispitivanom uzorku. Iz tih razloga, lančana reakcija polimeraze u današnje vreme predstavlja primarnu dijagnostičku metodu za detekciju konjskih herpesvirusa kako iz kliničkih uzoraka suspektnog materijala, tako i za njihovu pouzdanu identifikaciju u inokulisanim ćelijskim kulturama (Kirisawa i sar., 1993; Wang i sar., 2007). Postoji veliki broj prajmera čiju su primenljivost potvrdili različiti autori prilikom ispitivanja herpesvirusnih infekcija konja. Njihova primena omogućuje specifično vezivanje za određene visokokonzervirane regione pojedinačnih herpesvirusa kao što su geni koji kodiraju sinzezu timidin kinaze (TK) ili različitih virusnih glikoproteina (gB, gC, gD, gH) osiguravajući na taj način visoku specifičnost korišćene molekularne metode (Kirisawa i sar., 1993; Galosi i sar., 2001; Varrasso i sar., 2001; Nordegrahn i sar., 2002, Bell i sar., 2006). Lančana reakcija polimeraze se pored identifikacije virusa može koristiti za proučavanje prisustva latentnih infekcija konjskim herpesvirusima (Borchers i sar., 1997; Allen, 2006; Pusterla i sar., 2010). S obzirom da je prisustvo više od jednog konjskog herpesvirusa uobičajen nalaz, postoji veliki broj PCR protokola koji omogućuju njihovu simultanu identifikaciju (Kirisawa i sar., 1993; Wang i sar., 2007). Primena metode sekvenciranja genoma konjskih herpesvirusa omogućila je poređenje nukleotidnih sekvenci različitih sojeva navedenih virusa iz celog sveta. Značaj takvih ispitivanja je veliki, a rezultati se mogu primeniti u epizootiološkim studijama kroz praćenje kretanja određenih sojeva na globalnom nivou ili praćenje pojave različitih genetskih mutacija od kojih neke mogu biti od velike dijagnostičke važnosti (Nugent i sar., 2006; Goodman i sar., 2007; Negussie i sar., 2015; Bilge Dagalp i sar., 2018).

Na osnovu dosadašnjih epizootioloških podataka, poznato je da u našoj zemlji primarnu etiološku ulogu u herpesvirusnim infekcijama konja imaju EHV-1 i EHV-4 pri

čemu u potpunosti nedostaju podaci o prisustvu EHV-2 i EHV-5. Pored toga, nedostaju i kompletni podaci o svim molekularnim karakteristikama konjskih herpesvirusa prisutnih u populaciji konja na području naše zemlje i u zemljama regiona, a posebno informacije o postojanju neurovirulentnih sojeva EHV-1. Iz navedenih razloga, sprovedeno je istraživanje prisustva i molekularnih karakteristika sojeva napred navedenih vrsta konjskih herpesvirusa poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske.

2. PREGLED LITERATURE

Konjski herpesvirusi 1 i 4

Proučavanje konjskih herpesvirusa je otpočelo tridesetih godina prošlog veka u Sjedinjenim Američkim Državama na Univerzitetu u Kentakiju. Dimock i Edwards (1932) kroz studije filtracije prvi opisuju pobačaj gravidnih kobila kao klinički entitet sa potencijalnom virusnom etiologijom. Iste godine, navedeni autori izvode veštačku infekciju gravidnih kobila materijalom dobijenim iz pobačenog fetusa dovodeći do pojave abortusa kod eksperimentalnih životinja. Narednih godina, cilj mnogih ispitivanja predstavljao je potvrđivanje virusne etiologije abortusa kao i detaljnije opisivanje kliničkog toka oboljenja i patomorfoloških promena kod pobačenih fetusa (Dimock i Edwards 1933; Dimock i Edwards, 1936, Dimock, 1940). U istom periodu, u Evropi različiti autori objavljuju slične izveštaje (Meissner i Harms, 1937; Sedlmeier, 1938). U Mađarskoj, Manninger i Csontos (1941) gravidnim kobilama inokulišu bakteriološki sterilne filtrate poreklom od abortirane ždrebadi i zapažaju pojavu kliničkih simptoma sličnih influenci konja kako kod eksperimentalnih životinja, tako i kod konja u neposrednom kontaktu sa njima. Iz navedenog razloga, autori iznose pretpostavku da je virus influence konja uzročnik pobačaja. Salyi (1942) beleži da su patomorfološke promene kod abortiranih fetusa konja istovetne onim opisanim u slučajevima iz Kentakija. Doll i sar. (1954) eksperimentalno proučavaju navedene respiratorne infekcije konja i njihovu vezu sa pojavom pobačaja i pokazuju da simptomi oboljenja kod mladih konja nalikuju simptomima izazvanim infekcijom virusom influence. Narednih godina, Doll i sar. (1957) vrše poređenje virusa abortusa konja i virusa influence konja i predlažu nov naziv za pomenuti virus – virus konjskog rinopneumonitisa u cilju razlikovanja od novootkrivenog virusa arteritisa konja koji je takođe doveden u vezu sa pojavom pobačaja. Detaljno izučavanje osobina infekcija konjskim herpesvirusima otežavala je nemogućnost kultivisanja virusa u drugim biološkim sistemima osim u konjima. Virus je prvi put uspešno umnožen u ćelijskim linijama poreklom od slezine i pluća fetusa konja (Randall i sar., 1953) i ćelijskim linijama poreklom od psa, hrčka i zeca (Randall, 1954). Narednih godina Shimizu i sar. (1957) izoluju virus rinopneumonitisa konja u ćelijskoj liniji bubrega konja i zapažaju postojanje antigenskih razlika među različitim izolatima virusa (Shimizu i sar., 1959).

Virus rinopneumonitisa konja je prema rezultatima neutralizacionih testova podeljen na dva podtipa: podtip 1 čiji je predstavnik Ky-D (Kentucky D) soj izolovan u Kentakiju 1952. godine i podtip 2 gde pripada Army 183 soj izolovan 1941. godine u Virdžiniji (SAD) i brojni evropski sojevi izolovani kasnijih godina, kao i japanski soj H.45 koji su izolovali Shimizu i saradnici 1959. godine (Burrows, 1968). Tajima (1961), Plummer i Waterson (1963) i Darlington i James (1966) prvi na osnovu antigenskih osobina i morfoloških karakteristika viriona dovode virus rinopneumonitisa konja u vezu sa herpesvirusima. Uspešna izolacija virusa rinopneumonitisa konja iz kliničkih slučajeva mijeloencefalitisa je izvršena nešto kasnije (Saxegaard, 1966; Jackson i Kendrick, 1971).

Četrdeset godina od početka proučavanja herpesvirusnih oboljenja konja, Plummer i sar. (1973) predlažu klasifikaciju do tada poznatih virusa iz ove grupe u familiju *Herpesviridae* pod nazivima: konjski herpesvirus 1, konjski herpesvirus 2 i konjski herpesvirus 3, a što je i zvanično prihvaćeno nekoliko godina kasnije (Mathews, 1979). Burrows i Goodridge (1973) sprovode *in vitro* i *in vivo* studije i po prvi put dovode u vezu različite sojeve EHV-1 sa poreklom izolata navedenog virusa, odnosno zapažaju razlike u virulenciji sojeva izolovanih iz slučajeva respiratornog oboljenja (R sojeva) i pobačaja (F sojeva). Interesantno je da je, za razliku od R sojeva, većina F sojeva dovela do pojave CPE u različitim ćelijskim linijama, pri čemu su se F sojevi umnožavali u višim titrima. U eksperimentima veštačke infekcije konja, F sojevi su se pokazali kao virulentniji, doveli su do pojave viremije i izlučivani su u višim titrima od R sojeva. Do 1981. godine se smatralo da EHV-1 i EHV-4 predstavljaju dva podtipa konjskog herpesvirusa 1, a njihova diferencijacija je izvršena pomoću metode za određivanje polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (RFLP). Tada su Studdert i sar. (1981) predložili da se F sojevi označavaju kao EHV-1, a R sojevi kao EHV-4, pri čemu je navedena podela prihvaćena skoro deceniju kasnije (Roizman i sar., 1992). Chowdhury i sar. (1986) su ispitivali herpesvirusnu etiologiju enzootije abortusa na ergeli lipicanera u Austriji tokom koje je zabeleženo 30 slučajeva pobačaja i perinatalnih uginuća ždrebad, kao i uginuće 10 kobila sa klinički manifestnim neurološkim simptomima. Posle izolacije virusa na ćelijskoj liniji Vero, autori su primenom restrikcionih endonukleaza ispitivali izolate EHV-1 poreklom iz pobačenih fetusa, odnosno njihovu sličnost sa do tada poznatim R i F sojevima konjskog

herpesvirusa 1 u cilju eventualne detekcije markera neurovirulencije, međutim nisu zabeležili značajnija odstupanja od prethodno poznatih abortigenih sojeva EHV-1.

Na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu je po prvi put u Jugoslaviji izolovan i identifikovan konjski herpesvirus 1 (Mihajlović i sar., 1987). Uspešno je izolovan EHV-1 iz materijala poreklom od ždrebeta pobačenog u 7. mesecu graviditeta (jetra, slezina, pluća, posteljica i amnionska tečnost). Autori su nakon zasejavanja ispitivanog materijala na hranljive podloge za rast bakterija i mikoplazmi pri čemu nije zabeležen nikakav rast, postavili osnovanu sumnju da se radi o virusu. Navedeni virus je izolovan posle 3 slepe pasaže primenom ćelijske kulture prasećeg bubrega PK-15 (*eng.* porcine kidney-15) kao i primarne kulture prasećeg bubrega održavane u virusološkoj laboratoriji Katedre za mikrobiologiju. Ustanovljene su karakteristične citopatogene promene koje su bile prisutne i u narednim pasažama pri čemu su iste bile najizrazitije na primarnoj kulturi prasećeg bubrega. Primenom elektronske mikroskopije pronađene su čestice prečnika oko 100 nm sa spoljnim omotačem od oko 180 do 200 nm, ukazujući da izolovani agens pripada herpesvirusima. Antigenske osobine izolovanog virusa su ispitivane primenom testa virus neutralizacije sa specifičnim imunim serumom protiv EHV-1, čime je izvršena njegova konačna identifikacija.

Ballagi-Pordány i sar. (1990) su među prvima ispitivali primenljivost metode lančane reakcije polimeraze (PCR) u dijagnostici infekcija konjskim herpesvirusom 1. Paralelnom primenom navedene molekularne metode i izolacije virusa na kulturi ćelija ispitano je 63 uzorka organa poreklom od pobačenih fetusa, a u cilju kontrole specifičnosti PCR korišćeni su referentni sojevi EHV-1, EHV-2, EHV-3 i EHV-4 umnožavani na RK-13 i EEL (*eng.* equine embryonic lung) ćelijskim linijama, kao i referentni sojevi virusa Aujeckijeve bolesti (PRV), goveđeg herpesvirusa 1 (BHV-1) i goveđeg adenovirusa 2 umnožavani u kulturi goveđih turbinatnih ćelija. U navedenim ispitivanjima su korišćeni prajmeri koji se specifično vezuju za gen koji kodira sintezu glikoproteina 13 (gp13) EHV-1. Specifičnost metode PCR je potvrđena i metodom hibridizacije, pri čemu je utvrđeno da se primenom navedenih testova omogućuje brzo i pouzdano razlikovanje EHV-1 i EHV-4. Primenom metode PCR je u uzorcima organa prisustvo nukleinske kiseline EHV-1 detektovano u 34 ispitivana uzorka, dok je izolacijom virusa ustanovljeno 35 pozitivnih uzoraka. S obzirom na visoko slaganje

navedenih metoda, autori su ukazali na prednost primene metode PCR zbog njene brzine, ekonomičnosti i jednostavnosti izvođenja.

Cilj studije Welch i sar. (1992) bila je provera uloge limforetikularnog sistema u ostvarivanju latencije EHV-1 primenom PCR i kokultivacije ispitivanog tkiva sa ćelijskim kulturama RK-13 i EEL. Prajmeri za izvođenje lančane reakcije polimeraze su sintetisani tako da umnožavaju isti region u okviru gB gena konjskih herpesvirusa 1 i 4 koji su naknadno razlikovani primenom restrikcionih endonukleaza. Posle veštačke intranazalne infekcije konja sojem Ab4 EHV-1 u periodu od 10 nedelja su od živih životinja uzimani uzorci nosnih briseva i krvi, a nakon navedenog perioda životinje su žrtvovane i uzeti su uzorci limfnih čvorova, timusa, slezine, pluća, kao i ganglija trigeminalnog nerva. Latentna infekcija konjskim herpesvirusom 1 detektovana je primenom PCR i kokultivacije u regionalnim limfnim čvorovima respiratornog trakta i u leukocitima iz periferne cirkulacije. Prisustvo latentne infekcije konjskim herpesvirusom 4 koja je posledica prirodne infekcije eksperimentalnih životinja otkriveno je u različitim tkivima, takođe uključujući leukocite iz uzoraka krvi. Utvrđeno je da je prilikom kokultivacije izolacija EHV-2 uvek prethodila izolaciji EHV-1 i EHV-4 navodeći na moguću ulogu navedenog virusa u njihovoj reaktivaciji. Konjski herpesvirusi 1 i 4 su primenom lančane reakcije polimeraze detektovani u većini uzoraka trigeminalnih ganglija, međutim njihova izolacija iz navedenih uzoraka nije bila uspešna, najverovatnije usled neuspešne reaktivacije virusa u *in vitro* uslovima. Autori su zaključili da su metode lančane reakcije polimeraze i kokultivacije pogodne za izučavanje latentnih infekcija izazavnih konjskim herpesvirusima. U studiji Edington i sar. (1994) koja je ca cilj imala ispitivanje prevalencije latentnih infekcija konjskim herpesvirusima 1 i 4 u populaciji konja primenom metoda PCR i kokultivacije ispitivanih uzoraka tkiva sa ćelijskim kulturama RK-13 i EEL, limfni čvorovi respiratornog trakta su predstavljali najčešću vrstu uzoraka u kojima su detektovani jedan ili oba virusa. Nasuprot tome, izolacija EHV-1 i EHV-4 nije bila uspešna ni iz jednog uzorka trigeminalnih ganglija. U navedenoj studiji, slično istraživanjima Welch i sar. (1992), konjski herpesvirus 2 je izolovan iz većine ispitanih uzoraka, pri čemu su EHV-1 i EHV-4 izolovani samo u njegovom prisustvu. Nešto drugačije rezultate objavili su Slater i sar. (1994) koji su posle veštačke infekcije eksperimentalnih konja konjskim herpesvirusom 1 i žrtvovanja životinja nakon završetka oglada ispitivali tkiva

koja se dovode u vezu sa latencijom EHV-1. Primenom metode PCR prisustvo EHV-1 je detektovano u limfoidnim tkivima, leukocitima iz pune krvi, kao i u uzorcima trigeminalnih ganglija eksperimentalnih konja. S obzirom da EHV-1 inficira tkiva respiratornog trakta kao i limfoidna tkiva, bilo je očekivano da će se naći u velikom broju ispitivanih uzoraka, međutim autori su proučavali razlike između latentno prisutnog virusa detekovanog primenom lančane reakcije polimeraze i metode izolacije virusa na ćelijskoj liniji RK-13 inokulisanoj uzorcima ispitivanog tkiva. Navedena ispitivanja ukazuju da sva tkiva u kojima je bila prisutna nukleinska kiselina EHV-1 ne predstavljaju ujedno i pogodnu sredinu za reaktivaciju virusa *in vitro* koja dovodi do sinteze novih viriona. Primenom metode PCR nukleinska kiselina konjskog herpesvirusa 1 je otkrivena u svim ispitivanim uzorcima (limfoidno tkivo, leukociti, trigeminalne ganglije), međutim metodom kokultivacije ispitivanih uzoraka tkiva sa navedenom ćelijskom linijom, ustanovljeno je samo umnožavanje virusa poreklom iz uzoraka trigeminalnih ganglija. Autori su zaključili da uprkos tome što EHV-1 dovodi do latentne infekcije limfoidnih tkiva i leukocita u cirkulaciji, navedena tkiva imaju manji značaj u smislu njegove reaktivacije, a samim tim i transmisije u populaciji prijemčivih životinja. Rezultati Slater i sar. (1994) su potvrdili da je konjski herpesvirus 1 neurotropan slično ostalim pripadnicima podfamilije *Alphaherpesvirinae*, pri čemu trigeminalne ganglije predstavljaju najznačajnije mesto reaktivacije latentno prisutnog virusa. Neurotropizam konjskog herpesvirusa 4 utvrđen je i u u istraživanju Borchers i sar. (1997) koji su primenom direktne *in situ* PCR metode dokazali prisustvo nukleinske kiseline EHV-4 u uzorcima trigeminalnih ganglija konja. Pored toga, autori su detektovali pomenuti virus i u bronhijalnim i alveolarnim epitelnim ćelijama ukazujući da su ćelije navedenih tkiva takođe značajna mesta za ostvarivanje latencije EHV-4 kao respiratornog patogena.

Pre početka primene metode PCR, za diferencijaciju EHV-1 i EHV-4 korišćena su njihova biološka svojstva u smislu mogućnosti umnožavanja u različitim ćelijskim linijama. Konjski herpesvirus 1 se umnožava, kako u ćelijama poreklom od konja, tako i u drugim ćelijskim linijama (npr. RK-13), dok s druge strane, uspešna izolacija EHV-4 uglavnom zavisi od upotrebe ćelijskih linija konjskog porekla (Studdert i Blackney, 1979; Sabine, 1980; Heldens i sar., 2001; Diallo i sar., 2008; OIE, 2008). Cilj velikog broja istraživanja početkom devedesetih godina prošlog veka bilo je ispitivanje

moćnosti razlikovanja EHV-1 i EHV-4 u kliničkim uzorcima primenom lančane reakcije polimeraze, bez potrebe za primenom dodatnih dijagnostičkih procedura. Wagner i sar. (1992) opisuju PCR protokol koji primenom prajmera specifičnih za sekvence gena koji kodiraju sintezu glikoproteina B (gB) EHV-1, odnosno EHV-4 omogućuju njihovu diferencijaciju u samo jednoj reakciji. Slično prethodnim studijama, ustanovljena je visoka korelacija između rezultata PCR i izolacije virusa na kulturi ćelija, pri čemu se PCR pokazala kao specifičnija i osetljivija metoda. U slučaju prisustva jednog ili oba virusa u ispitivanom kliničkom uzorku, primenom PCR sa opisanom mešavinom prajmera dolazi do stvaranja specifičnih PCR produkata koji se mogu lako razlikovati posle elektroforeze u agaroznom gelu. Slično, Borchers i Slater (1993) razvijaju metodu Multiplex nested PCR koja se zasniva na simultanoj primeni parova prajmera specifičnih za gB regione EHV-1 i EHV-4. Nested PCR se sastoji iz dve faze, odnosno dve uzastopne reakcije, pri čemu se u drugoj fazi vrši amplifikacija PCR produkta iz prve faze, čime se povećavaju specifičnost i osetljivost navedene molekularne metode. Primenljivost Multiplex nested PCR na uzorcima poreklom od pobačenih fetusa dokazana je i u istraživanju Kirisawa i sar. (1993) koji su takođe sintetisali prajmere specifične za određene regione gena koji kodiraju sintezu gB konjskih herpesvirusa 1 i 4. Autori su ustanovili potpuno slaganje između rezultata dobijenih izolacijom virusa na kulturi ćelija i primenom napred navedene molekularne metode, pri čemu su potvrdili da se primenom pomenutih prajmera pouzdano i brzo mogu detektovati mešovite infekcije sa EHV-1 i EHV-4. Carvalho i sar. (2000) su ispitivali multiplex PCR metodu čijom primenom se omogućuje razlikovanje sojeva EHV-1 i EHV-4 na osnovu razlika u sekvencama gena navedenih virusa koji kodiraju sintezu timidin kinaze (TK). Na osnovu dobijenih PCR produkata različitih veličina, utvrđeno je da se u ispitivanim uzorcima navedeni virusi međusobno mogu jasno razlikovati kao i direktno identifikovati u materijalu iz koga nije moguća njihova izolacija. Iz navedenih razloga autori su predložili multiplex PCR kao brzu i osetljivu dijagnostičku proceduru. Wang i sar. (2007) su potvrdili primenljivost Nested multiplex PCR protokola za simultanu identifikaciju konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 u kliničkim uzorcima poreklom od konja. U pomenutom ispitivanju je opisan multiplex PCR protokol koji se izvodi u dve faze (nested PCR) upotrebljen za analizu uzoraka nosnih briseva konja sa i bez klinički manifestnih simptoma respiratornog oboljenja. Prajmeri

korišćeni u prvoj i drugoj fazi specifični za regione genoma koji kodiraju sintezu glikoproteina B EHV-1 i EHV-4 su prethodno opisani u radu Kirisawa i sar. (1993), pri čemu je u radu Wang i sar. (2007) izvršena modifikacija metode u smislu dodavanja kombinacije prajmera specifičnih za gB gene EHV-2 i EHV-5 kao i izmena termalnog protokola reakcije. Pomenuta multiplex PCR tehnika se pokazala kao osetljiva i specifična za detekciju konjskih herpesvirusa kako u uzorcima nosnih briseva, tako i u izolatima sa ćelijskih kultura. Prednost navedene metode se ogleda u pouzdanoj detekciji mešovite infekcije sa više konjskih herpesvirusa uz podjednaku osetljivost kao prilikom primene klasične PCR metode sa jednim parom prajmera. Pored toga, Multiplex nested PCR metoda je daleko ekonomičnija i brža, pri čemu se u ovim ispitivanjima pokazala i osetljivijom od metode izolacije virusa na kulturi ćelija. Ataseven i sar. (2009) u Turskoj sprovode sličnu studiju prilikom ispitivanja uzoraka krvi i nosnih briseva konja sa kliničkim simptomima respiratornog oboljenja poreklom iz privatnih gazdinstava. U navedenoj studiji autori koriste PCR protokol opisan od strane Wang i sar. (2007), odnosno specifične prajmere opisane u radu Kirisawa i sar. (1993). U ukupno 14,3% odnosno 19% uzoraka pune krvi konja detektovano je prisustvo EHV-1 i EHV-4. Slično, u uzorcima nosnih briseva EHV-1 je identifikovan u 32,5% , a EHV-4 u 22,5% uzoraka. Za razliku od prethodno navedenih protokola, primena klasične PCR metode u cilju otkrivanja infekcija konja herpesvirusima 1 i 4 u odvojenim reakcijama opisana je u radu Hafshejani i sar. (2015) koji su vršili molekularno ispitivanje prisustva EHV-1 i EHV-4 u populaciji konja u Iranu. U uzorcima pune krvi ukupno 90 konja, kod 7 životinja detektovano je prisustvo EHV-1, dok je 15 konja bilo inficirano sa EHV-4 od čega je kod 9 životinja ustanovljena mešovita infekcija sa oba virusa.

S obzirom na nedostatke klasičnih PCR metoda kao što su potreba za izvođenjem elektroforeze dobijenih PCR produkata i to uz upotrebu kancerogenih jedinjenja koja omogućuju njihovu vizuelizaciju pod ultravioletnim svetlom, Diallo i sar. (2007) su dizajnirali multiplex real-time PCR metodu za detekciju i diferencijaciju EHV-1 i EHV-4 primenom prajmera specifičnih za gB gene ovih virusa. Prednost pomenute metode, pored još veće brzine izvođenja i dobijanja rezultata u odnosu na klasičan PCR se ogleda i u povećanoj osetljivosti pri čemu je omogućena detekcija veoma malog broja kopija ciljne virusne DNK u uzorku. Metoda real-time PCR se u

studiji Hussey i sar. (2006) i Perkins i sar. (2008) poredi sa izolacijom virusa na kulturi tkiva, pri čemu se kao njene prednosti ističu veća osetljivost i brzina izvođenja. Na osnovu istraživanja pomenutih autora, primenom real-time PCR se može detektovati aktivno izlučivanje EHV-1 putem nosnog sekreta, odnosno prisustvo viremije u uzorcima krvi konja, međutim ova metoda se nije pokazala kao dovoljno osetljiva u otkrivanju prisustva latentne infekcije konjskim herpesvirusom 1. S obzirom da je real-time PCR kvantitativna metoda, pogodna je za procenu količine izlučenog virusa i može naći primenu u epizootiološkim studijama. Ploszay i sar. (2013) ispituju ukupno 21 uzorak nosnih briseva konja mlađih od 2 godine sa kliničkim simptomima rinopneumonitisa primenom klasične PCR metode sa prajmerima opisanim od strane Kirisawa i sar. (1993), odnosno real-time PCR sa prajmerima i probom prema Diallo i sar. (2007) u cilju simultane detekcije i diferencijacije EHV-1 i EHV-4. U pomenutoj studiji 47% uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo EHV-4 primenom PCR, pri čemu nukleinska kiselina EHV-1 nije detektovana ni u jednom uzorku. Svi uzorci su zatim ispitivani metodom real-time PCR koja se pokazala kao osetljivija sa 67% pozitivnih uzoraka, što je najverovatnije posledica prisustva latentne infekcije, odnosno malog broja kopija virusnog genoma u ispitivanim uzorcima. Navedeni autori su zaključili da je klasična PCR metoda pogodnija za otkrivanje akutne infekcije konjskim herpesvirusima i da se u tu svrhu može koristiti s obzirom na ekonomičnost, specifičnost i brzinu izvođenja.

Poslednjih godina u literaturi su sve zastupljeniji naučni radovi koji se odnose na primenu sekvenciranja genoma konjskih herpesvirusa s obzirom da se analizom i poređenjem dobijenih podataka može stvoriti kompletnija epizootiološka slika na terenu. Nukleotidna sekvenca gena koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) predstavlja visokokonzerviran region kod svih herpesvirusa koji je najčešće ispitivan u ovakvim studijama, a poznato je da je funkcija navedenog glikoproteina ključna za prodor virusa u ćeliju domaćina i predstavlja jedan od njegovih imunološki najznačajnijih antigena (Slater, 2014). Rezultati Turan i sar. (2012) koji su vršili filogenetsku analizu nukleotidnih sekvenci gB gena sojeva EHV-1 i EHV-4 detektovanih tokom epizootija pobačaja u Turskoj su pokazali da su svi turski sojevi EHV-1 i EHV-4 grupisani zajedno, izuzev jednog soja EHV-1 koji je izdvojen i grupisao se sa evropskim sekvencama pomenutog virusa. U sličnom ispitivanju sprovedenom od strane Ataseven

i sar. (2016) izvršena je filogenetska analiza na osnovu parcijalne sekvence gB gena izolata konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz slučajeva pobačaja. Dokazano je da u Turskoj genetski identični sojevi EHV-1 cirkulišu na terenu, međutim, za razliku od rezultata Turan i sar. (2012), svi su bili srodni sa sekvencama sojeva poreklom iz Evrope. U najnovijem ispitivanju autora Bilge Dagalp i sar. (2018) sekvence gB gena svih sojeva EHV-4 detektovanih tokom ispitivanja enzootije respiratornog oboljenja na jednoj ergeli u Turskoj su bile veoma slične i formirale zasebnu grupu na filogenetskom stablu zajedno sa sekvencama EHV-4 prijavljenim u studiji Turan i sar. (2012), pri čemu se jedan soj EHV-4 izdvajao i grupisao sa sojevima iz Evrope i Japana.

U cilju proučavanja hipoteze da različiti sojevi EHV-1 koji se razlikuju prema patogenosti cirkulišu u populacijama konja, Nugent i sar. (2006) istražuju postojanje genetskih markera koji bi potencijalno omogućili grupisanje navedenih virusa. Poređenjem genoma abortigenog soja EHV-1 Ab4 i manje virulentnog V592 soja pomenutog virusa, među njihovim nukleotidnim sekvencama utvrđeno je svega 0,1% različitosti i to najčešće u vidu polimorfizama na nivou pojedinačnih nukleotida (*eng.* single nucleotide polymorphism; SNP). Navedene razlike su zapažene na nivou 31 otvorenog okvira čitanja (ORF), među kojima su najznačajnije varijacije detektovane u regionima ORF30 i ORF68 genoma EHV-1. Polimorfizam na nivou jednog nukleotida u okviru ORF30 se dovodi u direktnu vezu sa neuropatogenim potencijalom oderđenog soja EHV-1, odnosno izolati kod kojih je na poziciji 2254 u okviru ovog gena umesto adenina (A₂₂₅₄) prisutan guanin (G₂₂₅₄) se grupišu u neurovirulentne sojeve konjskog herpesvirusa 1. Navedeni region genoma EHV-1 kodira sintezu katalitičke subjediničice DNK polimeraze i substitucija adenina guaninom dovodi do promene u sintetisanom enzimu, odnosno do zamene asparagina (N) asparaginskom kiselinom (D) na poziciji 752. Zamena pomenutih aminokiselina uslovljava promene u funkciji virusne DNK polimeraze za koju se pretpostavlja da ima uticaj na povećan nivo viremije i izmenjenu efikasnost replikacije virusa u okviru leukocita, kao i povećanje endoteliotropizma virusa što je i eksperimentalno potvrđeno u ispitivanjima Goodman i sar. (2007). Ciljanim izazivanjem mutacije neurovirulentnog G₂₂₅₄ soja u A₂₂₅₄ soj i njegovim ispitivanjem pokazano je značajno slabljenje virulencije, međutim, oba genotipa EHV-1 se izlučuju iz organizama inficiranih konja u sličnim titrima, ukazujući na činjenicu da ne postoje razlike u smislu njihovog širenja u osetljivoj populaciji životinja. Pored toga,

u istraživanjima Nugent i sar. (2006) se navode dokazi za postojanje grupa EHV-1 prema geografskoj lokalizaciji koje se mogu odrediti detekcijom različitih SNP u okviru gena ORF68. S obzirom da je pomenuti region pokazao varijacije i do 2% među različitim sojevima konjskog herpesvirusa 1, autori su predložili da se isti koristi kao genetski marker za grupisanje sojeva u određene grupe. U navedenim ispitivanjima, Nugent i sar. su podelili 131 terenski izolat EHV-1 u 6 grupa prema postojanju polimorfizama na nivou pojedinačnih nukleotida i broju rezidua guanina (G) na pozicijama 732-739 u genu ORF68 tako da su u grupe 1, 3, 4 i 6 svrstani pretežno evropski sojevi, a u grupe 2 i 5 uglavnom izolati iz SAD. Nije pronađena veza između neuropatogenog potencijala virusa i njegove pripadnosti određenoj grupi s obzirom da su neurovirulentni sojevi detektovani u svakoj od geografskih grupa.

Dalja ispitivanja vezana za prevalenciju infekcija konja neurovirulentnim sojevima EHV-1 vršili su mnogi autori. Allen (2006) je ispitivao minimalno invazivnu proceduru za dokazivanje prisustva virusa kod latentno inficiranih jedinki čime bi se smanjio rizik od eventualnog izbijanja epizootije herpesvirusnog mijeloencefalitisa u populacijama konja kao posledica reaktivacije virusa prisutnog u njihovom organizmu. Autor je u uzorcima bioptata submandibularnih limfnih čvorova konja prethodno inficiranih neurovirulentnim (G₂₂₅₄) i manje virulentnim sojevima EHV-1 (A₂₂₅₄) primenom metode nested PCR detektovao prisustvo EHV-1 pomoću specifičnog para prajmera za ORF30 genetski segment, a dobijeni PCR produkti su sekvencirani u cilju detekcije SNP na poziciji 2254 navedenog gena. Pored dokazane mogućnosti detekcije neurovirulentnih sojeva pomenutom procedurom, rezultati ove studije su pokazali da kod konja kod kojih je latentna infekcija EHV-1 dokazana u limfnim čvorovima, virusna DNK nije bila prisutna u leukocitima u perifernoj cirkulaciji, ukazujući da uzorci bioptata limfnih čvorova prilikom proučavanja prisustva latentne infekcije kod živih životinja predstavljaju adekvatniji uzorak od pune krvi. Primenom navedene metode su detektovane latentne infekcije istim sojevima kojima su eksperimentalni konji inficirani pre početka ispitivanja. U većoj studiji koja je sprovedena od strane Allen i sar. (2008) prethodno opisanom metodologijom je vršeno postmortalno ispitivanje uzoraka submandibularnih limfnih čvorova poreklom od 132 odrasle kobile uginule sa simptomima mijeloencefalopatije, pri čemu je prisustvo latentne infekcije konjskim herpesvirusom 1 dokazano kod 54% ispitivanih uzoraka, među kojima je kod

18% uzoraka detektovano prisustvo mutacije u ORF30 genu. Navedeno ispitivanje je potvrdilo prisustvo latentne infekcije konjskim herpesvirusom 1 kod velikog broja životinja kao i činjenicu da limfni čvorovi predstavljaju značajno mesto za ostvarivanje latencije navedenog virusa. Pored toga, autori su ukazali na značajan broj životinja koje su latentno inficirane neurovirulentnim sojevima pomenutog virusa što može predstavljati ozbiljan epizootiološki problem. Allen i sar. (2007) i Leutenegger i sar. (2008) predlažu unapređenje dijagnostike infekcije konja neurovirulentnim sojevima EHV-1 razvojem real-time PCR metode koja omogućuje detekciju SNP na nivou ORF30 u uzorcima nervnog tkiva poreklom od konja sa dijagnostikovanom mijeloencefalopatijom primenom specifičnih proba, što je i primenjeno u mnogim radovima različitih autora. Sa brzim napretkom na polju razvoja dijagnostičkih metoda kao što je real-time PCR u cilju identifikacije SNP u ORF30 genu, mnogi autori prijavljuju mešovite infekcije konja sa oba genotipa EHV-1 (Pusterla i sar., 2009; Pusterla i sar., 2010). Cilj istraživanja Pusterla i sar. (2010) bila je detekcija i karakterizacija sojeva EHV-1 iz uzoraka submandibularnih limfnih čvorova i trigeminalnih ganglija konja pri čemu je u 44% ispitivanih uzoraka tkiva, pretežno uzoraka trigeminalnih ganglija, detektovano prisustvo DNK kako neurovirulentnih, tako i A₂₂₅₄ sojeva bez prisutne mutacije u okviru ORF30 gena. Od preostalih ispitivanih tkiva pozitivnih na prisustvo virusa u podjednakom procentu su detektovani neurovirulentni i manje virulentni sojevi EHV-1 (27%).

Narednih godina, mnogi autori sprovode retrospektivne studije u kojima su na prisustvo mutacija opisanih od strane Nugent i sar. (2006) ispitivani stari izolati EHV-1 iz kliničkih slučajeva mijeloencefalitisa i/ili abortusa kobilica širom sveta. Pored toga, vrše se ispitivanja prisustva G₂₂₅₄ genetskog markera i grupisanje izolata na osnovu markera u okviru ORF68 regiona i kod novije zabeleženih kliničkih slučajeva oboljenja konja izazvanih konjskim herpesvirusom 1. Prilikom ispitivanja epizootije herpesvirusnog mijeloencefalitisa u Belgiji zabeležene na više ergela tokom 2009. godine Gryspeerdt i sar. (2011) beleže da je veliki broj izolata EHV-1 pripadao neurovirulentnim sojevima virusa. Posle uspešne izolacije EHV-1 iz uzoraka pune krvi konja sa neurološkim simptomima i/ili povišenom telesnom temperaturom, svi izolati su ispitivani na prisustvo SNP u okviru dela gena ORF30. Konjski herpesvirus 1 je uspešno izolovan iz leukocita metodom kokultivacije u ćelijskoj liniji RK-13 i to iz 86%

uzoraka poreklom od febrilnih konja, 67% ataksičnih konja i 100% konja sa kvadriplegijom. Svi izolati su posle sekvenciranja ORF30 dela gena označeni kao neurovirulentni, odnosno posedovali su mutaciju na poziciji 2254 u okviru navedenog gena. Pored toga, pomenuti autori su izvršili i sekvenciranje ORF68 dela gena, svrstavši pri tom belgijske izolate u 4. geografsku grupu prema Nugent i sar. (2006). U ispitivanju etiologije pobačaja kobila sprovedenom u Italiji u periodu od 2004. do 2011. godine, u približno 50% je uzročnik bio EHV-1. Primenom real-time PCR metode opisane od strane Allen i sar. (2007), dokazana je veća prevalencija neurovirulentnih sojeva u navedenim slučajevima (Marenzoni i sar., 2013). McFadden i sar. (2014) po prvi put dokazuju prisustvo G₂₂₅₄ genotipa EHV-1 na Novom Zelandu posle izolacije navedenog virusa iz tkiva uginulih i eutanaziranih kobila tokom izbijanja enzootije pobačaja sa neurološkim simptomima na jednoj ergeli, ukazujući pri tom na potrebe za uvođenjem posebnih biosigurnosnih mera u cilju smanjenja mogućnosti transmisije navedenog virusa koja može imati ozbiljne ekonomske posledice. U ispitivanju Negussie i sar. (2015) opisana je izolacija i molekularna karakterizacija konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz kliničkih slučajeva herpesvirusnog mijeloencefalitisa kod konja, magaraca i mula u Etiopiji. Od ukupno 91 životinje uključene u ovo ispitivanje, 90 (98,9%) bilo je inficirano neurovirulentnim sojem EHV-1. Rezultati navedenih autora se razlikuju od rezultata sličnih studija sprovedenih u Evropi i SAD gde je zabeležena prevalencija ovih sojeva bila značajno niža. Analizom pomenutih sojeva EHV-1 na osnovu prisustva genetskih markera u okviru ORF68 regiona izolata iz Etiopije ustanovljeno je da svi pripadaju geografskoj grupi 4, odnosno evropskim sojevima EHV-1, ukazujući na njihovo poreklo.

Epizootiološki podaci koji opisuju prevalenciju neurovirulentnih sojeva EHV-1 u populacijama konja se razlikuju, pri čemu u je pojedinim studijama potvrđeno da većina terenskih izolata EHV-1 pripada A₂₂₅₄ genotipu EHV-1. Potrebno je naglasiti da navedeni sojevi nisu apatogeni i da se dovode u vezu sa 95-98% slučajeva pobačaja gravidnih kobila u SAD, Velikoj Britaniji i drugim zemljama, kao i sa između 15 i 25% slučajeva herpesvirusnog mijeloencefalitisa (Nugent i sar., 2006; Lunn i sar., 2009). Međutim, istraživanja Goodman i sar. (2007) pokazuju da su stariji konji podložniji razvoju kliničkih simptoma mijeloencefalopatije izazvane neurovirulentnim sojevima

EHV-1, što može imati značaja u interpretaciji rezultata pomenutih studija, a nije posebno proučavano.

Perkins i sar. (2009) sprovode retrospektivnu studiju u kojoj ispituju prevalenciju neurovirulentnog genotipa EHV-1 među ukupno 176 terenskih izolata prikupljenih u laboratoriji Univerziteta Cornell u periodu od 1984. do 2007. godine. Posle ekstrakcije virusne DNK izvršena je tipizacija sojeva EHV-1 primenom metode real-time PCR, a rezultati su dodatno potvrđeni sekvenciranjem ciljnog regiona ORF30. Rezultati navedene studije pokazuju da je 11% izolata pripadalo neurovirulentnim sojevima, pri čemu je većina izolovana iz slučajeva mijeloencefalitisa, a manji broj izolata je poreklom iz kliničkih slučajeva pobačaja i/ili respiratornog oboljenja. Uprkos statistički značajnoj zastupljenosti neurovirulentnih sojeva u slučajevima neurološkog oboljenja konja, autori izvode zaključak da odsustvo navedene mutacije ne isključuje mogućnost razvoja mijeloencefalitisa kod obolelih jedinki. Slične rezultate prijavljuju Mori i sar. (2011) koji su ispitivali brazilske izolate EHV-1 iz kliničkih slučajeva mijeloencefalitisa kobilica na prisustvo pomenute mutacije. Pomenuti autori su zaključili da postoje i drugi, još uvek nedefinisani faktori pod kojima dolazi do razvoja neurološkog oboljenja kod konja, odnosno da isto nije uvek vezano za infekciju G₂₂₅₄ sojevima EHV-1. Metoda real-time PCR je korišćena i prilikom ispitivanja prevalencije neurovirulentnih sojeva EHV-1 u uzorcima poreklom od konja kojima je u Francuskoj u periodu od 2002. do 2009. godine dijagnostikovano mijeloencefalitis, respiratorno oboljenje ili su izolovani iz slučajeva pobačaja. Od 125 analiziranih uzoraka, 24% je pripadalo G₂₂₅₄, odnosno neurovirulentnom genotipu EHV-1, ishodom kao i slučajeva abortusa (Pronost i sar., 2010). Malik i sar. (2010) sintetisali specifične prajmere i probu specifične za detekciju SNP u okviru ORF30 regiona genoma EHV-1 i ispituju 35 terenskih izolata EHV-1 iz perioda od 1977. do 2008. godine poreklom iz slučajeva pobačaja gravidnih kobilica u Mađarskoj. Rezultati istraživanja navedenih autora pokazuju da 14,3% od ukupnog broja ispitivanih izolata EHV-1 poseduje G₂₂₅₄ genotip i predlažu korišćeni real-time PCR protokol za brzu i pouzdanu detekciju neurovirulentnih sojeva EHV-1. S obzirom na veliki broj studija koje se bave rasprostranjenosti neuropatogenih sojeva EHV-1 u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropi, Yilmaz i sar. (2012) sprovode ispitivanje prevalencije navedenih sojeva u populacijama konja u regionu Marmara u Turskoj. Rezultati dobijeni primenom metode

real-time PCR su potvrđeni sekvenciranjem ciljnog ORF30 dela gena i ustanovljena je niska prevalencija G₂₂₅₄ genotipa od 7,8% (4 od ukupno 51 izolata EHV-1) pri čemu su svi poreklom od životinja sa istorijom pobačaja i/ili neurološkog oboljenja. Sličnu studiju sproveli su i Stasiak i sar. (2015) u Poljskoj, pri čemu su rezultati sekvenciranja ORF30 dela gena izolata konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz slučajeva abortusa u periodu od 1999. do 2012. godine pokazali prevalenciju neurovirulentnih sojeva od 3,1%. Isti autori u novijoj studiji ispituju prisustvo mutacije na poziciji 2254 gena koji kodira sintezu DNK polimeraze EHV-1, odnosno prevalenciju neurovirulentnih sojeva među 38 izolata poreklom iz slučajeva abortusa gravidnih kobila u Poljskoj od 1999 do 2016. godine. Izveden je zaključak, kao i u prethodnom ispitivanju, da svi ispitivani sojevi, izuzev dva izolata iz 2009. i 2010. godine, pripadaju A₂₂₅₄ genotipu (Stasiak i sar., 2017). Pojava herpesvirusnog mijeloencefalitisa je veoma retka u Australiji u poređenju sa Sjedinjenim Američkim Državama ili Evropom i iz navedenog razloga Cuxson i sar. (2014) su ispitivali prevalenciju neurovirulentnih sojeva među 66 australijskih izolata EHV-1 iz slučajeva pobačaja ili neurološkog oboljenja konja. Rezultati ove studije su pokazali da su samo dva ispitivana izolata nosioci mutacije u okviru ORF30 gena, odnosno da je prisutna značajnija prevalencija manje virulentnih sojeva EHV-1 u Australiji. Anagha i sar. (2016) su sproveli studiju sličnu autorima iz drugih zemalja u cilju procene genetskog diverziteta i postojanja neurovirulentnog genetskog markera među indijskim izolatima EHV-1 poreklom iz slučajeva abortusa. Primenom metode real-time PCR i potvrde sekvenciranjem ORF30 dela gena navedenih virusa, autori su otkrili prisustvo G₂₂₅₄ mutacije u 2 od ukupno 56 ispitanih izolata (3,57%).

Fritsche i Borchers (2011) su slično autorima iz drugih zemalja ispitivali rasprostranjenost neuropatogenih sojeva EHV-1 među izolatima iz slučajeva pobačaja gravidnih kobila u Nemačkoj primenom metode nested PCR i sekvenciranja dela gena ORF30. U studiji su bili uključeni izolati EHV-1 iz slučajeva pobačaja, kao i arhivirani izolati prikupljeni u periodu od 1987. do 2009. godine. Svega 10,6% izolata EHV-1 je posedovalo neurovirulentni genetski marker, dok je većina izolovanih sojeva virusa poreklom od kobila koje su pored pojave pobačaja imale i neurološke simptome oboljenja. Pored toga, autori su uz substituciju adenina guaninom na poziciji 2254 u ORF30 genu, kod referentnih sojeva EHV-1 Ab4 i RaCH kao i jednog nemačkog

terenskog izolata otkrili prisustvo SNP, odnosno zamene adenina citozinom na poziciji 2258 istog gena. Pomenuta substitucija dovodi do zamene aminokiseline tirozin serinom na poziciji 753 u sekvenci virusne DNK polimeraze. Slične rezultate u svom radu opisuju i Smith i sar. (2010) koji su izneli pretpostavku da SNP na poziciji 2258 takođe može imati uticaj na neuropatogeni potencijal sojeva sa G₂₂₅₄ mutacijom. Podaci retrospektivnog ispitivanja navedenih autora su pored dokaza o postojanju navedene mutacije, pokazali da su neurovirulentni sojevi EHV-1 prisutni na terenu još od pedesetih godina prošlog veka, pri čemu je njihov broj polako rastao od utvrđenih 3,3% šezdesetih godina do 19,4% 2006. godine. Ovakvi rezultati ukazuju da prevalencija mutiranih neuropatogenih sojeva raste iz godine u godinu čime se povećava rizik od epizootija neurološkog herpesvirusnog oboljenja u populacijama konja.

Barbić i sar. (2012) su istraživali enzootije herpevirusne mijeloencefalopatije i pobačaja koje su se odigrale na dve odvojene ergele u istočnoj Hrvatskoj tokom 2009. godine. Iz epizootioloških podataka zaključeno je da je oboljenje introdukovano na prvu ergelu konja uvozom seronegativnih konja iz Sjedinjenih Američkih Država, dok je enzootija na drugoj ergeli uzrokovana introdukcijom klinički zdravog pastuva sa prve ergele. Molekularnom karakterizacijom sa filogenetskom analizom izolovanih sojeva EHV-1 iz oba slučaja potvrđeno je da je identičan virus doveo do oboljenja životinja na obe pomenute ergele. Svi izolati u navedenom istraživanju su pripadali G₂₂₅₄ genotipu EHV-1, pri čemu je sekvenciranjem ORF68 dela gena ustanovljeno grupisanje ovih sojeva u 1. i 2. grupu prema Nugent i sar. (2006) gde su svrstani uglavnom severnoamerički izolati EHV-1. Damiani i sar. (2014) opisuju enzootiju abortusa na ergeli u severnom delu Nemačke pri čemu je virusološkim ispitivanjem dokazana herpesvirusna etiologija, a izolovani sojevi su pripadali neurovirulentnom genotipu EHV-1. Pored toga, izvršeno je i grupisanje izolata na osnovu ORF68 sekvenci i utvrđena je njihova pripadnost 4. geografskoj grupi, odnosno evropskim sojevima EHV-1 ukazujući da je do oboljenja došlo usled reaktivacije latentno prisutnog virusa kod konja sa navedene ergele, odnosno da za razliku od studije Barbić i sar. (2012) izvor infekcije ne predstavljaju skorije introdukovane životinje.

Malik i sar. (2012) su izvršili molekularnu karakterizaciju i geografsko grupisanje 35 mađarskih sojeva EHV-1 izolovanih iz slučajeva pobačaja u periodu od 1977. do 2008. godine. Posle sekvenciranja polimorfnog ORF68 genetskog segmenta,

autori su svrstali mađarske izolate u 7 geografskih grupa, pri čemu su 23 izolata pripadala grupama prethodno opisanim od strane Nugent i sar. (2006), dok su zabeleženi polimorfizmi na nivou pojedinačnih nukleotida u sekvencama preostalih 12 izolata EHV-1 usloveli stvaranje 4 dodatne geografske grupe. U navedenom radu, polimorfni genetski segment regiona ORF68 od oko 600bp se pokazao kao koristan u detekciji genetskih markera geografskih grupa EHV-1. S obzirom da su podaci iz rada Malik i sar. (2012) pokazali da sojevi EHV-1 iz ovog dela Evrope pokazuju poseban polimorfizam, postoji potencijal za formiranjem velikog broja grupa i iz navedenog razloga se takva pojava mora ograničiti standardizacijom pravila grupisanja sojeva pomenutog virusa. Autori su koristili nukleotidnu sekvencu referentnog soja Ab4 EHV-1 koji je svrstan u 1. grupu kao osnovu za pravljenje poređenja na nivou pojedinačnih nukleotida. Prema prethodno opisanim kriterijumima za grupisanje izolata EHV-1 prema geografskom poreklu, mađarski sojevi su svrstani u grupe 2, 3 i 4, sa najvećim brojem pripadnika grupe 2. Navedeni nalaz je u suprotnosti sa podacima Nugent i sar. (2006) koji su u grupu 2 svrstali severnoameričke izolate EHV-1. Broj rezidua guanina (G) na pozicijama 732-739 u okviru ORF68 segmenta je kod svih mađarskih izolata iznosio 7. Na osnovu prisustva SNP u navedenom genu, 12 izolata koji su svrstani u nove grupe su imali različite karakteristike. Pripadnici 7. grupe poseduju poklapanja sa grupama 3 i 5, međutim na pozicijama 710 i 719 u odnosu na grupu 3 je došlo do zamene G sa C, odnosno T sa A, kao i do pojave SNP na poziciji A₇₅₅. Sekvence ORF68 segmenta virusa iz 8. grupe na poziciji 426 poseduju G, za razliku od svih ostalih grupa kod kojih je na navedenom mestu citozin (C₄₂₆). U 9. i 10. grupi se nalazi po jedan mađarski izolat EHV-1, pri čemu je grupa 9 formirana na osnovu postojanja 2 od 3 markera identična 5. grupi dok se razlikuju prema prisustvu SNP na poziciji G₆₂₉. Soj EHV-1 iz 10. grupe poseduje jedinstvene SNP i njegova ORF 68 sekvenca se značajno razlikuje od svih ostalih. U grupi 2 mađarskih sojeva nalaze se izolati koji datiraju od 1977. do 2005. godine, pri čemu su izolati iz grupa 3 i 8 poreklom od slučajeva pobačaja u periodima od 1997. do 2008. godine, odnosno 1997. do 2006. godine. Interesantan podatak je da su sojevi iz 7. grupe introdukovani iz Srbije prilikom transporta konja u Nemačku preko Mađarske. Anagha i sar. (2016) sekvenciranjem ORF68 genetskog segmenta ukupno 9 indijskih izolata i analizom prisustva mutacija koje određuju pripadnost određenoj grupi, iste svrstavaju u geografske grupe 4 i 5, pri

čemu se jedan izolat razlikovao na pozicijama C₇₁₀ i C₇₁₃ čime su autori formirali dodatnu grupu. Prilikom ispitivanja pripadnosti 66 australijskih izolata EHV-1 iz slučajeva pobačaja ili neurološkog oboljenja konja određenoj geografskoj grupi analizom sekvenci ORF68 genetskog segmenta, Cuxson i sar. (2014) su ustanovili veliku genetičku heterogenost među australijskim sojevima EHV-1 koji su uglavnom klasifikovani u grupe 2 i 3, a manji broj je pripadao geografskoj grupi 5. U navedenoj studiji je utvrđen visok nivo varijabilnosti u okviru ORF68 sekvenci, što pri tom nije bilo vezano za geografsko poreklo sojeva. Slične rezultate beleže Stasiak i sar. (2017) koji vrše karakterizaciju 38 izolata EHV-1 poreklom iz slučajeva pobačaja iz perioda od 1999. do 2016. godine na osnovu analize njihovih ORF68 regiona. Većina (81,6%) ispitivanih sekvenci nije klasifikovana ni u jednu od grupa prema Nugent i sar. (2006), pri čemu su preostalih 7,9% i 10,5% sekvenci pripadale 3., odnosno 4. grupi. Pored toga, u svim poljskim sekvencama ORF68 regiona EHV-1 detektovano je prisustvo 7 rezidua guanina na pozicijama 732-739 navedenog gena. Stasiak i sar. (2017) na osnovu dobijenih podataka zaključuju da ORF68 ne predstavlja pouzdan molekularni marker za izvođenje epizootioloških studija infekcija izazvanih konjskim herpesvirusom 1.

Konjski herpesvirusi 2 i 5

Termin konjski herpesvirus 2, označen kao soj LK, u naučnoj literaturi se prvi put pojavljuje 1963. godine, a odnosi se na virus izolovan 1962. godine u Engleskoj iz nosnog sekreta ždrebeta sa respiratornim simptomima (Plummer i Waterson, 1963). Od tada, veliki broj autora beleži izolaciju sličnih virusa iz respiratornog trakta, leukocita, kostne srži i drugih organa klinički zdravih konja (Bryans, 1968; Hsiung i sar., 1969; Erasmus, 1970; Studdert, 1974). Navedeni virusi se često nalaze i kao kontaminanti primarnih ćelijskih kultura poreklom od tkiva zdravih konja, pri čemu su morfološki slični herpesvirusima, a zapaženo je da prema načinu replikacije i izgledu citopatogenog efekta koji izazivaju na ćelijskoj kulturi nalikuju citomegalovirusima (Plummer i Waterson, 1963; Erasmus, 1970; Studdert, 1974). Izolati EHV-2 se *in vitro* uspešno umnožavaju isključivo u ćelijskim linijama poreklom od konja sa izuzetkom primarnih ćelijskih kultura bubrega zeca i mačke. Većina autora je ustanovila da se izolati navedenog virusa veoma sporo umnožavaju dovodeći do pojave CPE u odgovarajućim ćelijskim kulturama za više od 3 nedelje. S obzirom na navedene karakteristike umnožavanja *in vitro* većine sojeva, isti su nazvani citomegalovirusi konja (Bryans,

1968; Plummer i sar., 1969; Studdert, 1974; O Callaghan i sar., 1978; Wharton i sar., 1981), a kasnije su svrstani u betaherpesviruse (Roizman i sar., 1981). Uprkos tome što EHV-2 nije podeljen na antigenske tipove, proučavani izolati navedenog virusa se karakterišu visokom stepenom antigenskih i genetskih varijacija (Erasmus, 1970; Plummer i sar., 1973; Browning i Studdert, 1987b).

Browning i Studdert (1987b) su prilikom proučavanja genetske heterogenosti izolata betaherpesvirusa primenom metode digestije restriktivnim endonukleazama zabeležili da se izdvaja grupa ovih virusa koja se naročito razlikuje. Primenom Southern blot hibridizacije primećeno je da 4 ispitivana izolata imaju nizak nivo homologije sa kontrolnim sojem EHV-2, a pored toga, navedeni virusi su posedovali i značajno manje genome. Navedena grupa virusa je iz tog razloga označena kao EHV-5. Ispitivana 4 izolata su bila poreklom iz 3 odvojene grupe konja: soj M2BO izolovan je iz leukocita kobile sa respiratornim simptomima, a soj 253/72 poreklom je od konja uvezenog u Australiju iz Velike Britanije, a koji je u karantinu dobio kliničke simptome respiratornog oboljenja. Preostala dva soja su bili izolati poreklom iz nosnih briseva dva konja koji datiraju iz 1970. godine, što retrospektivnom analizom ukazuje da su to prvi zabeleženi izolati EHV-5 (Turner et al., 1970). Agius i sar. (1992) su prilikom ispitivanja razlika među genomima EHV-2 i EHV-5 primenom Southern blot hibridizacije takođe ustanovili veoma značajne razlike, međutim Telford i sar. (1993) primenom metode sekvenciranja genoma otkrivaju da su EHV-2 i EHV-5 srodni, ali različiti virusi koji pripadaju podfamiliji *Gammaherpesvirinae*.

U radu Reubel i sar. (1995) po prvi put je opisana multiplex nested PCR metoda koja brzo i pouzdano omogućuje razlikovanje EHV-2 i EHV-5 koji su do tada razlikovani samo primenom restriktivnih endonukleaza. Autori su koristili parove prajmera koji se specifično vezuju za deo gB gena EHV-2, odnosno deo TK gena EHV-5, a primenljivost protokola je potvrđena ispitivanjem uzoraka poreklom od inokulisanih kultura tkiva, kao i uzoraka nosnih briseva i pune krvi konja. U poređenju sa izolacijom EHV-2 i EHV-5 na ćelijskim kulturama koja u nekim slučajevima može potrajati i preko 14 dana, navedena metoda je brža pri čemu se pokazala i kao osetljivija. Uprkos tome, incidenca infekcije konja konjskim herpesvirusom 2 opisana u ovoj studiji bila je daleko niža nego u do tada objavljenim radovima. Autori pomenuti nalaz objašnjavaju malim brojem inficiranih ćelija u ispitivanim uzorcima i navode da u

takvim slučajevima primeni PCR treba da prethodi izolacija virusa u kulturi ćelija čime bi se broj virusnih čestica u uzorku povećao prirodnim putem. Franchini i sar. (1997) su na osnovu rezultata dobijenih primenom PCR sa različitim kombinacijama prajmera specifičnim za više regiona u okviru genoma EHV-2 došli do zaključka da postoji veliki broj subpopulacija navedenog virusa i da se iz tog razloga rezultati ispitivanja u kojima je detektovana njihova niska prevalencija moraju uzimati sa rezervom. Pored toga, autori su potvrdili pretpostavku Reubel i sar. (1995) da najpouzdaniji metod detekcije gamaherpesvirusa konja predstavlja izolacija virusa, odnosno kokultivacija ispitivanih uzoraka tkiva sa osetljivom ćelijskom kulturom, dok se njihova identifikacija i diferencijacija može vršiti primenom lančane reakcije polimeraze. Primenom metode kokultivacije uzoraka limfnih čvorova respiratornog trakta, leukocita, trigeminalnih ganglija, slezine, tonzila i alveolarnih makrofaga poreklom od konja iz klanice sa osetljivim ćelijskim linijama RK-13 i EEK (*eng.* equine embryonic kidney), konjski herpesvirus 2 je detektovan u većini navedenih tkiva svih ispitivanih konja izuzev jednog sa najvećom prevalencijom u limfoidnom tkivu respiratornog trakta (Edington i sar., 1994). Rizvi i sar. (1997) su ispitivali distribuciju EHV-2 u nervnom i limfoidnom tkivu 12 seropozitivnih konja primenom metode PCR sa posebno sintetisanim prajmerima specifičnim za ORF64 region genoma pomenutog virusa za koji autori tvrde da predstavlja visokokonzervirani region među EHV-2 izolatima. Rezultati ove studije su potvrdili prethodno postojeće podatke visokoj prevalenciji EHV-2 u limfnim čvorovima respiratornog trakta, nadovezujući se na nalaz Drummer i sar. (1996) koji su dokazali da navedeni virus ostvaruje latentnu infekciju u B limfocitima. Međutim, nukleinska kiselina EHV-2 je detektovana i u centralnom nervnom sistemu kao i u trigeminalnim ganglijama kod 50% životinja ukazujući na značaj ovih tkiva u ostvarivanju latentne infekcije ovog virusa. Borchers i sar. (1997) su prilikom ispitivanja prevalencije infekcija konjskim herpesvirusom 2 u Nemačkoj u leukocitima iz uzoraka pune krvi 172 konja primenom PCR detektovali navedeni virus u 51% uzoraka, dok je virus metodom kokultivacije uspešno izolovan u 31% slučajeva. Pomenuti autori su sintetisali i koristili prajmere za deo gena EHV-2 koji kodira sintezu homologa interleukinu 10 (IL-10) konja i za koji se pretpostavlja da poseduje imunomodulatornu ulogu. Primenom RK-13 ćelijske linije Dunowska i sar. (1999) po prvi put na Novom Zelandu beleže uspešnu izolaciju EHV-5 iz 38 uzoraka leukocita i

nosnih briseva poreklom od 114 ispitivanih konja, međutim navedeni nalaz nije doveden u vezu sa prisustvom respiratornog oboljenja. Pored toga, kod većine konja je dokazano prisustvo mešovite infekcije konjskim herpesvirusima 2 i 5 primenom PCR. Borchers i sar. (2006) ispituju prevalenciju EHV-2 u konjunktivalnim brisevima, odnosno tropizam pomenutog virusa prema ćelijama konjunktive konja primenom PCR pri čemu uspešno detektuju virusnu nukleinsku kiselinu kod 28,6% klinički zdravih, odnosno 8,3% konja sa simptomima konjunktivitisa. Pored toga, autori su detektovali nukleinsku kiselinu EHV-2 i u uzorcima optičkog nerva, suznih žlezda i tkiva konjunktiva nasumično odabranih konja iz klanice i naveli mogućnost da ista predstavljaju potencijalna mesta u kojima ovaj virus ostvaruje latenciju.

Nordengrahn i sar. (2002) su ispitali prevalenciju infekcija konjskim herpesvirusima 2 i 5 u populacijama konja u Švedskoj, Mađarskoj i Velikoj Britaniji primenom PCR sa prajmerima za deo gena koji kodira sintezu glikoproteina H (gH) EHV-2, odnosno EHV-5. Analizom leukocita iz uzoraka pune krvi potvrđena je visoka prevalencija EHV-2 od 68%, do 71% u populacijama odraslih konja pri čemu je dokazana tvrdnja drugih autora da je navedeni virus latentno prisutan u B limfocitima. Takođe, navedeni virus je detektovan u 93% uzoraka nosnih briseva ispitivanih konja. Zabeležena prevalencija EHV-5 je bila značajno niža, odnosno od 15 do 24%. Pored toga, utvrđeno je da do infekcije konjskim herpesvirusom 2 dolazi u uzrastu između 6 i 8 nedelja, dok je prisustvo EHV-5 detektovano nešto kasnije, kod ždrebadi uzrasta od 4 do 6 meseci. Dunowska i sar. (2002) su vršili ispitivanje prisustva konjskih herpesvirusa u populaciji ždrebadi na Novom Zelandu u cilju ustanovljavanja u kojem uzrastu dolazi do navedenih infekcija. Od ukupno 157 uzoraka pune krvi, EHV-2 je izolovan iz leukocita 155 ždrebadi i iz 40 od 172 uzorka nosnih briseva. Pored EHV-2, jedini izolovan herpesvirus bio je EHV-5 i to iz uzoraka 15 ždrebadi. Autori su zaključili da do infekcije konjskim gamaherpesvirusima dolazi u prvih nekoliko meseci života konja, pri čemu EHV-2 predstavlja predisponirajući faktor za infekcije drugim virusnim infekcijama. Wang i sar. (2007) su dokazali primenljivost nested multiplex PCR metode za identifikaciju konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 u kliničkim uzorcima poreklom konja sa i bez klinički manifestnih simptoma respiratornog oboljenja. Pored prajmera specifičnih za EHV-1 i EHV-4 prethodno opisanih u radu Kirisawa i sar. (1993), autori su sintetisali parove prajmera specifične za delove gB gena EHV-2 i EHV-5. Konjski

herpesvirus 5 je identifikovan u uzrocima leukocita i nosnih briseva 78% ždrebadi i 47% odraslih konja, dok je EHV-2 detektovan u kod 30% ždrebadi od kojih su kod većine zabeleženi respiratorni simptomi. U cilju ispitivanja prisustva konjskih herpesvirusa 2 i 5 u populaciji konja na Islandu, Torfason i sar. (2008) su razvili semi-nested PCR protokol uz korišćenje prajmera specifičnih za gB gene navedenih virusa. Specifičnost i osetljivost primenjene molekularne metode je potvrđena analizom leukocita iz 47 uzoraka krvi kao i 52 uzorka različitih unutrašnjih organa (pluća, tonzile, limfni čvorovi, creva, pankreas, bubrezi, jetra, slezina itd.) odraslih konja i ždrebadi. Nukleinske kiseline EHV-2, odnosno EHV-5 su detektovane u 79% i 63% ispitivaih unutrašnjih organa, dok su u uzorcima ćelija bele krvne loze bili nešto manje zastupljeni između 10 i 20% i to u uzorcima poreklom od ždrebadi. Marenzoni i sar. (2010) u svom ispitivanju starosne prevalencije infekcija konjskim herpesvirusom 5 potvrđuju rezultate drugih studija. Navedeni autori primenom PCR sa specifičnim prajmerima za gB gen EHV-5 ispituju prisustvo ovog virusa u uzorcima nosnih briseva i leukocita ukupno 55 konja rase lipicaner. Zastupljenost EHV-5 u nosnim brisevima i leukocitima mladih konja iznosila je 73,3%, odnosno 80%, dok je kod starijih kategorija životinja navedeni virus detektovan u 20% uzoraka krvi i 40% nosnih briseva. S obzirom na veliku genetsku heterogenost sojeva EHV-2 prijavljenu u studijama mnogih autora, Brault i sar. (2011) ispituju razlike u genetskim sekvencama gB gena i količini izlučenog EHV-2 tokom prvih 5 meseci života odabrane grupe ždrebadi. Autori su zabeležili veliku heterogenost gB gena sojeva EHV-2, kako poreklom od različite ždrebadi tako i detektovanih kod istih jedinki. Pored toga, najveća koncentracija virusnih čestica u nosnom sekretu poklapa se sa uzrastom od oko 3 meseca. Hue i sar. (2014) opisuju real-time PCR protokol čijom primenom je omogućena brza detekcija i diferencijacija EHV-2 i EHV-5 u nosnim brisevima 172 konja sa kliničkim simptomima respiratornog oboljenja. Podaci navedenih autora ukazuju na visoku prevalenciju gamaherpesvirusnih infekcija, pri čemu takođe dovode u vezu uzrast konja sa detekcijom pomenutih virusa. Prisustvo EHV-2 je češće zabeleženo kod najmlađih kategorija konja, pri čemu su i prevalencija infekcije i količina detektovanog virusa opadali sa starošću životinja. Autori su pokazali da prevalencija EHV-5 u populaciji raste u prvih nekoliko meseci života, pri čemu kod starijih i mlađih kategorija konja nema razlika u količinama izlučenog virusa. Prilikom ispitivanja epizootije akutne respiratorne infekcije u

populaciji konja u zapadnom Alžiru, Laabassi i sar. (2017) ispituju prisustvo konjskih herpesvirusa u ukupno 100 nosnih briseva konja uzrasta od 1 do 27 godina primenom metode real-time PCR. U odnosu na nisku prevalenciju EHV-1 i EHV-4 od 2% i 14%, EHV-2 i EHV-5 su detektovani u 90%, odnosno 75% uzoraka. Od ukupno 90 inficiranih konja, kod 70 životinja je detektovana mešovita infekcija sa konjskim herpesvirusima 2 i 5, dok su u nosnim brisevima 14 životinja pronađeni EHV-4, EHV-2 i EHV-5. Pored toga, autori takođe beleže da je 97,3% konja starosti do 3 godine inficirano konjskim herpesvirusom 5, pri čemu je prevalencija navedene infekcije, kao i količina izlučenog virusa opadala sa starošću životinja. Bilge Dagalp i sar. (2018) su ispitivali prisustvo konjskih herpesvirusa tokom enzootije respiratornog oboljenja na jednoj ergeli u Turskoj u uzorcima nosnih briseva i leukocita 29 ždrebadu primenom multiplex nested PCR metode opisane u radu Wang i sar. (2007). Detektovano je ukupno 58,6% uzoraka pozitivnih na prisustvo EHV-2, odnosno 75,9% pozitivnih na EHV-5, a zabeležen je i visok procenat mešovityh infekcija izazvanih sa EHV-4, EHV-2 i EHV-5 (75,9% slučajeva).

Poređenjem sekvenci gB gena novozelandskih izolata EHV-5 međusobno i sa australijskim izolatima navedenog virusa Dunowska i sar. (2000) zapažaju veliku genetičku heterogenost među sojevima izolovanim iz uzoraka poreklom od različitih konja, dok su sojevi izolovani iz iste životinje pokazali visok stepen homologije. S obzirom da je gB jedan od imunološki najznačajnijih glikoproteina herpesvirusa, razlike u sekvencama gB gena izolata poreklom od različitih životinja najverovatnije odražavaju razlike u imunološkom odgovoru na navedeni patogen kod pojedinačnih konja. Iz pomenutog razloga se smatra da prisustvo mutacija u gB genu predstavlja mehanizam adaptacije gamaherpesvirusa na imunološke mehanizme domaćina. Ruszczyk i sar. (2004) su prilikom ispitivanja prevalencije infekcija konjskim herpesvirusom 2 iz leukocita poreklom od ukupno 139 konja uspešno izolovali navedeni virus iz 34 uzorka poreklom od životinja sa kliničkim simptomima respiratornog oboljenja primenom metode kokultivacije sa ED ćelijama. Identifikacija izolata je izvršena primenom PCR sa prajmerima za gB gen i specifičnim prajmerima za gen koji kodira sintezu homologa IL-10. Autori su koristili dve kombinacije prajmera s obzirom na veliku genetsku heterogenost sojeva EHV-2, pri čemu je primenom prajmera za gB gen uspešno identifikovano svega 8 izolata za razliku od rezultata PCR sa prajmerima

za IL-10 homolog kada je potvrđen identitet 34 izolata EHV-2. Cilj studije Bell i sar. (2006) je bila procena prevalencije prisustva konjskih herpesvirusa i genetske varijabilnosti njihovih gB gena analizom uzoraka nosnih briseva i leukocita kobilu i ždrebadi tokom vremenskog perioda od 6 meseci. Infekcije konjskim herpesvirusima 2 i 5 su bile uobičajen nalaz, i to u 75%, odnosno 88% uzoraka leukocita ždrebadi uzrasta od 6 meseci, međutim nalaz EHV-2 u nosnim brisevima je bio češći kod mlađih životinja, a što je u skladu sa rezultatima drugih autora da do infekcije ovim virusom dolazi u prvim nedeljama života konja. Bell i sar. (2006) su zaključili da do infekcije konjskim herpesvirusom 5 dolazi uglavnom kasnije kada ždrebad češće dolaze u kontakt sa drugim konjima. Analizom nukleotidnih sekvenci gB gena EHV-2 i EHV-5 u ovoj studiji pokazana je veća genetska heterogenost sojeva konjskog herpesvirusa 2 u odnosu na EHV-5 (95,5–99,3% nasuprot 98,8–99,3% homologije). Pored toga, ždrebad uzrasta od 4 nedelje su izlučivala sojeve EHV-2 genetski identične sojevima pomenutog virusa detektovanog kod njihovih majki ukazujući da kobile predstavljaju izvor infekcije ovim virusom već u prvim danima života. Kod starijih kategorija ždrebadi detektovano je više genetski heterolognih sojeva EHV-2, najverovatnije usled povećanog kontakta sa drugim konjima. Ataseven i sar. 2010 su u Turskoj ispitivali prevalenciju infekcija konjskim herpesvirusima 2 i 5 u uzorcima nosnih briseva i krvi konja sa simptomima respiratornog oboljenja. Primenom multiplex nested PCR metode, prisustvo nukleinske kiseline EHV-2 identifikovano je u 19,2% uzorka, dok je EHV-5 detektovan u 21,9% uzoraka. Rezultati filogenetske analize gB gena identifikovanih sojeva gammaherpesvirusa konja pokazali su značajna odstupanja od analognih sekvenci evropskih sojeva EHV-2 i EHV-5. Pored toga, turski EHV-2 sojevi su podeljeni u zasebne grane filogenetskog stabla, a njihove međusobne sličnosti su se kretale od 34,6–97,8%. Sojevi EHV-5 u ovom ispitivanju su se izdvajali od evropskih sojeva na zasebnu granu filogenetskog stabla, a poređenjem njihovih nukleotidnih sekvenci određena je međusobna sličnost od 77,3–90,2%. U populaciji trkačkih konja u Južnoj Koreji ispitivana je prevalencija respiratornih virusa u uzorcima nosnih briseva 89 životinja primenom PCR, pri čemu je najzastupljeniji patogen bio EHV-5 u 39% uzoraka (Ko i sar., 2013). Filogenetskom analizom njihovih gB sekvenci, sojevi EHV-5 su podeljeni u 3 genotipa (obeleženi su kao A, B i C) sa međusobnim sličnostima od 99–99,2%, pri čemu su se grupisali sa sojevima iz Australije, Turske i sa Islanda. S obzirom na

dokazanu visoku prevalenciju infekcija konjskim gamaherpesvirusima na Islandu, Thorsteinsdóttir i sar. (2013) vrše filogenetsku analizu sekvenci gena koji kodiraju sintezu gB, gH, DNK polimeraze i DNK terminaze terenskih sojeva EHV-2. Rezultati navedenog istraživanja pokazuju veliku varijabilnost u okviru gB i gH gena (73-99% sličnosti), za razliku od gena DNK terminaze i DNK polimeraze (98-100% sličnosti). Negussie i sar. (2017) su vršili molekularnu detekciju konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 kod konja u Etiopiji, kao i filogenetsku analizu EHV-2 i EHV-5 na osnovu sekvenci njihovih gB gena. Od ukupno 160 životinja sa respiratornim simptomima, EHV-5 je najčešće identifikovan (23,1%), a navedeni nalaz je praćen detekcijom EHV-2 u 20% uzoraka, pri čemu je prisustvo mešovite infekcije zabeleženo u 5,2% uzoraka. Pored toga i ovoj studiji je dokazana starosna prevalencija infekcija izazvanih konjskim herpesvirusom 5 kod konja mlađih od 3 godine. Filogenetska analiza identifikovanih sojeva gamaherpesvirusa pokazala je njihovu veliku genetsku heterogenost, pri čemu su se međusobne sličnosti sojeva EHV-2 i EHV-5 kretale od 94 do 99,4%, odnosno od 95,1 do 100%. Sličnost sojeva EHV-2 i EHV-5 detektovanih u Etiopiji sa izolatima iz drugih zemalja iznosila je od 92,9 do 99,5%. Filogenetska analiza detektovanih gamaherpesvirusa konja u radu Bilge Dagalp i sar. (2018) pokazala je visok stepen genetske heterogenosti njihovih gB sekvenci, nasuprot analiziranim sojevima EHV-4. Parcijalne sekvence gB gena turskih sojeva konjskog herpesvirusa 2 su bile 85,7-99,7% i 92,4-99,7% slične terenskim izolatima EHV-2 iz studije Ataseven i sar. (2010). Pored toga, ispitivani turski sojevi navedenog virusa su posedovali visok stepen sličnosti sa švajcarskim, nemačkim i britanskim sojevima EHV-2. Sekvence EHV-5 su posedovale stepen međusobne sličnosti od 98,8 do 99,7%.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je identifikacija i molekularna karakterizacija sojeva herpesvirusa konja poreklom iz uzoraka poreklom od konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske kao i arhiviranih sojeva EHV-1 iz virusološke laboratorije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Delovi nukleotidnih sekvenci identifikovanih sojeva virusa EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 čiji je redosled utvrđen primenom molekularnih metoda bili su upoređivani sa nukleotidnim sekvencama navedenih vrsta herpesvirusa izolovanih u drugim delovima sveta koje se nalaze u bazi nukleotidnih sekvenci u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih. Na ovaj način je ostvaren uvid u stepen podudarnosti nukleotidnih sekvenci između sojeva navedenih vrsta herpesvirusa konja izolovanih u Srbiji i Republici Srpskoj i herpesvirusa izolovanih u drugim delovima sveta. Pored ovoga, cilj ove doktorske disertacije bio je i utvrđivanje mesta identifikovanih sojeva herpesvirusa izolovanih kod konja sa područja Republike Srbije i Republike Srpske na filogenetskom stablu, odnosno njihove pripadnosti određenom genotipu.

Da bi se ostvario postavljeni cilj, definisani su sledeći zadaci:

1. Prikupljanje uzoraka nosnih briseva konja sa ergela i individualnih gazdinstava kao i uzoraka submandibularnih limfnih čvorova, slezine, kičmene moždine i produžene moždine konja iz klanice.
2. Laboratorijska obrada prikupljenih uzoraka nosnih briseva i organa radi izvođenja klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike.
3. Identifikacija konjskih herpesvirusa 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4) primenom metoda izolacije virusa na kulturi tkiva, virus neutralizacije, direktne imunofluorescencije i lančane reakcije polimeraze (PCR) i identifikacija konjskih herpesvirusa 2 i 5 (EHV-2 i EHV-5) primenom metoda izolacije virusa na kulturi tkiva i PCR.
4. Otkrivanje prisustva nukleinske kiseline virusa EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u uzorcima nosnih briseva i organa konja primenom metode Nested multiplex PCR.
5. Sekvenciranje dela genoma identifikovanih sojeva EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) primenom metode po Sanger-u.

6. Upoređivanje sekvenci identifikovanih sojeva herpesvirusa konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske kao i arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa nukleotidnim sekvencama sojeva herpesvirusa izolovanih kod konja u drugim delovima sveta koje se nalaze u bazi nukleotidnih sekvenci u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih.
7. Filogenetska analiza identifikovanih sojeva herpesvirusa konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske (BiH).
8. Sekvenciranje dela ORF30 regiona genoma identifikovanih sojeva virusa EHV-1 u ispitivanim uzorcima kao i arhiviranih sojeva virusa metodom po Sanger-u i određivanje redosleda nukleotida u regionu ORF30 genoma EHV-1, odnosno eventualno prisustvo supstitucije adenina (A) guaninom (G) na poziciji 2254 navedenog gena.
9. Sekvenciranje dela ORF68 regiona genoma EHV-1 primenom metode po Sanger-u i određivanje redosleda nukleotida u regionu ORF68 genoma EHV-1 sa filogenetskom analizom čime se omogućuje grupisanje izolata ovog virusa prema geografskom poreklu.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Materijal za ispitivanje

Uzorci – početni materijal za ispitivanje

Uzorci za ispitivanja poreklom od ukupno 137 nevakcinisanih konja sa ergela i iz privatnog sektora obuhvatali su 112 uzoraka nosnih briseva i 100 uzoraka organa (submandibularni limfni čvorovi, slezina, produžena moždina i kičmena moždina prikupljeni od 25 konja iz klanice). Pored navedenih uzoraka ispitivanjima je podvrgnuto i 5 arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Nosni brisevi su prikupljeni od konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske, uzorci organa su poreklom od konja iz klanice sa teritorije Republike Srbije, a arhivirani sojevi EHV-1 su liofilizovani sojevi EHV-1 izolovani osamdesetih godina prošlog veka iz slučajeva pobačaja gravidnih kobila, odnosno uginuća novorođene ždrebadu sa ergele „Ljubičevo“.

Uzorci organa konja prikupljeni su u periodu od novembra 2015. do januara 2016. godine. Konji od kojih su uzimani uzorci organa nisu imali nikakve kliničke simptome oboljenja i nisu prethodno vakcinisani protiv konjskih herpesvirusa 1 i 4, a poreklom su iz individualnih gazdinstava u južnobačkom okrugu (Vrbas), Sremskom okrugu (Ruma, Indija), Srednjebanatskom okrugu (Zrenjanin), Beogradskom okrugu (Obrenovac), Mačvanskom okrugu (Loznica), Braničevskom okrugu (Požarevac, Veliko Gradište) i Borskom okrugu (Negotin). U navedenoj grupi životinja su bili konji uzrasta od 8 meseci do 14 godina rasa lipicaner ili radni konji mešanih rasa.

Uzorci nosnih briseva su prikupljeni od konja sa teritorije Republike Srbije (50 uzoraka) i Republike Srpske (62 uzorka). Nosni brisevi konja uzorkovani u Republici Srbiji poticali su od konja iz individualnog sektora sa Zlatibora (Zlatiborski okrug), Stare Planine (Pirotski okrug) i iz Tutina i Kraljeva (Raški okrug). Pomenutu grupu konja činile su klinički zdrave i nevakcinisane životinje starosti od 3 do 27 godina rasa lipicaner, engleski punokrvnjak, hrvatski posavac, araber, haflinger, bosanski brdski

konj, domaći brdski konj kao i konji mešanih rasa. Prikupljanje navedenih uzoraka vršeno je u periodu od avgusta 2014. do septembra 2017. godine. Nosni brisevi konja poreklom iz Republike Srpske uzorkovani su u martu 2016. godine, pri čemu je 20 uzoraka prikupljeno od klinički zdravih, nevakcinisanih bosanskih brdskih konja starosti od 2 meseca do 14 godina na individualnom gazdinstvu u opštini Mrkonjić Grad, a 42 uzorka su poreklom od nevakcinisanih konja rase lipicaner starosti od 1 do 18 godina sa ergele "Vučijak" u Prnjavoru. Svi konji sa navedene ergele su bili klinički zdravi izuzev jedne omice kod koje su zabeleženi klinički simptomi respiratornog oboljenja.

Svi uzorci briseva i organa su prikupljeni u cilju ispitivanja prisustva i izolacije konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 (EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5), dok su arhivirani sojevi umnoženi i ispitivani primenom molekularnih metoda u cilju njihove molekularne karakterizacije. Prikupljeni uzorci nosnih briseva i organa su po topljeni u 2 ml hranljive podloge Eagle MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma i dodatkom antibiotika i antimikotika i čuvani na temperaturi od -20°C do početka ispitivanja.

Materijal koji je korišćen u metodi izolacije virusa i testa virus neutralizacije

- Referentni soj EHV-1, titra 6,25 log₁₀ TCID_{50%} umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13 (Rabbit Kidney 13), dobijen ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije;
- Izolovani referentni soj EHV-4, titra 3,5 log₁₀ TCID_{50%} iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju umnožavan u ćelijskoj liniji Vero;
- Izolovani referentni soj EHV-2, titra 3,3 log₁₀ TCID_{50%} iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13;
- Izolovani referentni soj EHV-5, titra 3,9 log₁₀ TCID_{50%} iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju umnožavan u ćelijskoj liniji RK-13;
- Kontinuirane ćelijske linije Rabbit Kidney 13 (RK-13, ATCC CCL-37, IZSBS, Breša, Italija) i Vero (Vero, ATCC CCL-81, IZSBS, Breša, Italija) nabavljene su ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije;
- Bakteriološki filteri za jednokratnu upotrebu sa veličinom pora od 0.22µm (Merck, SAD);

- Tučak i avan;
- Podloga za rast i održavanje ćelijske linije - minimalni esencijalni medijum (MEM, Capricorn Scientific, Nemačka);
- Fetalni teleći serum (FBS-12A, Capricorn Scientific, Nemačka);
- Mešavina antibiotika i antimikotika koja u sebi sadrži penicilin, streptomycin i amfotericin B (AAS-B, Capricorn Scientific, Nemačka);
- Poliklonski imuni serum protiv EHV-1 i EHV-4 (referentni serum Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije ispitan prema sertifikovanom referentnom serumu EURL);
- Mikroploče za rast ćelijskih linija, izolaciju i virus neutralizaciju od 24 i 96 bunara (Sarstedt, Nemačka);
- Parafilm (Serva, Nemačka).

Za izvođenje metoda izolacije i neutralizacije virusa korišćena je sledeća oprema: invertni mikroskop S15 A/G (Rundfunk-Fernsehen, Nemačka), frižider sa temperaturom 2-8°C (LTH, Makedonija), zamrzivač na -20°C (BEKO, Turska), vodeno kupatilo (Grant, Velika Britanija), termostat sa 5% CO₂ BJPX-C50 (Biobase Biodustry, Kina), laminarna komora IBK 1V1 (ISKRA, Slovenija), centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Nemačka), vorteks mešalica (VELP Scientifica, Italija) i mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal koji je korišćen u metodi direktne imunofluorescencije (TFA)

- Ćelijska linija Rabbit Kidney 13 (RK-13, ATCC CCL-37, IZSBS, Breša, Italija) nabavljena je ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije;
- Podloga za rast i održavanje ćelijske linije - minimalni esencijalni medijum (MEM, Capricorn Scientific, Nemačka);
- Fetalni teleći serum (FBS-12A, Capricorn Scientific, Nemačka);
- Mešavina antibiotika i antimikotika koja u sebi sadrži penicilin, streptomycin i amfotericin B (AAS-B, Capricorn Scientific, Nemačka);
- FITC konjugat za EHV-1 i EHV-4, poliklonski imuni serum konjugovan fluorescein izotiocijanatom – FITC (CJ-F-ERV, VMRD, SAD);

- Fosfatni slani pufer pH 7,2, aceton, destilovana voda;
- Mikroploče sa 96 bunara (Sarstedt, Nemačka).

U metodi direktne imunofluorescencije korišćena je sledeća oprema: fluorescentni mikroskop AXIO A2 Observer Invert Microscope (Zeiss, Nemačka), termostat sa 5% CO₂ (Binder, Nemačka), laminarna komora klase II A (Aquaria, Italija), zamrzivač na -20°C (LTH, Makedonija), frižider sa temperaturom 2-8°C (Whirlpool, SAD) i mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal koji je korišćen za metodu lančane reakcije polimeraze (PCR) i metodu Nested multiplex PCR

Materijal korišćen za ekstrakciju nukleinske kiseline virusa:

- Ekstrakcija virusne DNK iz pripremljenih uzoraka organa, nosnih briseva i uzoraka kod kojih je prilikom postupka izolacije virusa na ćelijskoj liniji zapažen karakterističan CPE vršena je upotrebom kita GeneJet Genomic DNA Purification Kit za 50 reakcija (K0721, Thermo Scientific, SAD). U sastav navedenog kita ulaze: 50 kolona za prečišćavanje DNK sa silikatnom membranom ubačene u mikrotube bez poklopca (2 ml), 50 mikrotuba bez poklopca (2 ml), proteinaza K, RN-aza A, rastvor za digestiju (Digestion Solution), rastvor za liziranje (Lysis Solution), koncentrovan pufer za ispiranje 1 (Wash Buffer 1), koncentrovan pufer za ispiranje 2 (Wash Buffer 2), pufer za prečišćavanje (Elution Buffer, 10 mM Tris-Cl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA);
- Dodatne neophodne supstance su: 96-100% etanol, 50% etanol i fosfatni slani pufer pH 7,2;
- Za čuvanje ekstrahovane DNK korišćene su mikrotube od 1,5 ml (Sarstedt, Nemačka).

U metodi ekstrakcije virusne DNK korišćena je sledeća oprema: zamrzivač na -20°C (BEKO, Turska), vodeno kupatilo (Grant, Velika Britanija), laminarna komora IBK 1V1 (ISKRA, Slovenija), centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Nemačka), vorteks

mešalica (VELP Scientifica, Italija), mikropipete (Eppendorf, Nemačka), skrejperi za čelije (Sarstedt, Nemačka).

Materijal korišćen za izvođenje metode Nested multiplex PCR za diferencijaciju EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5:

- Reagensi korišćeni za PCR su DreamTaq PCR Master Mix (2X) i voda za PCR (Water, nuclease-free) proizvođača Thermo Scientific (SAD);
- Parovi oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju delove gena koji kodiraju sintezu glikoproteina B (gB) EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 proizvođača Metabion International AG, Nemačka (Tabela 2.);
- Mikrotube od 1,5 ml (Sarstedt, Nemačka);
- PCR mikrotube od 0,2 ml (Greiner Bio-One, Austrija).

U metodi Nested multiplex PCR korišćena je sledeća oprema: termoprocetor ep Gradient S (Eppendorf, Nemačka), zamrzivač na -20°C (BEKO, Turska), laminarna komora IBK 1V1 (ISKRA, Slovenija), mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Tabela 2. Prajmeri za prvu i drugu fazu Nested multiplex PCR (Wang i sar., 2007)

	Sekvenca (5' – 3')	Deo gena	Broj baznih parova (bp) umnoženog fragmenta gena
Prajmeri za prvu fazu PCR			
EHV2L1	GATGGTCTCACCTCTAGCAT	EHV-2 gB	1111
EHV2R1	CTGGTGTAACACAGGTCTTC		
EHV5L1	CCAACACAGAAGACAAGGAG	EHV-5 gB	1339
EHV5R1	CACGGTGATACAGTCAGAGA		
FC2	CTTGTGAGATCTAACCGCAC	EHV-1 gB	1118
RC	GGGTATAGAGCTTTCATGGG	EHV-4 gB	1175
Prajmeri za drugu fazu PCR			
EHV2L2	GGTCTCACCTCTAGCATAAC	EHV-2 gB	817
EHV2R2	GCCACACTCTCTTCCTTAGT		
EHV5L1	CCAACACAGAAGACAAGGAG	EHV-5 gB	410
EHV5R2	AGTTGACCGTCGTTCTAGTG		
FC3	ATACGATCACATCCAATCCC	EHV-1 gB EHV-4 gB	
R1	GCGTTATAGCTATCACGTCC	EHV-1 gB	188
R4	CCTGCATAATGACAGCAGTG	EHV-4 gB	677

Materijal korišćen za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze (PCR) – amplifikacija dela gena ORF30 i ORF68 EHV-1:

- Ekstrakti DNK kod kojih je prethodno metodom Nested multiplex PCR utvrđeno prisustvo EHV-1;
- Reagensi korišćeni za PCR su DreamTaq PCR Master Mix (2X) i voda za PCR (Water, nuclease-free) proizvođača Thermo Scientific (SAD);

- Parovi oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju deo gena ORF30 koji kodira sintezu DNK polimeraze EHV-1, proizvođača Metabion International AG, Nemačka (Tabela 3.)
- Parovi oligonukleotidnih prajmera koji amplifikuju deo gena ORF68 koji predstavlja marker za grupisanje sojeva EHV-1 po geografskom poreklu proizvođača Metabion International AG, Nemačka (Tabela 4.);
- Mikrotube od 1,5 ml (Sarstedt, Nemačka);
- PCR tube (Greiner Bio-One, Austrija).

Tabela 3. Prajmeri za izvođenje PCR za deo gena ORF30 EHV-1 (Goodman i sar., 2007)

	Sekvenca (5' – 3')	Deo gena	Broj baznih parova (bp) umnoženog fragmenta gena
ORF30 F	GCTACTTCTGAAAACGGAGGC	ORF30	466
ORF30 R	TATCCTCAGACACG GCAACA		

Tabela 4. Prajmeri za izvođenje PCR za deo gena ORF68 EHV-1 (Nugent i sar., 2006)

	Sekvenca (5' – 3')	Deo gena	Broj baznih parova (bp) umnoženog fragmenta gena
ORF68 S1	GAAGATAGAATGGGTGTGAG	ORF68	~600
ORF68 R2	GTCCCCTACCTTTTAACG		
ORF68F	AGCATTGCCAAACAGTTCC	ORF68	~600
ORF68R	CAAGAAACCACTGCTCAACC		

Za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze korišćena je sledeća oprema: termoprocetor ep Gradient S (Eppendorf, Nemačka), zamrzivač na -20°C (BEKO,

Turska), laminarna komora IBK 1V1 (ISKRA, Slovenija), mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal korišćen za elektroforezu PCR produkata:

- 50x koncentrovan TAE pufer za elektroforezu – po sastavu tris-acetat-etilen diamin tetra sirćetna kiselina, proizvođača Thermo scientific, SAD;
- Destilovana voda;
- Etidijum bromid (Serva, Nemačka);
- Agaroza u prahu (Serva, Nemačka);
- Boja za PCR produkte – 5x Loading Dye (Fermentas, SAD);
- Obojen DNK marker - TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Velika Britanija);
- Dejonizovana voda.

Za pripremu agaroznog gela korišćena je mikrotalasna pećnica (Clatronic, Nemačka). Za elektroforezu PCR produkata korišćene su kade sa držačem gela za 16 i 32 uzorka (Serva, Nemačka) i strujna jedinica za elektroforezu (Serva, Nemačka), dok je za vizuelizaciju PCR produkata u gelu korišćen transiluminator (Vilber Lourmat, Francuska).

Materijal korišćen za prečišćavanje DNK iz agaroznog gela:

- PureLink Quick Gel Extraction Kit za 50 uzoraka (Invitrogen, Velika Britanija) u čijem sastavu su: pufer za razlaganje gela - Gel Solubilization Buffer (L3), pufer za ispiranje - Wash Buffer (W1), Elution pufer (E5), kolone sa filterom (Quick Gel Extraction Columns), tube za ispiranje - Wash Tubes, tube za prikupljanje DNK - Recovery Tubes.
- 96-100% etanol;

U metodi prečišćavanja DNK iz agaroznog gela korišćena je sledeća oprema: termalni blok (Thermo Scientific, SAD), laboratorijska vaga, centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Nemačka), mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal korišćen za prečišćavanje PCR produkata:

- Mini Elute PCR purification kit za 250 reakcija (Qiagen, SAD) u čijem su sastavu sledeći reagensi: pufer PB (Binding Buffer), pufer PE (Wash Buffer), Pufer za ispiranje (Elution Buffer), pH indikator, boja za produkt (Loading Dye), kolone sa filterom (Mini Elute Spin Columns);
- 96-100% etanol;
- Mikrotube od 1,5 ml (Sarstedt, Nemačka) za prikupljanje prečišćenih produkata.

U metodi prečišćavanja PCR produkata korišćena je sledeća oprema: laminarna komora IBK 1V1 (ISKRA, Slovenija), centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Nemačka), vorteks mešalica (VELP Scientifica, Italija), mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal korišćen za sekvenciranje PCR produkata:

- Formamid, izopropanol, ABI Prism BigDye 3.1 sistem za sekvenciranje (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), parovi prajmera iz prve i druge faze Nested multiplex PCR za amplifikaciju dela gena koji kodira sintezu glikoproteina B EHV-1 (FC2 i RC; FC2 i R1), prajmeri iz druge faze Nested multiplex PCR za amplifikaciju dela gena koji kodira sintezu glikoproteina B EHV-4, EHV-2 i EHV-5 (Tabela 2.), prajmeri za amplifikaciju dela gena ORF30 EHV-1 (Tabela 3.), prajmeri za amplifikaciju dela gena ORF68 EHV-1 (Tabela 4.);

Oprema korišćena za sekvenciranje prečišćenih PCR produkata: sekvencer ABI PRISM Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems, SAD), centrifuga MiniSpin plus

(Eppendorf, Nemačka), frižider sa temperaturom 2-8°C (LTH, Makedonija), zamrzivač na -20°C (BEKO, Turska), mikropipete (Eppendorf, Nemačka).

Materijal korišćen za određivanje nukleotidne homologije/ redosleda nukleotida i/ili formiranje filogenetskih stabala:

- Sekvence gB gena sledećih sojeva EHV-1:

Equid herpesvirus 1 strain T953 (KM593996.1), Equid herpesvirus 1 strain 01c1 (KF644578.1), Equid alphaherpesvirus 1 strain Yorkshire/114/1999 (KU206473.1), Equid herpesvirus 1 isolate TR-McIIA-12 (JX644987.1), Equid herpesvirus 1 isolate TR-MCA-11 (JX416466.1), Equid herpesvirus 1 isolate TR-GEA-11 (JX416465.1), EHV-1 TR01 (JN705794.1), D1, D3, D4, 3KM, 44V, 5LN, 13KM, 24KM, 21KM, 20S.

- Sekvence gB gena sledećih sojeva EHV-4:

Equid herpesvirus 4 isolate: AQHY12LT2104/1/HM (AB986064.1), Equid herpesvirus 4 isolate MD4-TR2011 (JN982956.1), Equid herpesvirus 4 isolate RJ4-TR2011 (JN982957.1), Equid herpesvirus 4 isolate TR-EHV4-ED-11 (JX416464.1), Equid herpesvirus 4 isolate TR-EHV4-TCO-11 (JX416462.1), Equid herpesvirus 4 isolate TR-EHV4-VSA-11 (JX416463.1), Equid alphaherpesvirus 4 strain: 83-MB (LC075582.1), Equid alphaherpesvirus 4 strain: 11-10 (LC075587.1), Equine herpesvirus 4 strain NS80567 (AF030027.1), 1LN.

- Sekvence gB gena sledećih sojeva EHV-2:

Equid herpesvirus 2 isolate Ger-7 (EF182697.1), Equid herpesvirus 2 isolate Ger-5 (EF182696.1), Equid herpesvirus 2 isolate Eng-3 (EF182701.1), Equid herpesvirus 2 isolate Eng-13 (EF182699.1), Equid herpesvirus 2 isolate Hun-1 (EF182704.1), Equid herpesvirus 2 isolate Swe-2 (EF182709.1), Equid herpesvirus 2 isolate EHV2-TR-NS28 (GU065279.1), Equid herpesvirus 2 isolate IS-EHV2-TR2011 (JN982963.1), Equid herpesvirus 2 isolate G-EHV2-TR2011 (JN982962.1), Equid herpesvirus 2 isolate RM-EHV2-TR2011 (JN982964.1), 3S.

- Sekvence gB gena sledećih sojeva EHV-5:

Equid herpesvirus 5 isolate IS-EHV5-TR2011 (JN982959.1), Equid herpesvirus 5 isolate Chantilly Lake (KC715732.1), Equid herpesvirus 5 isolate Archey (KC715730.1), Equid herpesvirus 5 isolate M-EHV5-TR2011 (JN982960.1), Equid herpesvirus 5 strain KREHV5/71 (HM234090.1), Equid herpesvirus 5 isolate RD-

EHV5-TR2011 (JN982961.1), EHV-5 BB5-5 (GQ325592.1), 3LN, 24LN, 47V, 23S, 16LN, 52V, 13MG.

- Sekvence ORF30 gena sledećih sojeva EHV-1:

Equid herpesvirus 1 isolate PL/2012/II (KR080393.1), Equine herpesvirus 1 strain Ab4 (AY665713.1), Equine herpesvirus 1 strain V592 (AY464052.1), 2PM, 6LN, 8LN, 25PM, 22KM, D1, D2, D3, D4, 44V, 1KM, 3PM.

- Sekvence ORF68 gena sledećih sojeva EHV-1 – predstavnici geografskih grupa
Grupa 1: Ab4 (AY665713.1) i GB80_1_2 (DQ172353.1); Grupa 2 US79_1_1 (DQ172394.1) i US89_1_1 (DQ172408.1); Grupa 3 GB01_1_1 (DQ172334.1) i NL99_1_2 (DQ172372.1); Grupa 4 DE12_1_1 (KJ513013.1) i FR00_1_1 (DQ172326.1); Grupa 5 US01_2_1 (DQ172376.1) i US03_6_2 (DQ172385.1); Grupa 6 GB01_2_1 (DQ172335.1) i GB85_1_1 (DQ172359.1); Grupa 7 78_01 (HQ654054.1); Grupa 8 97_03 (HQ654075.1); Grupa 9 83_01 (HQ654060.1); Grupa 10 04_04 (HQ654069.1); D1, D4.

- Sekvenca gB gena EHV-3

Equid alphaherpesvirus 3, strain: Iwate-2 (LC189063.1)

- Sekvenca gB gena HSV-1

Human alphaherpesvirus 1 strain 1-16 (KY274369.1)

- Sekvenca gp350 gena EBV (HHV-4)

Human herpesvirus 4 cell-line SNU-1103 (AF172333.1)

Metode

Metoda izolacije virusa i testa virus neutralizacije

Metoda izolacije i neutralizacije virusa vršena je po protokolu opisanom u priručniku OIE (OIE, 2008).

- Prikupljeni uzorci organa i nosnih briseva konja čuvani su u laboratoriji na -20°C do početka ispitivanja;
- Nosni brisevi su odmrzavani i homogenizovani pomoću vorteks mešalice;

- Uzorci organa su sečeni na sitne komade (oko 20 mg) i macerirani u 1 ml fosfatnog slanog pufera pomoću tučka i avana;
- Liofilizovani arhivirani sojevi EHV-1 Katedre za mikrobiologiju su resuspendovani u 1 ml podloge MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma;
- Tečni sadržaj iz uzoraka nosnih briseva i usitnjeni komadići organa u PBS su prelivani u mikrotube zapremine 1,5 ml;
- Uzorci su centrifugovani na 5000 obrtaja/min tokom 10 minuta;
- Dobijeni supernatanti su posle centrifugovanja filtrirani kroz bakteriološke filtere sa promerom pora od 0,22 μm , a preostali talog je zamrzavan na -20°C za upotrebu u metodi ekstrakcije virusne DNK;
- U udubljenja mikroploče sa 24 udubljenja sa ravnim dnom za rast ćelijskih linija razliveno je po 1 ml suspenzije ćelijske linije RK-13 u podlozi MEM sa 10% fetalnog telećeg seruma i mešavinom antibiotika i antimikotika;
- Posle inkubacije od 24 sata na temperaturi od 37°C i u sredini sa 5% CO_2 , podloga je odlivena i po 100 μl uzoraka filtrata nosnih briseva, organa i arhiviranih sojeva EHV-1 su inokulisani na ćelije;
- Posle 1 sat, tj. vremena potrebnog za adsorpciju virusa na ćelije dodata je nova podloga za održavanje - MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma i mešavinom antibiotika i antimikotika u količini od po 1 ml;
- Referentni soj EHV-1 i interni referentni sojevi EHV-4, EHV-2 i EHV-5 inokulisani su u po dva zasebna udubljenja (ukupno 8 udubljenja), dok su dva neinokulisana udubljenja služila kao kontrola tkiva u ogledu;
- Mikroploče su zatvorene, oplepljene parafilmom da bi se sprečila evaporacija podloge i inkubisane na temperaturi od 37°C i u sredini sa 5% CO_2 ;
- Sve mikroploče su svakodnevno proveravane na prisustvo citopatogenog efekta;
- U slučaju da je došlo do citopatogenih promena u inokulisanim ćelijskim linijama pre perioda od 24 sata, smatrano je da je uzrok tome nespecifičan usled citotoksičnog efekta koji nije u vezi sa dejstvom virusa;
- Mikroploče su inkubisane dok CPE nije zahvatio 75% ćelija;
- Posle pojave izraženog CPE, inkubacija je prekidana i materijal sa umnoženim virusom je zamrzavan;

- Čelije sa inokulisanim uzorcima koji nisu doveli do pojave CPE u prvoj pasaži inkubisane su ukupno 7 dana;
- Posle 7 dana, sve ćelije sa inokulisanim uzorcima u kojima nije došlo do pojave CPE zamrzavane su i odmrzavane 3 puta i nove ćelijske linije su ponovo, na prethodno opisani način, inokulisane materijalom iz prve pasaže;
- Utrošeno vreme za ispitivanje svih uzoraka na prisustvo EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 iznosilo je ukupno 21 dan (3 pasaže u trajanju od po 7 dana), a uzorci ispitivanog materijala koji nisu izazvali pojavu CPE posle treće pasaže su proglašavani negativnim na prisustvo virusa;
- Uzorci organa, nosnih briseva kao i arhivirani uzorci EHV-1 Katedre za mikrobiologiju koji su doveli do pojave citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim linijama, ispitivani su metodom neutralizacije virusa na ćelijskoj liniji RK-13 uz korišćenje poliklonskog imunog seruma protiv EHV-1 i EHV-4, titra 1:128;
- Svi supernatanti kultura tkiva poreklom od ispitivanih uzoraka koji su doveli do pojave CPE su titrirani u razređenjima 1:10 u 7 kolona mikrotitracione ploče sa 96 udubljenja na ćelijskoj liniji RK-13, a titar virusa je obračunavan metodom po Karberu;
- Neutralizacija virusa je izvođena tako što su u udubljenjima mikrotitracionih ploča za kulturu tkiva od 96 bunara prethodno napravljena desetostruka razređenja supernatanta ispitivanih uzoraka pomoću MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma kao rastvarača;
- Neutralizacija virusa vršena je u jednom redu razređenja supernatanta dodavanjem iste zapremine imunog seruma u svako udubljenje, dok je kao kontrola služio paralelni red mikroploče sa istim desetostrukim razređenjima ispitivanog materijala u koji je dodat negativan kontrolni serum;
- Posle inkubacije u trajanju od jednog sata na temperaturi od 37°C, u svako udubljenje mikroploče dodato je po 50 µl suspenzije ćelija linije RK-13 u MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma;
- Mikroploče sa ispitivanim uzorcima su zatvorene, oplepljene parafilmom i inkubisane na 37°C uz svakodnevno posmatranje na prisustvo CPE;

- Dokaz neutralizacije virusa poliklonskim imunim serumom protiv virusa EHV-1 i EHV-4 predstavlja izostanak pojave CPE u dva ili više desetostrukih razređenja virusa u poređenju sa kontrolom virusa, tj. redom sa istim razređenjima virusa u kojima virus nije bio neutralizovan i doveo je do pojave CPE.
- Titar neutralizacije virusa izračunavan je metodom po Karberu oduzimanjem logaritamske vrednosti dobijene titracijom virusa sa serumom od logaritamske vrednosti titra kontrolnog virusa.

Metoda direktne imunofluorescencije (TFA)

Metoda direktne imunofluorescencije vršena je prema uputstvu proizvođača FITC konjugata - poliklonskog antiseruma konjugovanog fluorescein izotiocijanatom (FITC):

- Svi izolovani sojevi virusa koji su doveli do pojave citopatogenog efekta inokulisani su na 24 sata staru ćelijsku liniju RK-13 u udubljenjima mikrotitracione ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom;
- Pred inokulaciju virusa, podloga za rast ćelija (MEM sa 10% fetalnog telećeg seruma i mešavinom antibiotika i antimikotika) zamenjena je podlogom za održavanje ćelija - MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma i mešavinom antibiotika i antimikotika;
- U udubljenja mikrotitracione ploče sa ćelijskom linijom je inokulisano po 25 μ l ispitujućeg materijala;
- U po dva udubljenja su inokulisani referentni soj EHV-1 i interni referentni soj EHV-4, a poslednji red je ostao neinokulisan kao negativna kontrola;
- Mikrotitracione ploče su inkubisane u termostatu sa 5% CO₂ do pojave CPE koji zahvata oko 50% ćelija;
- Posle inkubacije, udubljenja mikroploče su isprana fosfatnim slanim puferom (pH 7,2) i sušene na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta;
- Ćelije u udubljenjima mikroploče su fiksirane uz pomoć 100% acetona tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi;

- Posle fiksiranja, ćelije su sušene na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta;
- U svako udubljenje sa fiksiranim ćelijama dodato je po 50 µl radnog rastvora konjugata;
- Mikrotitracione ploče su inkubisane u vlažnoj komori na 37°C tokom 30 minuta;
- Posle inkubisanja, mikroploče su dva puta ispirane fosfatnim slanim puferom (pH 7,2) i treći put destilovanom vodom;
- Mikrotitracione ploče su zatim osušene na sobnoj temperaturi i posmatrane pod vidnim poljem fluorescentnog mikroskopa u mračnoj komori;
- Izražena žuto-zelena fluorescencija u jedru i citoplazmi inokulisanih ćelija predstavljala je dokaz prisustva antigena EHV-1 ili EHV-4 u ispitivanom materijalu.

Metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i Nested multiplex PCR

Preduslov za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i Nested multiplex PCR je ekstrakcija nukleinske kiseline virusa.

Metoda ekstrakcije nukleinske kiseline virusa:

- Kao materijal za ekstrakciju DNK upotrebljeni su ćelijski talog poreklom od uzoraka briseva i organa (prethodno izdvojeni prilikom pripreme istih uzoraka za ispitivanje metodom izolacije virusa i virus neutralizacije) i svi uzorci u kojima je prilikom izolacije virusa na kulturi ćelija zapažena pojava karakterističnog citopatogenog efekta;
- Uzorci za ispitivanje poreklom sa ćelijske kulture su pripremljeni prethodnim mehaničkim skidanjem ćelija sa površine mikrotitracionih ploča u trenutku kada je CPE zahvatao oko 50% ćelija i prebacivanjem suspenzije ćelija u mikrotube zapremine 1,5 ml;
- Suspenzije ćelija su centrifugovane na 5000 obrtaja/min tokom 10 minuta, a dobijeni talog je korišćen u proceduri ekstrakcije DNK;

- Pre početka ekstrakcije, koncentrovani puferi za ispiranje (Wash Buffer 1 i Wash Buffer 2) su rastvoreni pomoću 96-100% etanola, u odnosu navedenom u uputstvu proizvođača kita;

Postupak ekstrakcije virusne DNK iz ispitujućeg materijala izvršen je prema uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju DNK, odnosno prema navedenom protokolu:

- U svaku mikrotubu sa talogom ćelija je dodato 180 µl rastvora za digestiju (Digestion Solution) i 20 µl proteinaze K, a dobijena suspenzija je homogenizovana pomoću vorteks mešalice;
- Navedena suspenzija je inkubisana u vodenom kupatilu na 56°C do potpune lize tkiva (tokom 1 do 2 h);
- Posle inkubacije u sve mikrotube je dodato po 20 µl RN-aze A, a smeša je homogenizuje pomoću vorteks mešalice i inkubisana tokom 10 min na sobnoj temperaturi;
- U sve mikrotube je dodato po 200 µl rastvora za liziranje (Lysis Solution) i mešavina je homogenizovana na vorteks mešalici;
- U sadraj mikrotuba je zatim sipano po 400 µl 50% etanola i smeša je homogenizovana na vorteks mešalici;
- Pripremljeno lizirano tkivo je pomoću mikropipete prebačeno u kolone za prečišćavanje DNK ubačene u posebne mikrotube bez poklopca. Ovakve mikrotube su centrifugovane 1 min na 7500 obrtaja/min;
- Mikrotube sa profiltrovanim sadržajem su odbačene i kolone za prečišćavanje DNK su stavljene u nove mikrotube bez poklopca;
- U kolone za prečišćavanje DNK dodato je po 500 µl pufera za ispiranje 1 (Wash Buffer 1), sadržaj je centrifugovan tokom 1 min na 8700 obrtaja/min, profiltrovana tečnost je odlivena iz mikrotuba, a kolone za prečišćavanje DNK su vraćene u iste mikrotube bez poklopca;
- U kolone za prečišćavanje DNK je dodato po 500 µl pufera za ispiranje 2 (Wash Buffer 2) i mikrotube su centrifugovane 3 min na maksimalnoj brzini centrifuge od 14000 obrtaja/min;

- U laminarnoj komori su odbačene mikrotube bez poklopca u kojima se nalazio profiltrovani sadržaj, a kolone za prečišćavanje DNK su prebačene u sterilne mikrotube sa poklopcem od 1,5 ml;
- U kolone za prečišćavanje DNK je dodato po 200 µl pufera za prečišćavanje (Elution Buffer) direktno na silikatnu membranu uz oprez da se ista ne probuši vrhom mikropipete;
- Posle inkubacije od 2 min na sobnoj temperaturi i centrifugovanja 1 min na 8700 obrtaja/min, u laminarnoj komori su odbačene kolone za prečišćavanje DNK, a mikrotube sa dobijenim ekstraktom DNK su odmah zamrzavane na -20°C.

Za pojedine uzorke, naročito uzorke slezine i submandibularnih limfnih čvorova, sadržaj je centrifugovan više puta dok tečnost u potpunosti ne prodje kroz silikatnu membranu kolona za prečišćavanje DNK. Posle svake faze tečnost nije smela da ostaje u kolonama već je postupak ekstrakcije nastavljan samo kada je sva tečnost prošla kroz membranu.

Priprema reakcione smeše i izvođenje metode Nested multiplex PCR:

S obzirom da se metoda Nested multiplex PCR izvodi u dve faze, pripremane su dve reakcione smeše sa različitim parovima prajmera (Tabela 5.). U prvoj fazi su kao ispitivani uzorci korišćeni pripremljeni DNK ekstrakti, dok su u drugoj fazi uzorke predstavljali PCR produkti iz prve faze. Pre pripreme reakcione smeše napravljen je radni rastvor svih prajmera, odnosno rastvoreni su 10x pomoću vode za PCR.

Tabela 5. Sastav reakcione smeše za ispitivanje jednog uzorka u prvoj i drugoj fazi Nested multiplex PCR

	Supstanca	Količina
1. faza	DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
	Voda za PCR (Water, nuclease-free)	4,5 µl
	EHV2L1 (10 µM)	1,5 µl
	EHV2R1 (10 µM)	1,5 µl
	EHV5L1 (10 µM)	1,5 µl
	EHV5R1 (10 µM)	1,5 µl
	FC2 (10 µM)	1,5 µl
	RC (10 µM)	1,5 µl
2. faza	DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
	Voda za PCR (Water, nuclease-free)	4,5 µl
	EHV2L2 (10 µM)	1,5 µl
	EHV2R2 (10 µM)	1,5 µl
	EHV5L1 (10 µM)	1,5 µl
	EHV5R2 (10 µM)	1,5 µl
	FC3 (10 µM)	1,5 µl
	R1 (10 µM)	1,5 µl
	R4 (10 µM)	1,5 µl

Analiza svih uzoraka u prvoj i drugoj fazi Nested multiplex PCR obavljena je u zapreminama od po 30 µl, odnosno u prvoj fazi je pripremano 26 µl smeše i 4 µl uzorka ekstrahovane DNK, a u drugoj fazi 27,5 µl smeše i 2,5 µl odgovarajućeg PCR produkta iz prve faze. Pored analiziranih ekstrakata DNK, u svaku reakciju uključene su pozitivne kontrole (DNK ekstrakti referentnih sojeva virusa) i negativna kontrola (umesto ekstrahovane DNK dodata je voda za PCR). Sve analize su obavljene u PCR mikrotubama od 0,2 ml. Pripremljene smeše sa uzorcima su postavljene u termoprocetor za izvođenje PCR, a korišćen je isti termalni protokol za obe faze Nested multiplex PCR (Tabela 6.).

Tabela 6. Termalni protokol za izvođenje 1. i 2. faze Nested multiplex PCR sa prajmerima za deo gena koji kodira glikoprotein B EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 (Wang i sar., 2007)

Korak	Temperatura	Vreme	Ponavljanje
Inicijalna denaturacija	94°C	5 min	1 put
Denaturacija	94°C	1 min	30 puta
Hibridizacija prajmera	60°C	1 min	
Ekstenzija	72°C	1 min	
Finalna ekstenzija	72°C	7 min	1 put

Priprema reakcione smeše i izvođenje metode lančane reakcije polimeraze (PCR) – amplifikacija delova gena ORF30 i ORF68 EHV-1:

Posle analize svih pripremljenih ekstrakata na prisustvo EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 metodom Nested multiplex PCR, ekstrakti DNK kod kojih je utvrđeno prisustvo EHV-1 kao i ekstrakti DNK arhiviranih sojeva EHV-1 su analizirani primenom dva različita PCR termalna protokola sa parovima prajmera koji amplifikuju delove gena ORF30 i ORF68 navedenog virusa. Odnos supstanci u obe reakcione smeše je bio identičan, tj. analize su vršene u zapreminama od po 25 µl (20 µl smeše i 5µl DNK ekstrakta) u mikrotubama od 0,2 ml (Tabela 7.). Pored analiziranih ekstrakata DNK, u svaku reakciju uključene su pozitivna kontrola (DNK ekstrakt referentnog soja virusa) i negativna kontrola (umesto ekstrahovane DNK dodata je voda za PCR).

Tabela 7. Sastav reakcione smeše za ispitivanje jednog uzorka metodom PCR

Supstanca	Količina
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Voda za PCR (Water, nuclease-free)	4,5 µl
F (Forward) prajmer	1,5 µl
R (Reverse) prajmer	1,5 µl

Termalni protokoli korišćeni za izvođenje PCR u cilju amplifikacije delova gena ORF30 i ORF68 EHV-1 su navedeni u Tabelama 8. i 9.

Tabela 8. Termalni protokol za PCR sa prajmerima dela gena ORF30 EHV-1 (Negussie i sar., 2015)

Korak	Temperatura	Vreme	Ponavljjanje
Inicijalna denaturacija	95°C	15 min	1 put
Denaturacija	94°C	1 min	34 puta
Hibridizacija prajmera	55,5°C	1 min	
Ekstenzija	72°C	1 min	
Finalna ekstenzija	72°C	10 min	1 put

Tabela 9. Termalni protokol za PCR sa prajmerima dela gena ORF68 EHV-1 (modifikacija protokola Damiani i sar., 2014)

Korak	Temperatura	Vreme	Ponavljjanje
Inicijalna denaturacija	95°C	3 min	1 put
Denaturacija	94°C	0,5 min	30 puta
Hibridizacija prajmera	50°C	1 min	
Ekstenzija	72°C	1 min	
Finalna ekstenzija	72°C	6 min	1 put

Metoda izvođenja elektroforeze PCR produkata

Vizuelizacija produktata dobijenih primenom metoda Nested multiplex PCR i PCR koji su razdvajani prema veličini (broju baznih parova - bp) izvršena je primenom elektroforeze u agaroznom gelu. Za elektroforezu je pripremljen radni rastvor TAE pufera pomoću destilovane vode, a uvek isti rastvor TAE pufera je upotrebljavan za pravljenje gela sa 2% agaroze obojenog etidijum bromidom. Agarozni gel je pripreman topljenjem agaroze u prahu u radnom rastvoru TAE pufera uz dodavanje 0,5 μ l etidijum bromida po mililitru gela neposredno pred razlivanje u držač kadice za elektroforezu.

Pre mešanja boje za PCR produkte sa dobijenim PCR proizvodima, pravljen je radni rastvor boje pomoću dejonizovane vode. Posle hlađenja agaroznog gela, u jedan bazen dodavano je 3 μ l obojenog DNK markera koji se sastoji iz fragmenata poznate veličine i služi kao vizuelni pokazatelj za procenu veličine traženog PCR produkta. U preostale bazenčice agaroznog gela dodavano je po 5 μ l PCR produkata prethodno pomešanih sa bojom.

Elektroforeza je izvođena pod naponom struje od 120 V, pri jačini struje od 30 mA tokom 45 minuta. Posle završene elektroforeze, gel sa ispitivanim uzorcima je postavljan na transiluminator i posmatran pod ultraljubičastim (UV) svetlom. Pozitivna reakcija se ispoljavala kao traka fluorescentno narandžaste boje u širini bazenčića na gelu, a na mestu koje odgovara veličini, tj. broju baznih parova traženog PCR proizvoda, u poređenju sa elektroforeziranim fragmentima DNK markera, odnosno PCR produkata pozitivne kontrole. Prilikom analize rezultata metode Nested multiplex PCR bio je očekivan nalaz više traka koje ukazuju na više umnoženih delova gena različite veličine.

Metoda prečišćavanja DNK iz agaroznog gela

U cilju pripreme umnoženog dela gena ORF68 konjskog herpesvirusa 1 za sekvenciranje, odgovarajući fragmenti od oko 600 bp su posle elektroforeze isecani iz agaroznog gela, a DNK je prečišćavana pomoću kita PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Velika Britanija) po uputstvu proizvođača.

- Radni rastvor pufera W1 u kitu je pripremljen dodavanjem etanola prema uputstvu proizvođača;
- Termalni blok je podešen na 50°C;
- Isečci gela su izmereni na laboratorijskoj vagi i stavljeni u zasebne mini tube;
- Dodat je pufer za rastvaranje gela - Gel Solubilization Buffer (L3) u odnosu 3:1 u svaku mini tubu;
- Mini tube su inkubisane u termalnom bloku na 50°C tokom 15 minuta sa povremenim mućkanjem;
- Rastvoreni uzorci gela su prebacivani u kolone za prečišćavanje - Quick Gel Extraction Column inside ubačene u tubu za ispiranje;
- Kolone su centrifugirane na 14000 obrtaja/min tokom jednog minuta, filtrat je odbačen, a kolone vraćene u tubice za ispiranje;
- Dodato je 500 µL pufera za ispiranje - Wash Buffer (W1) u svaku kolonu;
- Kolone su centrifugirane na 14000 obrtaja/min tokom jednog minuta, filtrat je odbačen, a kolone vraćene u tubice za ispiranje;
- Kolone su centrifugirane na maksimalnoj brzini centrifuge tokom 1-2 minuta, filtrat je odbačen;
- Kolone su prebačene u tube za prikupljanje DNK i dodato je po 50 µL Elution pufera (E5) u središte svake kolone;
- Tube su inkubisane na sobnoj temperaturi tokom 1 minuta;
- Kolone su centrifugirane na 14000 obrtaja/min tokom jednog minuta, filtrat je čuvan u tubama na -20°C do postupka sekvenciranja.

Metoda prečišćavanja PCR produkata

Pre izvođenja metode direktnog sekvenciranja izvršeno je prečišćavanje dobijenog DNK produkta primenom kita za prečišćavanje Mini Elute purification kit (Qiagen, SAD) po uputstvu proizvođača.

Procedura prečišćavanja PCR produkata:

- Radni rastvori svih pufera u kitu su pripremljeni dodavanjem etanola prema uputstvu proizvođača;
- U PCR produkte dodat je fosfatni slani pufer (PBS) u odnosu 1:5;

- Smeša je homogenizovana na vorteks mešalici u trajanju od nekoliko sekundi, a zatim prebacivana u mini kolone za filtriranje pomoću centrifuge;
- Centrifugiranje uzoraka izvršeno je na 8000 obrtaja/min tokom 1 minuta;
- Filtrati su odbačeni, a u mini kolone je dodato 750 µl PE pufera za prečišćavanje;
- Sadržaj mini kolona je ponovo centrifugovan na 8000 obrtaja/min tokom 1 minuta;
- Filtrati su odbačeni, a kolone centrifugirane još 1 minut na 8000 obrtaja/min u cilju potpunog odstranjivanja PE pufera sa membrane;
- Mini kolone su prebačene u nove tube za sakupljanje prečišćene DNK;
- U svaku mini kolonu je dodato po 10 µl EB pufera (Elution Buffer), a mini kolone su zatim inkubisane 1 minut na sobnoj temperaturi;
- Uzorci su zatim centrifugovani još 1 minut na 8000 obrtaja/min i dobijena je prečišćena dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) spremna za sekvenciranje;
- Uzorci prečišćene DNK su odloženi i čuvani na -20°C do postupka sekvenciranja.

Metoda sekvenciranja PCR produkata

Jedan deo uzoraka je poslat na uslužno sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratory, Amsterdam, Holandija. Ostatak uzoraka je sekvenciran metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru. Sastav i termalni protokol izvođenja cycle sequencing PCR reakcije su navedeni u Tabelama 10 i 11.

Tabela 10. Sastav reakcione smeše za izvođenje cycle sequencing PCR reakcije

Supstanca	Količina
Dye mix	2 μ l
Dye Buffer	2 μ l
Prajmer (forward ili reverse)*	1,2 μ l
H ₂ O	1,8 μ l
Prečišćeni PCR produkt	3 μ l
	Σ 10 μl

* Istovremeno za svaki uzorak je pojedinačno pripremana ista reakciona smeša, s tim što je umesto „forward“ prajmera smeša sadržavala „reverse“ prajmer.

Tabela 11. Termalni protokol za cycle sequencing PCR

Temperatura	Vreme	Ponavljjanje
96°C	2 min	1 put
96°C	10 sekundi	40 puta
50°C	5 sekundi	
60°C	4 min	

Pripremna faza pre postupka sekvenciranja podrazumevala je dodatno prečišćavanje PCR produkata izopropanolom i denaturaciju formamidom:

- U svaku minutu sa prečišćenom DNK je dodato po 80 μ l izopropanola (75%), a smeša je zatim inkubisana u mraku na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta;
- Posle završene faze inkubisanja, smeša je centrifugovana 45 minuta na 2000 obrtaja/min;
- Supernatant je odliven, a minute su centrifugirane 2 minuta na 7000 obrtaja/min;
- Tube su zatim osušene u mračnoj komori na sobnoj temperaturi tokom 15 do 30 minuta;

- Osušeni proizvod je zatim denaturisan dodavanjem 10 µl formamida, a tube sa formamidom su inkubisane u cilju denaturacije 2 minuta na 95°C i 2 minuta na 4°C;
- Sadržaj minutuba je prebačen u strip tubice za sekvenciranje čime je PCR produkt pripremljen za postupak sekvenciranja.
- Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je Sequence Analysis 5.1 softwer (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) u kome su nukleotidne sekvence predstavljene u vidu elektroferograma.

Utvrđivanje homologije nukleotidnih sekvenci odabranih sojeva EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 sa sekvencama navedenih virusa registrovanim u banci gena

Molekularna i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci izvršena je u programskom paketu MEGA verzija 7.0 (*eng.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis). MEGA program je bionformatički kompjuterski program koji pored programa za poravnanje sekvenci Clustal W, sadrži programe za konstruisanje filogenetskih stabala, pretragu baze podataka (PubMed, BLAST), procenu stope mutacija, testiranje evolutivnih hipoteza i određivanje genetičkih distanci.

Dobijene nukleotidne sekvence delova gB gena EHV-1, EHV-2, EHV-4 i EHV-5 u vidu elektroferograma analizirane su u oba pravca, a zatim su primenom MEGA 7.0 upoređivane u 5' i 3' pravcu. Na taj način dobijena je kompletna (konsenzus) sekvenca, koja je u cilju identifikacije dalje analizirana. Upotrebom BLAST programa (*eng.* Basic Local Aligment Search Tool), konsenzus sekvence su poređene sa sekvencama odgovarajućih regiona genoma EHV-1, EHV-2, EHV-4 i EHV-5 dostupnim u GenBank bazi podataka, odnosno, NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) u cilju utvrđivanja sličnosti ili razlika između njih.

Određivanje redosleda nukleotida u regionima ORF30 i ORF68 genoma EHV-1

Konsenzus sekvence delova gena ORF30 i ORF68 su primenom programa BioEdit 7.2.5 poređene sa odgovarajućim referentnim sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka.

Izrada filogenetskih stabala odabranih i izolovanih sojeva herpesvirusa konja sa teritorije Republike Srbije i Republike Srpske

Filogenetska analiza je izvršena na osnovu automatski kreiranog stabla pomoću ML (*eng.* Maximum Likelihood) metode. Za pouzdanost nodusa dendograma odnosno statističku podršku korišćena je metoda pseudo ponavljanja (bootstrap) na osnovu 1000 permutacija. Pored toga u konstrukciji dendograma izabrani su sledeći parametri: tip supstitucije (nukleotid); opcija kompletne delecije.

5. REZULTATI

Rezultati izolacije virusa

Ispitivano je 112 uzoraka nosnih briseva konja poreklom sa ergela i iz privatnog sektora, 100 uzoraka organa (submandibularni limfni čvorovi, slezina, produžena moždina, kičmena moždina) prikupljenih od 25 konja iz klanice, kao i 5 arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Čelijska linija RK-13 u koju je inokulisan ispitujući materijal je inkubisana na 37°C u prisustvu 5% CO₂, a prisustvo citopatogenog efekta (CPE) je praćeno svakodnevno tokom 7 dana. Uzorci ispitivanog materijala koji prilikom prve pasaže kroz navedene čelijske linije nisu dali citopatogeni efekat, ponovo su inokulisani u iste radi druge pasaže. Pre svake naredne inokulacije uzoraka u čelijske kulture u daljim pasažama, vršeno je njihovo trostruko odmrzavanje i zamrzavanje. Pri negativnom nalazu u drugoj pasaži, postupak je ponovljen još jedanput tako da su obavljene 3 pasaže u trajanju od po 7 dana. Citopatogeni efekat referentnih sojeva virusa je dobijen prilikom prve pasaže. Od ukupno 217 inokuliranih uzoraka, pojava karakterističnog citopatogenog efekta zabeležena je u 84 uzorka (38,71%), pri čemu je 51 izolat bio poreklom iz organa, 28 izolata poreklom iz nosnih briseva konja, dok su preostalih 5 predstavljali arhivirane sojeve EHV-1 Katedre za mikrobiologiju.

Uzorci arhiviranih sojeva EHV-1

Prilikom izolacije na čelijskoj liniji RK-13 do pojave citopatogenog efekta došlo je u prvoj pasaži svih 5 inokuliranih uzoraka (100%) arhiviranih sojeva EHV-1 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Arhivirani sojevi EHV-1 Katedre za mikrobiologiju su obeleženi kao D1, D2, D3, D4 i D5.

Uzorci organa

Tokom izolacije virusa iz ukupno 100 organa na čelijskoj liniji RK-13 do pojave CPE došlo je u ukupno 51 uzorku (51%), od čega u prvoj pasaži u 19 (37,25%), u drugoj pasaži u 24 (47,06%) i posle treće pasaže u još 8 (15,69%) uzoraka. Navedeni

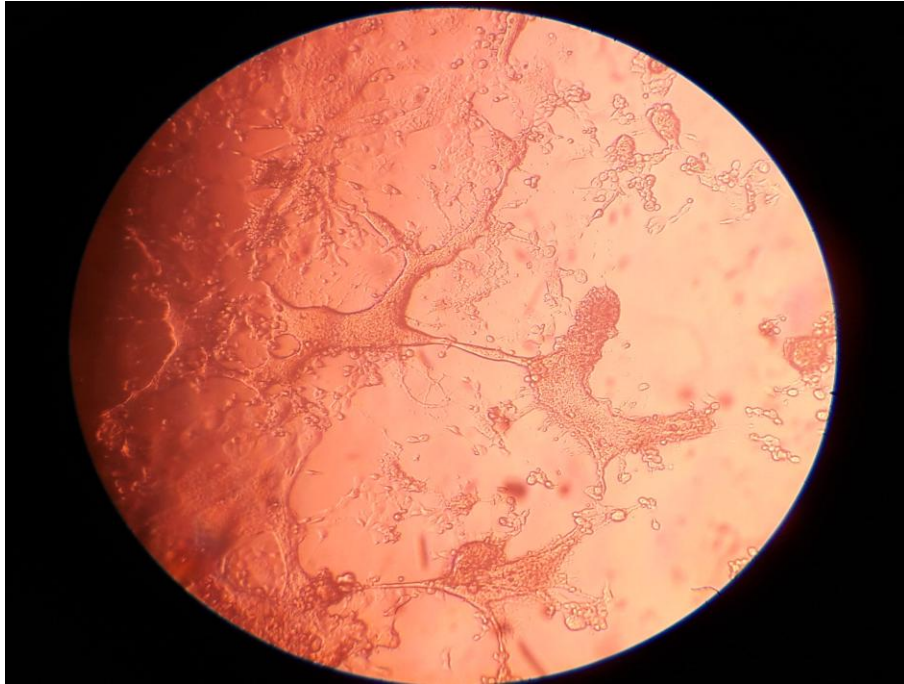
uzorci su obeležavani prema broju konja (1 do 25) uz oznake KM za izolate iz uzoraka kičmene moždine, PM za izolate iz produžene moždine, S za izolate iz slezine i LN za izolate iz uzoraka submandibularnih limfnih čvorova. Najveći broj izolata poticao je iz uzoraka kičmene moždine i slezine (po 15), zatim iz submandibularnih limfnih čvorova (ukupno 13) i na kraju iz produžene moždine (ukupno 8).

Uzorci nosnih briseva

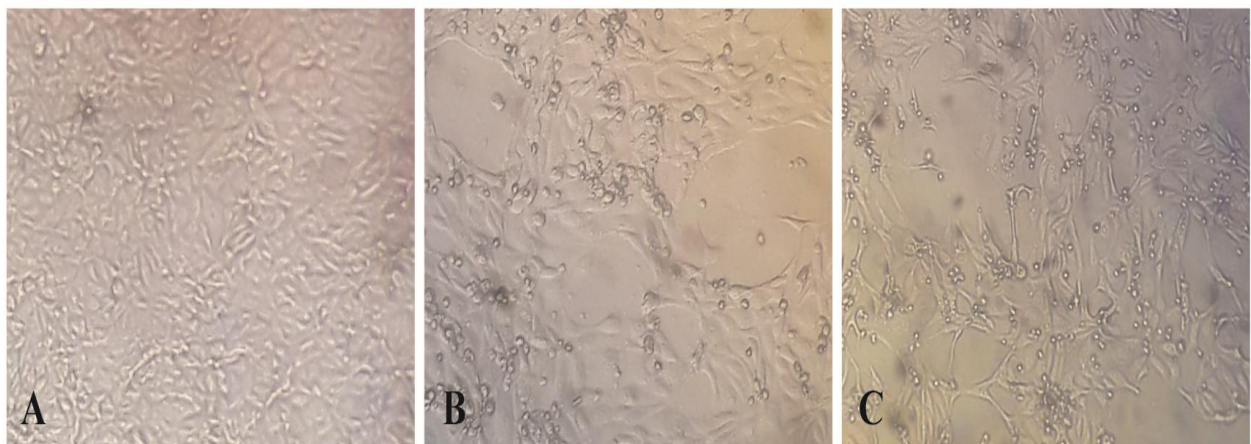
Od ukupno 112 uzoraka briseva, prilikom izolacije virusa došlo je do pojave CPE u ćelijskim linijama RK-13 posle inokulacije 28 uzoraka (25%) i to kod 8 inokulisanih kultura ćelija (28,57%) posle prve, a kod 20 (71,43%) posle druge pasaže ispitivanog materijala. Svi pozitivni uzorci su bili poreklom od nosnih briseva konja iz Republike Srpske. Navedeni uzorci su označeni sa dva broja pri čemu prva cifra označava grupu životinja, a druga redni broj uzorka uz oznake MG (nosni brisevi konja iz opštine Mrkonjić Grad), odnosno V (nosni brisevi konja sa ergele „Vučijak“).



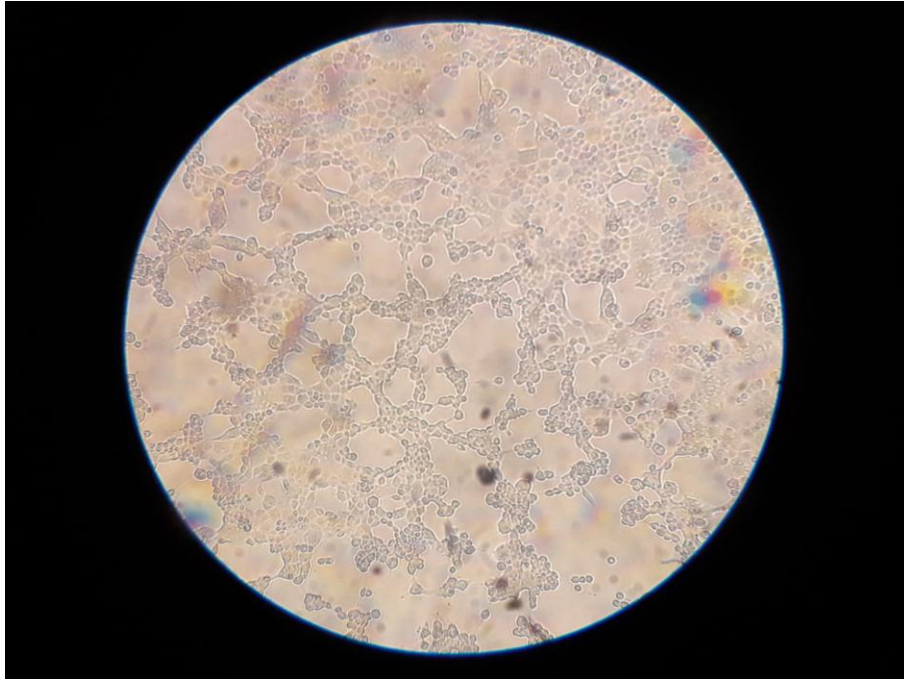
Slika 7. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 48 sati od inokulacije soja D4 konjskog herpesvirusa 1 u 1. pasaži



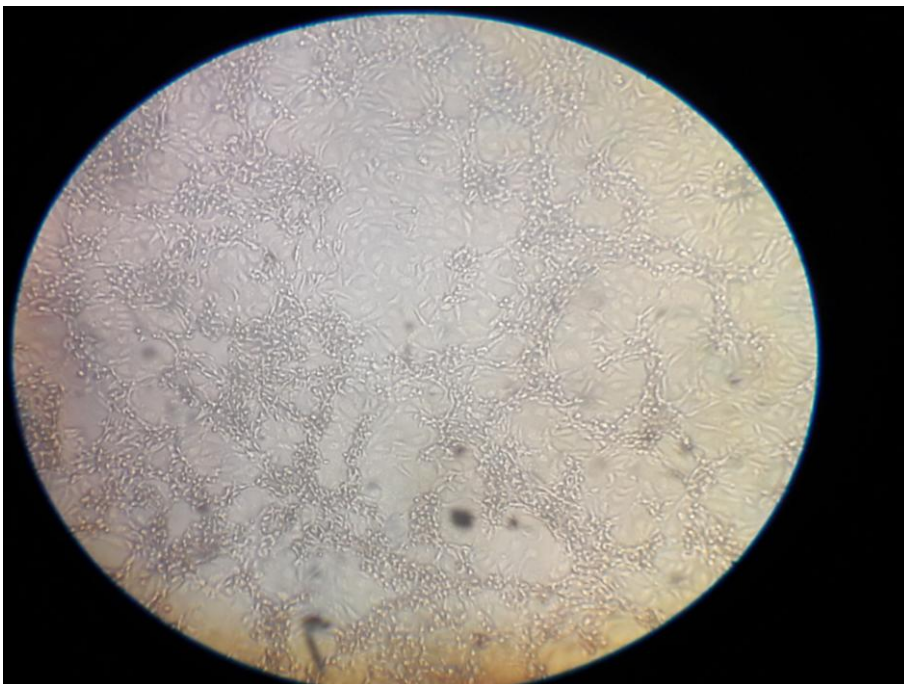
Slika 8. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 72 sata od inokulacije soja 25KM konjskog herpesvirusa 1 u 3. pasaži



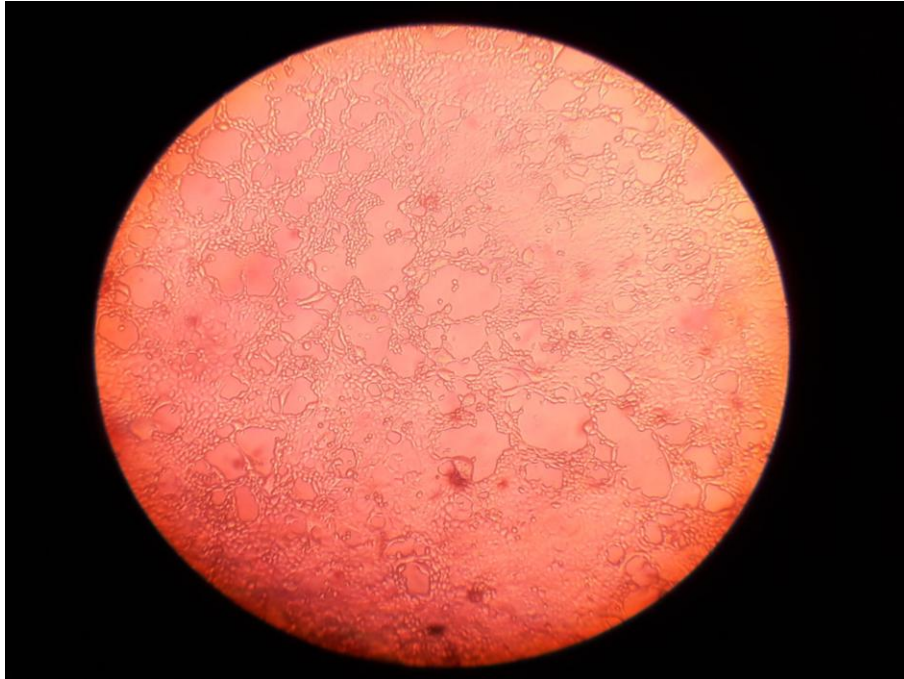
Slika 9. Neinokulisana ćelijska linija RK-13 (A); Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 72 sata od inokulacije referentnih sojeva EHV-1 (B) i EHV-5 (C)



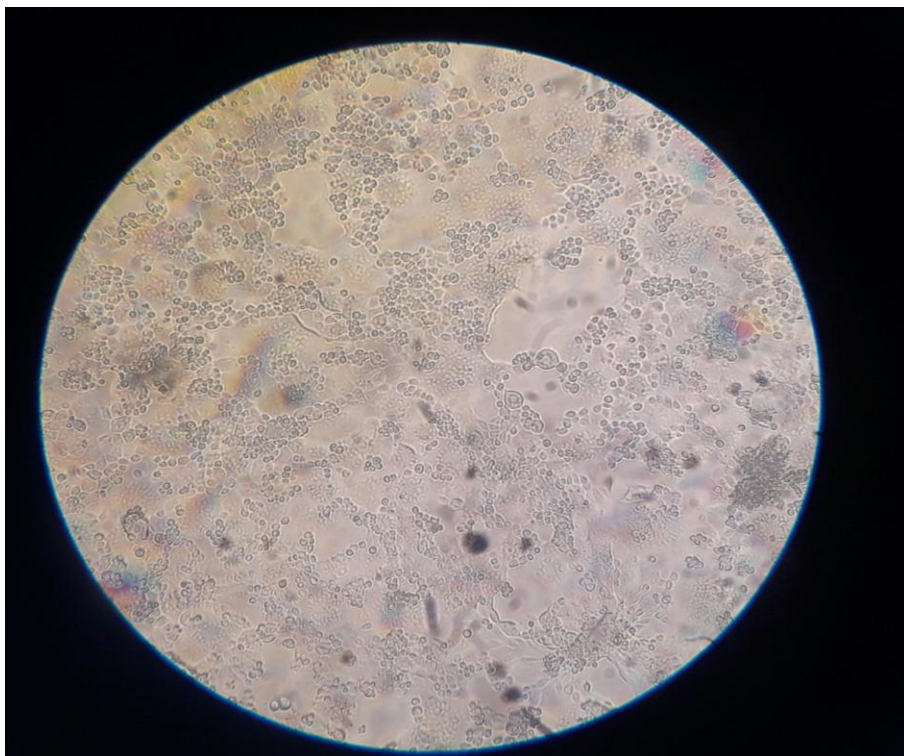
Slika 10. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 48 sati od inokulacije soja 3S konjskog herpesvirusa 1 u 2. pasaži



Slika 11. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 48 sati od inokulacije soja 22MG konjskog herpesvirusa 1 u 1. pasaži



Slika 12. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 72 sata od inokulacije soja 16S konjskog herpesvirusa 5 u 3. pasaži



Slika 13. Citopatogeni efekat (CPE) u ćelijskoj liniji RK-13 posle 72 sata od inokulacije soja 13MG konjskog herpesvirusa 5 u 2. pasaži

Rezultati identifikacije izolovanih sojeva EHV-1/EHV-4 primenom testa virus neutralizacije

U testu virus neutralizacije prisustvo EHV-1, odnosno EHV-4 potvrđeno je u 47 uzoraka organa (92,16%), dok su rezultati VN testa za preostala četiri izolovana soja bili negativni. Navedena četiri izolata su poreklom iz dva uzorka submandibularnih limfnih čvorova, odnosno dva uzorka slezine konja: 16LN, 16S, 23LN i 23S, Ispitivanjem izolovanih sojeva virusa poreklom iz uzoraka nosnih briseva konja primenom VN testa, prisustvo EHV-1/EHV-4 potvrđeno je u 25 uzoraka (89,29%) pri čemu prisustvo navedenih virusa nije utvrđeno u tri preostala uzorka. Identifikacija svih pet uzoraka arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju je potvrđena primenom izolacije virusa na kulturi tkiva i testom virus neutralizacije. Neutralizacioni titri izolovanih sojeva virusa dobijeni u testu virus neutralizacije navedeni su u Tabelama 12., 13. i 14.

Tabela 12. Titri neutralizacije izolata arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju

Oznaka soja	Titar neutralizacije
D1	$3,5\log_{10}$
D2	$2\log_{10}$
D3	$2\log_{10}$
D4	$4\log_{10}$
D5	$3\log_{10}$

Tabela 13. Titri neutralizacije izolata iz uzoraka organa

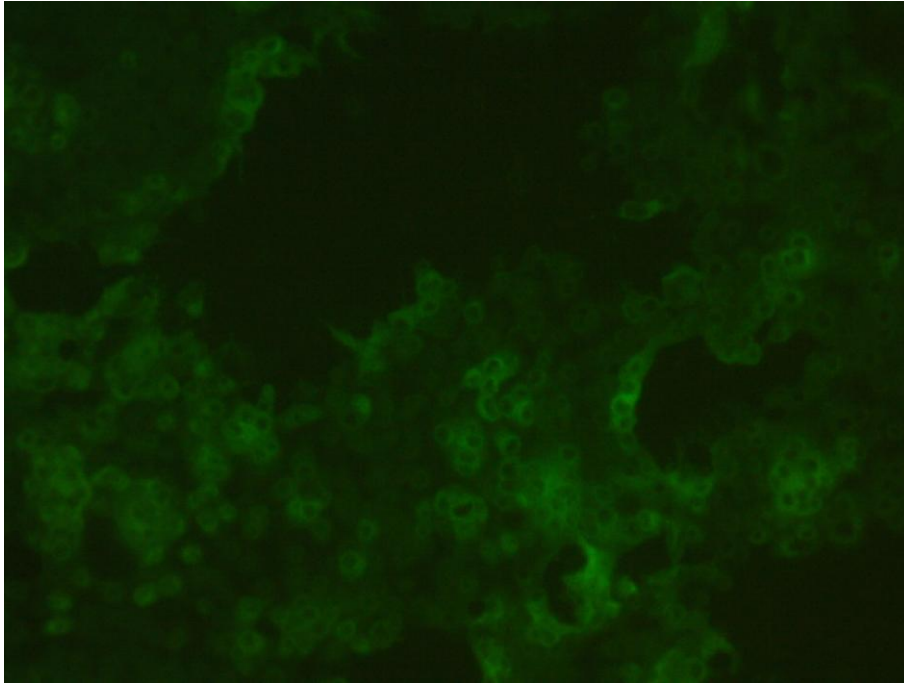
Oznaka soja	Titar neutralizacije	Oznaka soja	Titar neutralizacije
1KM	$2\log_{10}$	18LN	$3\log_{10}$
1LN	$3\log_{10}$	18S	$3\log_{10}$
1S	$3\log_{10}$	19KM	$3,5\log_{10}$
2KM	$2,5\log_{10}$	19PM	$2\log_{10}$
2LN	$3\log_{10}$	19LN	$4\log_{10}$
2S	$3\log_{10}$	19S	$4\log_{10}$
3PM	$4,5\log_{10}$	20KM	$3\log_{10}$
3LN	$2\log_{10}$	20PM	$2\log_{10}$
3S	$3\log_{10}$	20LN	$4\log_{10}$
4KM	$2,5\log_{10}$	20S	$3\log_{10}$
5KM	$2,5\log_{10}$	21KM	$5\log_{10}$
7KM	$3\log_{10}$	21PM	$5\log_{10}$
8KM	$2,5\log_{10}$	21LN	$6\log_{10}$
12S	$4\log_{10}$	21S	$5\log_{10}$
15KM	$2,5\log_{10}$	22LN	$6\log_{10}$
15S	$5\log_{10}$	22S	$2\log_{10}$
16KM	$4,5\log_{10}$	23KM	$5\log_{10}$
16PM	$3\log_{10}$	23PM	$5\log_{10}$
17KM	$2\log_{10}$	24LN	$5\log_{10}$
17PM	$2\log_{10}$	24S	$4\log_{10}$
17LN	$3\log_{10}$	25KM	$5\log_{10}$
17S	$2,5\log_{10}$	25LN	$6\log_{10}$
18KM	$2\log_{10}$	25S	$6\log_{10}$
18PM	$2\log_{10}$		

Tabela 14. Titri neutralizacije izolata iz nosnih briseva

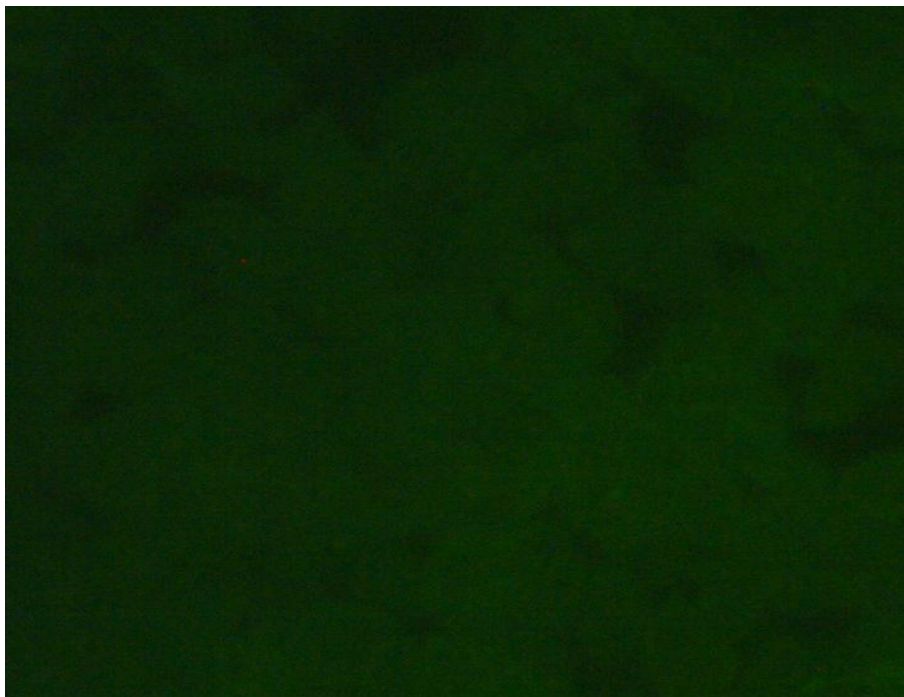
Oznaka soja	Titar neutralizacije	Oznaka soja	Titar neutralizacije
21MG	4log ₁₀	31V	3log ₁₀
22MG	4log ₁₀	32V	3,5log ₁₀
23MG	4log ₁₀	33V	2log ₁₀
24MG	2,5log ₁₀	34V	3log ₁₀
25MG	3log ₁₀	35V	3log ₁₀
26MG	2log ₁₀	44V	2,5log ₁₀
27MG	3log ₁₀	45V	2log ₁₀
28MG	4log ₁₀	46V	2log ₁₀
11V	4log ₁₀	53V	3log ₁₀
12V	3log ₁₀	56V	3log ₁₀
13V	3log ₁₀	57V	3log ₁₀
14V	2,5log ₁₀	59V	3log ₁₀
15V	3log ₁₀		

Rezultati identifikacije izolovanih sojeva EHV-1/EHV-4 metodom direktne imunofluorescencije

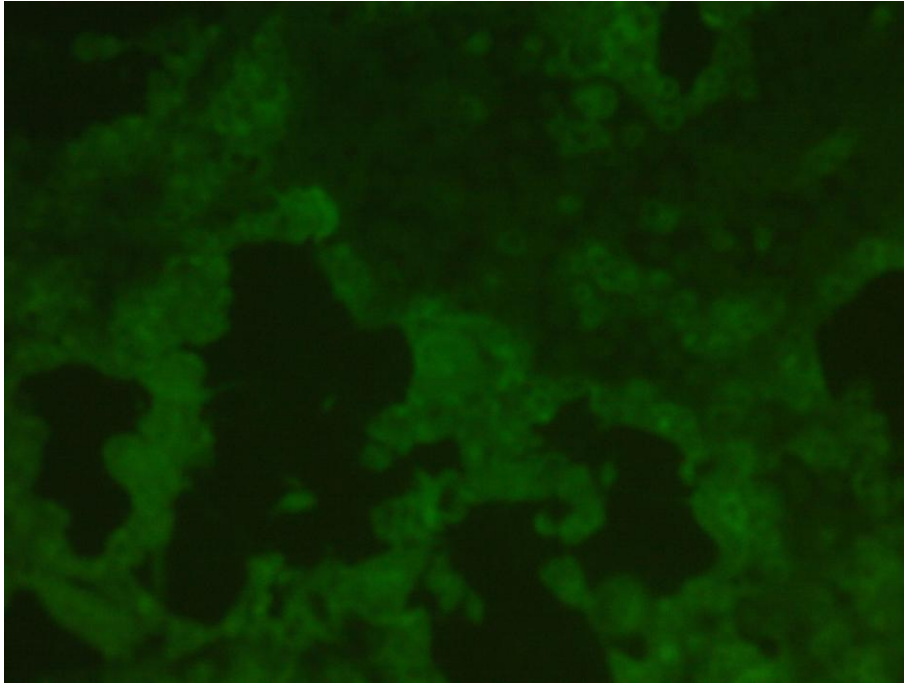
Svih 79 uzorka suspektnog materijala uključujući i 5 uzoraka arhiviranih sojeva EHV-1 koji su izazivali pojavu citopatogenog efekta u ćelijskoj liniji RK-13 ispitivano je metodom direktne imunofluorescencije sa konjugatom poliklonskih antitela protiv EHV-1/EHV-4 obeleženih fluorescein izotiocijanatom. Metodom direktne imunofluorescencije potvrđeno je prisustvo antigena virusa EHV-1/EHV-4 u ćelijskim linijama RK-13 inokulisanim sa 72 uzoraka izolovanih sojeva EHV-1/EHV-4 prethodno identifikovanih primenom VN testa. Preostalih 7 izolata (4 izolata iz organa i 3 izolata iz nosnih briseva) dalo je negativan rezultat u testu direktne imunofluorescencije. Pored toga u ćelijskim linijama pojedinačno inokulisanim arhiviranim sojevima EHV-1 utvrđeno je prisustvo jasno izražene žuto-zelene fluorescencije u jedru i citoplazmi ćelija kulture tkiva.



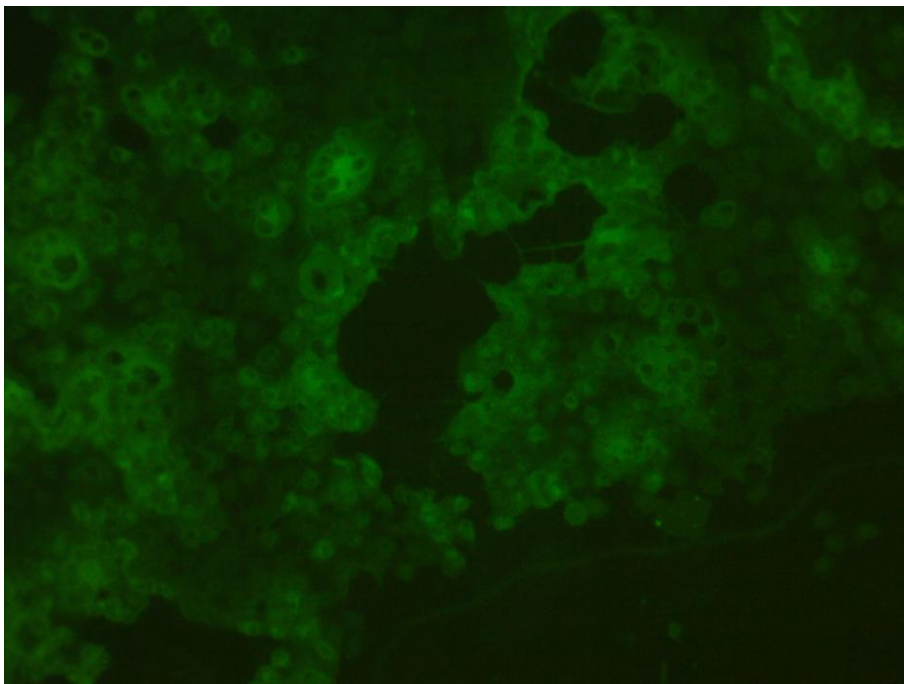
Slika 14. Pojava fluorescencije posle 72 sata od inokulacije referentnog soja EHV-1 u ćelijsku liniju RK-13



Slika 15. Neinokulisana ćelijska linija RK-13



Slika 16. Pojava fluorescencije posle 72 sata od inokulacije soja D1 u ćelijsku liniju RK-13



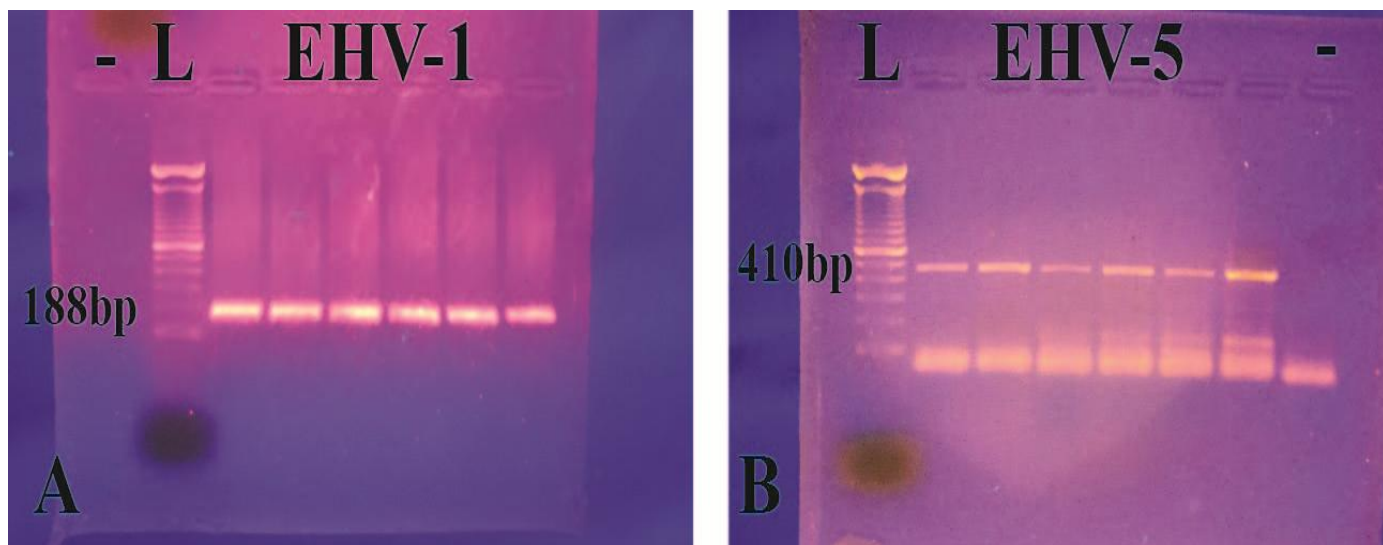
Slika 17. Pojava fluorescencije posle 72 sata od inokulacije soja 12S u ćelijsku liniju RK-13

Rezultati identifikacije izolata konjskih herpesvirusa primenom metode Nested multiplex PCR

Sva 84 ispitivana uzorka koja su izazivala pojavu karakterističnog citopatogenog efekta (CPE) u inokulisanim ćelijskim linijama RK-13 je ispitivano primenom metode Nested multiplex PCR radi identifikacije izolovanih sojeva konjskih herpesvirusa. Kada je CPE zahvatio oko 50% ćelija, iste su skidane su pomoću skrejpera i zajedno sa podlogom prebacivane u sterilne mini tube. Posle centrifugovanja navedene suspenzije 10 minuta na 5000 obrtaja/min odbačen je supernatant, a ekstrakcija virusne DNK je vršena iz preostalog taloga.

Primenom metode Nested multiplex PCR je pored precizne diferencijacije EHV-1 i EHV-4 koja nije bila moguća primenom metoda imunofluorescencije i VN testa, omogućena i detekcija izolata EHV-5 i to u onim uzorcima koji su bili negativni posle izvođenja navedenih standardnih metoda. Pored toga, primenom pomenute molekularne dijagnostičke metode je dodatno potvrđen identitet arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Posle izvođenja Nested multiplex PCR izvršena je definitivna identifikacija ukupno 47 izolata virusa poreklom iz organa konja, odnosno 25 izolata poreklom iz nosnih briseva konja koji su prethodno utvrđeni primenom VN testa i metode imunofluorescencije (Slika 18A). U svim navedenim uzorcima detektovana je nukleinska kiselina EHV-1. U ukupno 7 izolata, tj. 4 izolata poreklom iz organa konja (dva izolata iz submandibularnih limfnih čvorova i dva izolata iz slezine) i 3 izolata poreklom iz nosnih briseva konja detektovana je nukleinska kiselina konjskog herpesvirusa 5 (Slika 18B). Izolati konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz organa su doveli do pojave CPE na ćelijskoj liniji RK-13 u 3. pasaži, dok je citopatogeni efekat kod uzoraka poreklom iz nosnih briseva ustanovljen posle druge pasaže suspektog materijala. Nukleinske kiseline konjskog herpesvirusa 4 i konjskog herpesvirusa 2 nisu utvrđene ni u jednom uzorku jer navedeni virusi nisu izolovani.



Slika 18. DNK fragmenti koji odgovaraju delovima gB gena konjskih herpesvirusa 1 (A) i 5 (B) u agaroznom gelu (L : Ladder ; - : negativna kontrola)

Rezultati Nested multiplex PCR – detekcija EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u uzorcima organa i nosnih briseva konja

Primenom metode Nested multiplex PCR ispitano je ukupno 212 uzoraka, odnosno 100 uzoraka organa i 112 uzoraka nosnih briseva konja. Ukupno 86 uzoraka organa (86%) i 76 uzoraka nosnih briseva (67,86%) bilo je pozitivno na prisustvo jednog ili više konjskih herpesvirusa (Tabele 15 i 16). Metodom Nested multiplex PCR je od ukupnog broja pozitivnih uzoraka kod 16,67% uzoraka utvrđeno prisustvo mešovutih infekcija sa dva ili više konjska herpesvirusa pri čemu su EHV-2 i EHV-4 identifikovani isključivo u okviru mešovutih infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5.

Tabela 15. Rezultati detekcije EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u uzorcima organa konja primenom Nested multiplex PCR; KM – kičmena moždina; PM – produžena moždina; LN – submandibularni limfni čvorovi; S – slezina; Poslednje 4 kolone označavaju mešovite infekcije.

	EHV-1	EHV-4	EHV-2	EHV-5	EHV-1 + EHV-4	EHV-1 + EHV-2	EHV-1 + EHV-5	EHV-1 + EHV-2 + EHV-5
KM	21	2	1	/	2	1	/	/
PM	21	2	1	/	2	1	/	/
LN	23	3	1	4	3	/	3	1
S	21	3	1	3	3	/	2	1
Σ	86	10	4	7	10	2	5	2

Tabela 16. Rezultati detekcije EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 u uzorcima nosnih briseva konja primenom Nested multiplex PCR; Poslednje 2 kolone označavaju mešovite infekcije

	EHV-1	EHV-4	EHV-5	EHV-1 + EHV-4	EHV-1 + EHV-5
Srbija	24	1	/	1	/
Republika Srpska	43	/	16	/	7
Σ	67	1	16	1	7

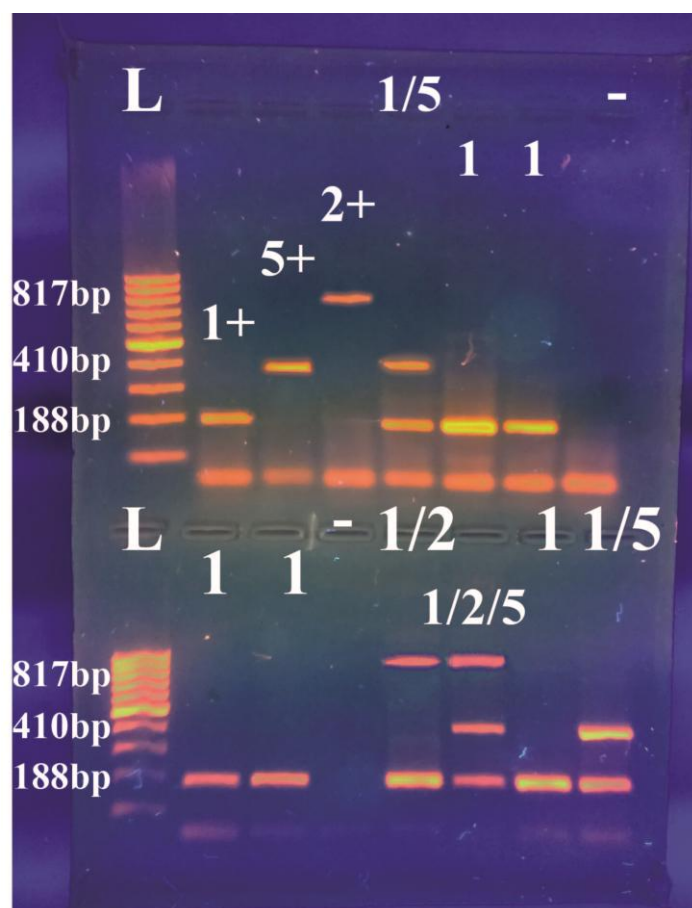
U svim pozitivnim uzorcima organa detektovana je nukleinska kiselina konjskog herpesvirusa 1 (100%), dok su svi ostali virusi bili prisutni u okviru mešovutih infekcija sa EHV-1 i to: EHV-4 u 10 (11,63%), EHV-2 u 4 (4,65%) i EHV-5 u 7 (8,14%) uzoraka. Prema tome, zastupljenost mešovutih infekcija sa dva ili više konjskih herpesvirusa iznosila je 22,09% od ukupnog broja pozitivnih uzoraka organa. Mešovite

infekcije konjskim herpesvirusima 1 i 4 su detektovane u po 2 uzorka kičmene i produžene moždine, odnosno po 3 uzorka submandibularnih limfnih čvorova i slezine i to u uzorcima poreklom od tri konja. Nukleinska kiselina konjskog herpesvirusa 2 detektovana je u ispitivanim uzorcima samo jedne životinje, ždrebeta starog 8 meseci, pri čemu je prisustvo navedenog virusa u kičmenoj moždini i produženoj moždini praćeno detekcijom EHV-1, dok je u uzorcima slezine i submandibularnih limfnih čvorova pronađena i nukleinska kiselina EHV-5. Konjski herpesvirus 5 je detektovan u okviru mešanih infekcija sa EHV-1, odnosno EHV-1 i EHV-2 u uzorcima submandibularnih limfnih čvorova i slezine četiri konja uzrasta 8 meseci do 3 godine.

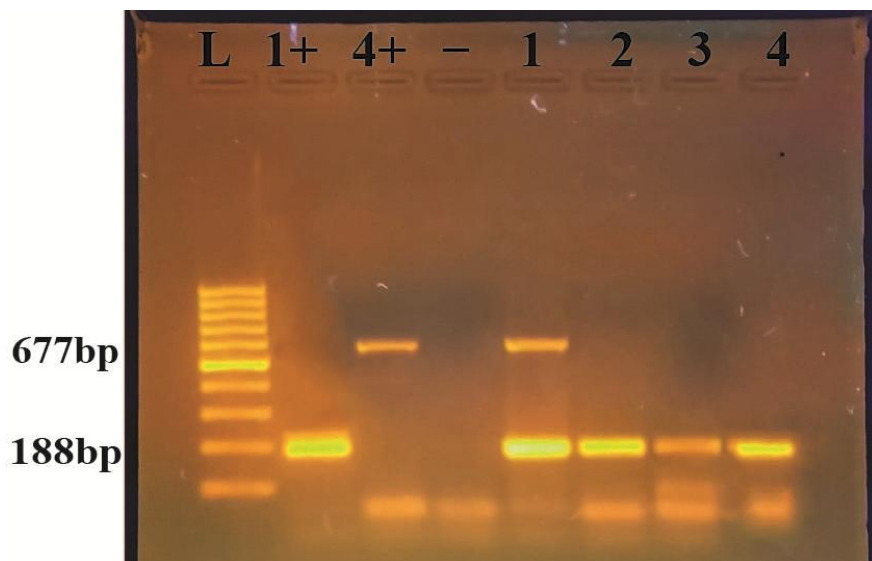
U nosnim brisevima porekom od konja sa teritorije Republike Srbije otkriveno je prisustvo konjskih herpesvirusa 1 i 4 u 24 uzorka, pri čemu je EHV-4 detektovan u okviru mešovite infekcije u nosnom brisu poreklom od jednog konja. Navedeni pozitivni uzorci su poticali od konja sa Zlatibora rasa lipicaner, hrvatski posavac, araber, haflinger i bosanski brdski konj i od konja iz Tutina rasa engleski punokrvnjak i domaći brdski konj. Sve životinje su poreklom iz individualnih gazdinstava držane zajedno u manjim grupama. Potrebno je napomenuti da su preostali uzorci koji su bili negativni primenom Nested multiplex PCR poreklom od konja koji su držani pojedinačno u individualnim gazdinstvima u Tutinu i Kraljevu ili su bili slobodni na ispaši, što je bio slučaj sa domaćim brdskim konjima sa Stare Planine.

Uzorci nosnih briseva konja poreklom iz Republike Srpske bili su pozitivni na prisustvo nukleinskih kiselina konjskog herpesvirusa 1 i konjskog herpesvirusa 5, međutim detektovane su i mešovite infekcije sa navedena dva virusa. U grupi 20 bosanskih brdskih konja sa individualnog gazdinstva u opštini Mrkonjić Grad, u nosnim brisevima 6 životinja starosti od 2 do 5 godina detektovana je nukleinska kiselina EHV-5, dok je u preostalim 14 nosnim briseva konja starosti od 2 meseca do 14 godina utvrđeno prisustvo EHV-1. Od 42 uzorka nosnih briseva lipicanera sa ergele "Vučijak" u Prnjavoru, 32 uzorka su bila pozitivna primenom Nested multiplex PCR. U prvoj grupi od ukupno 16 konja držanih u jednoj štali, EHV-1 je detektovan u nosnim brisevima 15 klinički zdravih kobila starosti 7 do 18 godina, dok je prisustvo EHV-5 utvrđeno u nosnom brisu jedne omice sa kliničkim simptomima respiratornog oboljenja. Ispitivanjem uzoraka nosnih briseva druge grupe od ukupno 16 kobila držanih zajedno konjski herpesvirus 1 je detektovan u 14, a EHV-5 u ukupno 9 uzoraka, od čega je

mešana infekcija sa dva pomenuta virusa bila prisutna u nosnim brisevima 7 konja. Prisustvo konjskog herpesvirusa 5 utvrđeno je kod konja starosti od 6 do 8 godina. Treću grupu konja činili su pastuvi držani odvojeno od pomenutih kobila starosti od 8 do 17 godina u čijim uzorcima nosnih briseva nije detektovano prisustvo nijednog od ispitivanih herpesvirusa konja.



Slika 19. DNK fragmenti koji odgovaraju delovima gB gena konjskih herpesvirusa 1, 2 i 5 u agaroznom gelu. L : Ladder; 1+ : referentni soj konjskog herpesvirusa 1; 2+ referentni soj konjskog herpesvirusa 2; 5+ : referentni soj konjskog herpesvirusa 5; - : negativna kontrola



Slika 20. DNK fragmenti koji odgovaraju delovima gB gena konjskih herpesvirusa 1 i 4 u agaroznom gelu. 1, 2, 3, 4: Uzorci nosnih briseva; L : Ladder ; 1+ : referentni soj konjskog herpesvirusa 1; 4+: referentni soj konjskog herpesvirusa 4

Poređenje rezultata dobijenih primenom izolacije virusa na kulturi ćelija i Nested multiplex PCR

Od ukupno 212 ispitanih uzoraka organa i nosnih briseva konja, primenom metode Nested multiplex PCR detektovano je ukupno 162 uzorka pozitivna na prisustvo jednog ili više konjskih herpesvirusa (76,42%), dok je izolacija virusa na kulturi ćelija RK-13 bila uspešna iz 79 uzoraka (37,26%) (Tabela 17). Kada su u pitanju pojedinačni virusi, prisustvo EHV-1 je primenom metode Nested multiplex PCR detektovano u ukupno 153 uzoraka organa i nosnih briseva konja, dok je izolacija navedenog virusa bila uspešna iz ukupno 72 uzorka. Uprkos činjenici da je primenom metode Nested multiplex PCR utvrđeno više pozitivnih uzoraka nego metodom izolacije virusa na kulturi tkiva iz ukupno 8 uzoraka organa je uspešno izolovan EHV-1 pri čemu su isti bili negativni posle ispitivanja pomenutom molekularnom metodom. Nukleinska kiselina konjskog herpesvirusa 4 je detektovana u ukupno 11 uzoraka (10 uzoraka organa i 1 uzorak nosnog brisa), međutim uvek u prisustvu EHV-1 koji je jedini uspešno izolovan iz 7 uzoraka pomenutih organa. Konjski herpesvirus 2 je primenom metode Nested multiplex PCR detektovan u ukupno 4 uzorka organa poreklom od

jednog ždrebeta i to u okviru mešoviti infekcija sa EHV-1 u uzorcima kičmene moždine i produžene moždine, odnosno sa EHV-1 i EHV-5 u slezini i submandibularnim limfnim čvorovima. Od pomenuta 4 uzorka, iz produžene moždine i limfnih čvorova na ćelijskoj liniji RK-13 uspešno je izolovan samo EHV-1. Primenom Nested multiplex PCR nukleinska kiselina EHV-5 detektovana je u ukupno 23 uzorka organa (submandibularnih limfnih čvorova i slezine) i nosnih briseva konja, pri čemu je navedeni virus uspešno izolovan iz 7 uzoraka (3 nosna brisa, dve slezine i dva uzorka submandibularnih limfnih čvorova).

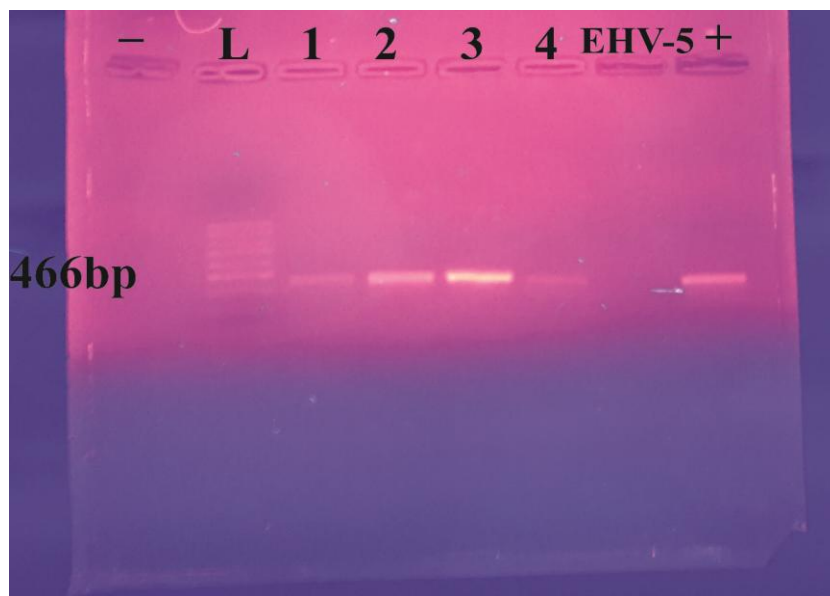
Tabela 17. Poređenje rezultata metoda korišćenih za identifikaciju izolata konjskih herpesvirusa iz organa i nosnih briseva konja. KM – kičmena moždina; PM – produžena moždina; LN – submandibularni limfni čvorovi; S – slezina

Vrsta uzorka	Nested multiplex PCR					Izolacija virusa				
	Broj pozitivnih uzoraka	EHV-1	EHV-4	EHV-2	EHV-5	Broj pozitivnih uzoraka	EHV-1	EHV-4	EHV-2	EHV-5
KM	21	21	2	1	/	15	15	/	/	/
PM	21	21	2	1	/	8	8	/	/	/
LN	23	23	3	1	4	13	11	/	/	2
S	21	21	3	1	3	15	13	/	/	2
Nosni brisevi	76	67	1	/	16	28	25	/	/	3
Σ	162	153	11	4	23	79	72	0	0	7

Rezultati amplifikacije dela gena ORF30 EHV-1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR)

Ispitano je ukupno 15 odabranih ekstrakata DNK u kojima prethodno metodom Nested multiplex PCR utvrđeno prisustvo EHV-1 i ekstrakata DNK izolovanih sojeva EHV-1. Analizirani su DNK ekstrakti uzoraka obeleženi kao 2PM, 6LN, 8LN, 25PM, 22KM, 24KM i izolata D1, D2, D3, D4, 44V, 56V, 1KM, 3PM, 21KM. Svih 15 bilo je

pozitivno na prisustvo fragmenta ORF30 gena EHV-1, pri čemu je DNK ekstrakt jednog od izolata EHV-5 predstavljao negativnu kontrolu. Dobijeni PCR produkti su dalje sekvencirani u cilju analize redosleda nukleotida u navedenom fragmentu.

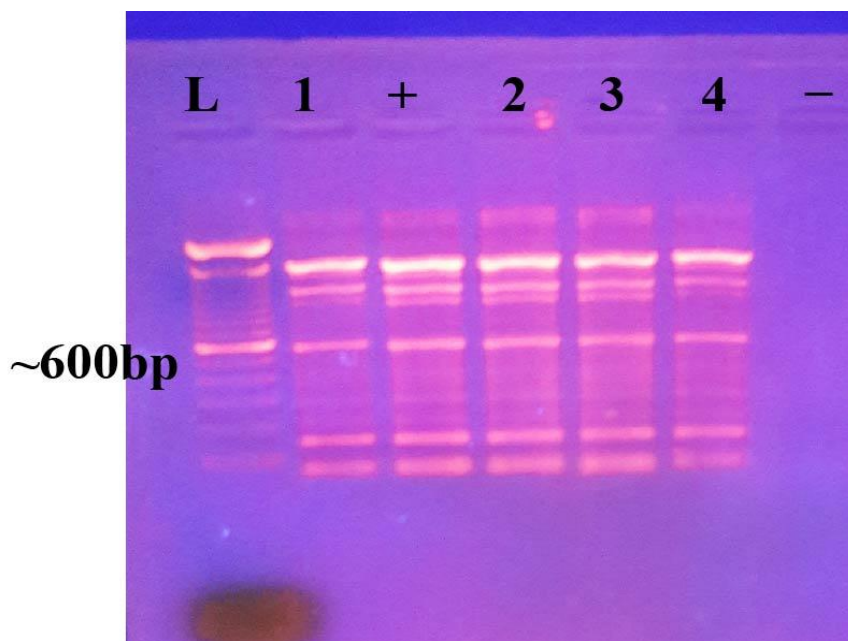


Slika 21. DNK fragmenti koji odgovaraju delu gena ORF30 konjskog herpesvirusa 1 u agaroznom gelu. 1, 2, 3, 4: Uzorci; L : Ladder ; + : referentni soj konjskog herpesvirusa 1; - : negativna kontrola, EHV-5 – negativna kontrola

Rezultati amplifikacije dela gena ORF68 EHV-1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR)

Ispitano je ukupno 15 odabranih ekstrakata DNK u kojima prethodno metodom Nested multiplex PCR utvrđeno prisustvo EHV-1 i ekstrakata DNK izolovanih sojeva EHV-1. Analizirani su DNK ekstrakti uzoraka obeleženi kao 2PM, 6LN, 8LN, 25PM, 22KM, 24KM i izolata D1, D2, D3, D4, 44V, 56V, 1KM, 3PM, 21KM. Svih 15 bilo je pozitivno na prisustvo fragmenta ORF68 gena EHV-1 čija je očekivana veličina bila oko 600bp, međutim pored očekivanih, u agaroznom gelu bilo je prisutno više nespecifičnih fragmenata različitih veličina (Slika 22). S obzirom da se i nakon različitih modifikacija PCR protokola rezultat nije menjao da bi se izbeglo dobijanje neispravne sekvence ORF68 gena, fragmenti od oko 600bp su isecani iz agaroznog gela

odakle je posle ekstrakcije DNK vršeno sekvenciranje u cilju analize redosleda nukleotida u navedenom polimorfnom genetskom fragmentu.



Slika 22. DNK fragmenti koji odgovaraju delu gena ORF68 konjskog herpesvirusa 1 u agaroznom gelu. 1, 2, 3, 4: Uzorci; L : Ladder ; + : referentni soj konjskog herpesvirusa 1; - : negativna kontrola.

Rezultati sekvenciranja delova gB gena EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5

Sekvencirani su odabrani PCR produkti, odnosno:

- 10 PCR produkata sojeva i izolata EHV-1 pozitivnih na prisustvo specifičnog fragmenta gB gena konjskog herpesvirusa 1 veličina 1180bp i 460bp primenom Nested multiplex PCR;
- 3 PCR produkta sojeva EHV-4 pozitivnih na prisustvo specifičnog fragmenta gB gena konjskog herpesvirusa 4 veličine 677bp primenom Nested multiplex PCR;
- 1 PCR produkt soja EHV-2 pozitivnog na prisustvo specifičnog fragmenta gB gena konjskog herpesvirusa 2 veličine 817bp primenom Nested multiplex PCR;
- 7 PCR produkata sojeva i izolata EHV-5 pozitivnih na prisustvo specifičnog fragmenta gB gena konjskog herpesvirusa 5 veličine 410bp primenom Nested multiplex PCR.

Sve dobijene sekvence su analizirane pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) u cilju dobijanja rezultata nukleotidne homologije sa nukleotidnim sekvencama EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 iz međunarodne baze gena.

Nukleotidne sekvence dela gB gena sojeva i izolata EHV-1 i njihova nukleotidna homologija sa sekvencama drugih sojeva

Sekvenciranjem 10 PCR produkata, odnosno dela gB gena sojeva i izolata EHV-1 pod oznakama: D1, D3, D4, 3KM, 44V, 5LN, 13KM, 24KM, 21KM i 20S uspešno su dobijene sekvence prikazane u Tabeli 18.

Tabela 18. Nukleotidne sekvence dela gB gena sojeva i izolata EHV-1

Naziv soja/izolata EHV-1	Nukleotidna sekvenca dela gB gena
D1	TGGAATTCAGGCCTTGTTGCATGCTGAGATCTAACAGCA ACGATGTGCACCACGCGCAAGACGCAGGTCTCTCCTGAT CAGTACCAGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCAT AGAGAACAAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGT GGAGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCG CCAAACAGCTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCG AGTTTGCCATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAAT CCCACGTCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCG TGGTGTACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAA CGAAATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCG CAACCCTTGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTTGGGG GACGTGATAGCTATAACGCACTGCGCCAAAATAGAGGG CAACGTGTACTTGCAAACTCCATGCGCTCGATGGACAG TAACACGTGCTACTCCCGCCCCCGTAACATTTACAAT TACTAAGAATGCAAACAACAGAGGGTCGATAGAAGGCC AGCTGGGAGAGGAGAACGAGATTTTCACGGAGCGCAAG CTGATCGAGCCGTGCGCCCTCAATCAGAAGCGCTACTTT AAGTTTGGCAAAGAGTACGTTTACTACGAGAACTACAC GTTCGTCCGCAAAGCGCCCCCACGGAAATCGAGGTTAT CAGCACGTACGTTGAACTAACTTGACCCTTTTGGGAAGA CCGCGAGTTTCTGCCCCTGGAGGTGTACACGCGGGCTGA GCTGGAGGACGCCGGCCTGCTAGACTACAGCGAAATAC AGCGCCGCAACCAGCTCCACGCTCTCAGGTTTTACGACA TCGACAGCGTGGTCAACGTGGACAATACCGCAGTGATT ATGCAGGGGATCGCCAGCTTTTTCAAGGGCCTGGGTAAA GTGGGGGGAGGCCGTGGGAACGCTCGTTCTCGGCGCCG CCCGGCGCTGTTGTTTCAACCGTATCTGGAAAAGCTTC

	<p>GTTTTTTAAACAACCCATTTTGGGGGGGCTAGCCCTCCG CCCTGCTGGTTAATCCCCCGGCCTGGTTAACCTGCGTTTT TTTTGCTTACAAAATATGTAAAGGAGAATCCCCCATTA CCCTGAAAGATCCTCTTCCAACACAAAAAAGGGGAGGT CGGTG</p>
<p>D3</p>	<p>GTCGTATTCTGTTGATTGGCAGGCTGATAGCACCCAATA ACAATAACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTCA GTACCAGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAG AGAACAAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGG AGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCA AACAGCTGGAGCTCATCAAAACCACGTCGTCTATCGAGT TTGCCATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCC ACGTCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGG TGTACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGA AATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAA CCCTTGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCCTGGGGGAC GTGATAGCTATAACGCACTGCGCCAAAATAGAGGGCAA CGTGTACTTGCAAACTCCATGCGCTCGATGGACAGTAA CACGTGCTACTCCCGCCCCCGTAACATTTACAATTAC TAAGAATGCAAACAACAGAGGGTTCGATAGAAGGCCAGC TGGGAGAGGAGAACGAGATTTTCACGGAGCGCAAGCTG ATCGAGCCGTGCGCCCTCAATCAGAAGCGCTACTTTAAG TTTGGCAAAGAGTACGTTTACTACGAGAACTACACGTTT GTCCGCAAAGCGCCCCCACGGAAATCGAGGTTATCAG CACGTACGTTGAACTAAACTTGACCCTTTTGGGAAGACCG CGAGTTTCTGCCCTGGAGGTGTACACGCGGGCTGAGCT GGAGGACGCCGGCCTGCTAGACTACAGCGAAATACAGC GCCGCAACCAGCTCCACGCTCTCAGGTTTTACGACATCG ACGGCGTGGTCAACGTGGACAATACCGCAGTGATTATG CAGGGGATCGCCAGCTTTTTCAAGGGCCTGGGTAAAGTG GGGGGAGGCCGTGGGAACGCTCGTTCTCGGCGCCGCC GGCGCTGTTGTTTCAACCGTATCTGGAAAAAGCTTCGTT TTTAAACAACCCATTTGGGGGGGCTAGCCCTCCGGCCTG CTTGGTAATCCCCCGGCCTGGGTAGCCTGCGTTTTTTTTGC TTACAGAATATGTAAGGCCAATCCCCCTTACCCAGGGGA GGTGTTTTTTCAACAACAAAAAAGGGGAAA AAG</p>
<p>D4</p>	<p>AAAAGGGCGCACAGACAGGAAGAAGCGATATATAACGC ACCTAGTGAACCGCGCAGACCAGGTCTCTCCTGACAGTA CCAGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAGAGA ACAAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGG CAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAAC AGCTGGAGCTCATCAAAACCACGTCGTCTATCGAGTTT CCATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCCACG TCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGT ACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGAAAT GGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCC TGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCCTGGGGGACGTGA</p>

	TAGCTATAACGCACTGCGCCAAAATAGAGGGCAACGTG TACTTGCAAACACTCCATGCGCTCGATGGACAGTAACACG TGCTACTCCCGCCCCCGTAACATTTACAATTAAG AATGCAAACAACAGAGGGTCGATAGAAGGCCAGCTGGG AGAGGAGAACGAGATTTTCACGGAGCGCAAGCTGATCG AGCCGTGCGCCCTCAATCAGAAGCGCTACTTTAAGTTTG GCAAAGAGTACGTTTACTACGAGAACTACACGTTTCGTCC GCAAAGCGCCCCCACGGAAATCGAGGTTATCAGCACG TACGTTGAACTAAACTTGACCCTTTTGGAAAGACCGCGAG TTTCTGCCCCTGGAGGTGTACACGCGGGCTGAGCTGGAG GACGCCGGCCTGCTAGACTACAGCGAAATACAGCGCCG CAACCAGCTCCACGCTCTCAGGTTTTACGACATCGACAG CGTGGTCAACGTGGACAATACCGCAGTGATTATGCAGG GGATCGCCAGCTTTTTCAAGGGCCTGGGTAAAGTGGGG GGAGGCCGTGGGAACGCTCGTTCTCGGGCGCCGCCGGCG CTGTTGTTTCAACCGTATCTGGAATAGCTTCGTTTTTAAA CAACCCATTTGGGGGGGCTAGCCATCGGGCCTGCTTGGT AATCCCCCGCCTGGGTAGCTGGCGTTTTTTTTGCTTACA GAATATGTAATGGCAAATCCCCATTACCCTAAAGAAGC TCTTTTCCACAAAAAAAAGAAGGAAGATAT
3KM	GGGGGGGCAGAACTGGAGGCACTCTGCAGACATAACA ATAACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTCAGTAC CAGAACCTCAGCCAACCAAGATGGTGTGCATAGAGAA CAAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGGC AACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACA GCTGGAGCTCATAAAACCACGTCGTCTATCGAGTTTGC CATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCCACGT CAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGTA CCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGAAATG GTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCCTT GACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCCTGGGGGACGTGAT AGCTATAACGCAACGTTGAGAGGGGAAGGGGGG
5LN	GGGGGGGTACGGAACGGGAAAGGAGCAGAAGTGAGGC TATACCGCGGGGGTTAGCGTAAACCCCGGTCTGTCCTGT CAGTACCAGAACCTCATCCAACCCGGGATGGTGTGCATA GAGAACAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTG GAGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCC AAACAGCTGGAGCTCATAAAACCACGTCGTCTATCGA GTTTGCCATGCTACAGTTTGCATACTATCACATCCCATCC CACATCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAGCTGCGTG GTGTACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACG AAATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCA ACCCTTGACGAGCGAGTTGCAGCTAGGGTCCTGGGGGA CGTGATAGCTATGACGCAGGGGGGGGTGCGTGGGTGCCG TCGCGGTGTCGGTGTGGCTCCGTCTGCGGTTGGCGTTC GTGTGGGCGGGGTTGTGGGG
44V	GGGGGATAAACTAAGCAAACAATGCAACATAACAATA ACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTCAGTACCAG

	AACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAGAGAACAA ATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGGCAAC GGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACAGCT GGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGAGTTTGCCAT GCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCCACGTCAA TGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGTACCCT CCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGAAATGGTGA AGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCCTTGACG AGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGGACGTGATACTA TAACGCAAAATTGAATTTTTTTTTT
13KM	GGGCGACTATTTAAGATAAATGATGCTAACCATAACAAT GAACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTCAGTACC AGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAGAGAAC AAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGGCA ACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACAG CTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGAGTTTGCC ATGCTACAGTTTGCATACCATCACATCCAATCCCACGT AATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGTAC CCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGAAATGG TGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCCTTG ACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGGACGTGATA GCTATAACGCACTGGATGCGGTTAGATCTCACAAGGTGC GGTTAGATATCACAAGGTG
20S	GGGGTGGGACTCCTATCGTTTGCCTGCAACATAACAAT AACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTCAGTACC AGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATAGAGAAC AAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTGGAGGCA ACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACAG CTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGAGTTTGCC ATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATCCCACGT AATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGTAC CCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAACGAAATGG TGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCCTTG ACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGGACGTGATA CCTATAACGCAAAATGGAAAAAAAAAACGG
21KM	TNNAANNNGNNANNANNCGNTNGGNNNTGCAACAAT ACAATAACACCACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTC AGTACCAGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATA GAGAACAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTG GAGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCC AACAGCTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGA GTTTGCCATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATC CCACGTCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGT GGTGTACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAAC GAAATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGC AACCTTGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGG ACGTGATACCTAATTACGCAAAA
24KM	TTATTGCCGGAGGTGGAAAATAAGAGAAATGTAAACGA

	TAACAATAACACAACGCGAAGACGCAGGTCTCTCCTGTC AGTACCAGAACCTCAGCCAACCCAAGATGGTGTGCATA GAGAACAAATTCTACATCGCTTGCACAAACGAGCAGTG GAGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCC AACAGCTGGAGCTCATCAAACCACGTCGTCTATCGA GTTTGCCATGCTACAGTTTGCATACGATCACATCCAATC CCACGTCAATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGT GGTGTACCCTCCAAAACAAAGAGCGGACCCTATGGAAC GAAATGGTGAAGATTAACCCGAGCGCCATAGTCTCCGC AACCTTGACGAGCGAGTTGCAGCGAGGGTCTGGGGG ACGTGATAGCTATAACGCAAGTTGGACGTATTTGGGAA AAGAT
--	--

Međusobna nukleotidna homologija navedenih sekvenci gB gena sojeva i izolata EHV-1, kao i homologija sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100% (Slika 25). Arhivirani sojevi EHV-1 Katedre za mikrobiologiju (D1, D2, D3) su među sobom 100% homologni, dok su u poređenju sa sojem 5LN i izolatom 21KM 98%, odnosno 99% slični. U poređenju sa ostalim sojevima EHV-1 iz međunarodne banke gena, odnosno domaćim sojevima i izolatima navedenog virusa D1, D2 i D3 bili su 100% homologni. Soj 5LN poreklom iz uzorka submandibularnih limfnih čvorova kobile iz Negotina (Borski okrug) je u poređenju sa svim ispitivanim sojevima i izolatima EHV-1 iz Republike Srbije i Republike Srpske, kao i sa sojevima iz banke gena bio 98% sličan. Izolat EHV-1 21KM poreklom iz uzorka kičmene moždine konja iz Loznice (Mačvanski okrug) bio je 99% sličan svim analiziranim sojevima EHV-1, izuzev 44V i 20S sa kojima je imao 100% homologiju nukleotidnih sekvenci. Izolat EHV-1 44V poreklom iz nosnog brisa kobile sa ergele „Vučijak“ bio 100% homologan sa svim ispitivanim sojevima EHV-1 izuzev 5LN (98% sličnosti), odnosno 13KM i TR-GEA-11 (99% sličnosti).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. D1																	
2. D3	0.00																
3. D4	0.00	0.00															
4. 3KM	0.00	0.00	0.00														
5. 44V	0.00	0.00	0.00	0.00													
6. 5LN	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02												
7. 13KM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02											
8. 24KM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00										
9. 21KM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01									
10. 20S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00								
11. KM593996.1 EHV-1 T953 SAD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00							
12. KF644578.1 EHV-1 01c1 Japan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00						
13. KU206473.1 EHV-1 Yorkshire/114/1999 Velika Britanija	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00					
14. JX644987.1 EHV-1 TR-McIA-12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00				
15. JX416466.1 EHV-1 TR-MCA-11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
16. JX416465.1 EHV-1 TR-GEA-11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
17. JN705794.1 EHV-1 TR01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Slika 25. Međusobne sličnosti sekvenci dela gB gena sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske i sličnosti sa sojevima EHV-1 iz međunarodne banke gena (0,02 predstavlja sličnost od 98%; 0,01 predstavlja sličnost od 99%; 0,00 predstavlja sličnost od 100%)

Nukleotidna sekvenca dela gB gena soja EHV-4 i njegova nukleotidna homologija sa sekvencama drugih sojeva

Posle sekvenciranja tri odabrana PCR produkta, odnosno dela gB gena sojeva EHV-4 pod oznakama: 1LN, 17PM i 22LN, uspešno je dobijena jedna sekvenca soja 1LN prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19. Nukleotidna sekvenca dela gB gena soja 1LN EHV-4

Naziv soja EHV-4	Nukleotidna sekvenca dela gB gena
1LN	GGGAGGAAGGGTGGTAGGGAAGCAGCTGCGTGGTGTACTACA AAACAAAGAGCGGACCCTCTGGAATAGAGATGGTAAAGGTTAAC CCAAGCGCTATTGTTCCGCCACTCTTGACGAGCGAGTTGCGGCA AGGGTTTTGGGAGACGTTATAGCCATAACACATTGTGTA AAAATA GAGGGCAATGTGTACTTACAAA ACTCTATGCGCTCCTCGGACAGC AACACGTGCTACTCCCGCCCACCTGTAACGTTTACCATTACTAAA AATGCAAACAGCAGAGGGACGATAGAGGGCCAGTTGGGAGAAGA

	AAACGAGGTTTATACGGAGCGCAAGCTTATCGAGCCGTGCGCTAT CAATCAAAAACGATACTTTAAGTTTGGCAAAGAGTATGTTTACTA TGAGAACTACACGTACGTTTCGCAAAGTGCCCCGACTGAAATCGA AGTGATCAGCACCTACATTGAACTAACTTAACTCTTTTGGGAAGA CCGCGAGTTTCTACCCCTGGAGGTTTACACGCGAGCTGAGCTTGA AGACACGGGGCTATTGGATTACAGCGAGATACAGCGCCGTAACC AGCTTCACGCCGTCCGATTCTACGAGATAGACGGCGGTGTGACG TGGACGAGAGGGCGGGCGGTATGTGTGGGGACTAAAGAAGAGAG TGCGGCACTATAGCGACGGTCAACGACTAAGGAGGAGAGTGGGG CACTAGAGAACCGCGAAGGACGGCGGGCGGTTGGGCGTCGGTGAA GAGGAGGGGGGGTGGAGGGGGGGGGGGGGGGAGGGTGGGGGGG GGGAGGGGGGGTGTGGGGAGTAGAGGTGGGGGTAGGGGGGG
--	--

Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena soja 1LN EHV-4 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je 99% (Tabela 20).

Tabela 20. Sličnost sekvence dela gB gena soja konjskog herpesvirusa 4 poreklom iz Republike Srbije sa sojevima EHV-4 iz međunarodne banke gena

	Registarski broj i naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
1LN EHV-4 Srbija	AB986064.1 EHV-4 AQHY12LT2104/1/HM Japan	99%
	JN982956.1 EHV-4 MD4-TR2011 Turska	99%
	JN982957.1 EHV-4 RJ4-TR2011 Turska	99%
	JX416464.1 TR-EHV4-ED-11 Turska	99%
	JX416462.1 TR-EHV4-TCO-11 Turska	99%
	JX416463.1 TR-EHV4-VSA-11 Turska	99%
	LC075582.1 EHV-4 strain: 83-MB Japan	99%
	LC075587.1 EHV-4 strain: 11-10 Japan	99%
	AF030027.1 EHV-4 NS80567 Irska	99%

Nukleotidna sekvenca dela gB gena soja EHV-2 i njegova nukleotidna homologija sa sekvencama drugih sojeva

Sekvenciranjem jednog PCR produkta, odnosno dela gB gena soja EHV-2 pod oznakom 3S uspešno je dobijena jedna sekvenca prikazana u Tabeli 21.

Tabela 21. Nukleotidna sekvenca dela gB gena soja 3S EHV-2

Naziv soja EHV-2	Nukleotidna sekvenca dela gB gena
3S	AAGGAGCGAGGGAGGCGGTGTCAACCACCCCCTGAAACATGTTG TGGTCGACACAAATGAACCAACTCACCTGCAGAGTGAAATAGAA GGGGGAGACGAGATGAAGCCCTTTGAATTCTTTGAGAGTTCCACC TGGTGA ACTATCGAGATGTCGCCCTTTTAAAAAGAAAATGGCACA CAGCCGAGAAAATCTCGAAAAGACCACACTCTATTCAACTGCTGA AAAACTATGCTGTCACAAAGTACGGTGTGGGGTTGGGGCAGGCTG ATAACGCTACCAGATTCTTTGCAATATTTGGGGACTATTCCCTGTC TTGGAAGCCACCACTGAAAACAGCTCCTACTGTGATTTAATTTT ATGGAAGGGGTTTTCCAATGCCATTCAAACCAACACAATAGCAG TCTCCATTTTATTGCCAATGATATAACAGCCTCCTTCTACTCCTT TAGAAGAAGAGGCTAATTTTAAACGAGACATTTAAGTGTATATGGA ACAACACCCAAGAAGAAATTCAAAAAAGTTAAAAGAGGTTGAA AAAACTCACAGACCTAACGGTACTGCGAAGGTCTATAAAACAAC AGGCAATCTGTACATTGTTTGGCAACCGCTTGTACAGATAGACCT GCTAGATACTCATGCCAAGCTGTACAATCTCACAAACGCTACAGC TTCACCCACATCACCACCCACAACATCTCCAGTAGAAGGAGACG CAGGGATACTTCAAGTGGTGGGGGTGGAATAATGGAGACAACA ACTCAACTAAGGAAGAAGTGTGGCAGGGGGGGATTGATCAACGG GAAGGAGGAACCAAGACGGGTGGAACACGGTCCGGGTCCGGGTG AGTTGGTGAGGAGGCGGTTGTGGGGGAGGTGGAGGCAGGTTGGA GCGGTCCGGTGAGGAGATGTGAGCGGAGGAGAGAGCGAGGTGAG TGGGGAGGGGTGGGG

Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena soja 3S EHV-2 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 80 do 99% (Tabela 22). Soj konjskog herpesvirusa 2 3S poreklom iz slezine ždrebeta iz Indije (Sremski okrug) bio je 97-99% homologan sa sojevima poreklom iz Turske, odnosno 94-98% sa evropskim sojevima EHV-2 (Nemačka i Velika Britanija) i 92% sa mađarskim sojem Hun-1. Značajno niži stepen nukleotidne homologije pronađen je u poređenju sa sojem sa Islanda Swe-2 (80%).

Tabela 22. Sličnost sekvence dela gB gena soja konjskog herpesvirusa 2 poreklom iz Republike Srbije sa sojevima EHV-2 iz međunarodne banke gena

	Registarski broj i naziv soja	Homologija nukleotida u sekvenci
3S EHV-2 Srbija	EF182697.1 EHV-2 Ger-7 Nemacka	94%
	EF182696.1 EHV-2 Ger-5 Nemacka	94%
	EF182701.1 EHV-2 Eng-3 Velika Britanija	98%
	EF182699.1 EHV-2 Eng-13 Velika Britanija	94%
	EF182704.1 EHV-2 Hun-1 Madjarska	92%
	GU065279.1 EHV2-TR-NS28 Turska	98%
	EF182709.1 EHV-2 Swe-2 Svedska	80%
	JN982963.1 IS-EHV2-TR2011 Turska	99%
	JN982962.1 G-EHV2-TR2011 Turska	99%
	JN982964.1 RM-EHV2-TR2011 Turska	97%

Nukleotidne sekvence dela gB gena sojeva i izolata EHV-5 i njihova nukleotidna homologija sa sekvencama drugih sojeva

Sekvenciranjem 7 PCR produkata, odnosno dela gB gena sojeva i izolata EHV-5 pod oznakama: 3LN, 24LN, 47V, 23S, 16LN, 52V, 13MG, uspešno su dobijene sekvence prikazane u Tabeli 23.

Tabela 23. Nukleotidne sekvence dela gB gena sojeva i izolata EHV-5

Naziv soja/izolata EHV-5	Nukleotidna sekvenca dela gB gena
3LN	CCCTGATATAGACCTGCCTATCAATATACGAATATGTGT AGCTCTAGTATATTTTTAACGTCAGAAAATATAGAAAGC TGGTCACCTCCACCACCATCTACAAGGGGTGGAGTCAGG ATGCCATCACCAACCAGTACACCTCCAGCTTTGCTATGC CCCTCTGGGAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGT GCTATAACGGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTC

	<p>ACCACCTACGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGT GCGCCTCGTACCCGCCGACGGTCTCACCTCCAGCATCAG GCGCTATCACAGTCAGCCCGAACTCTACGTGACCCCCAG AAACCTGCTGTGGTCTTACACCACTAGAACAACGGTTCA ACTACCCCCCCCCCCCCCCCCAAACAGCCCCCTGCACAA CGAAACGCAACGACAACGAAGGCAGCGCACAAACGGCC AACGAACCCATTGCCATACCTAAAGGAGGCCTCCGAAA GGGCGGCGCAAGGCCAGTAAACCAAGGGCCAGGTAGA ACTCGGACAAGAGGAAAAAAGGGCGCCAACCACCAACG GAGGATAGCAATCACAAAACCGAGGCGAGACGGGGG GTAAGGGAGAAGAGGAGGGGGAGGGACAGCGAGCGCA GGGAGAAAGGAAGCAAATAGGAGAAATAAAGTAGAGG CAAAACATAGGGAGATGAAGTCCCAGGCG</p>
<p>24LN</p>	<p>CCCGAAATTCATATCTACTCCTTAAATACGTGTAATCTTC GTAGCTATATATTTTTAACGTCAGAAAATATAGAAAGCT GGTCACCTCCACCACCATCTACAAGGGGTGGAGTCAGG ATGCCATACCAACCAGTACACCTCCAGCTTTGCTATGC CCCTCTGGGAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGT GCTATAACGGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTC ACCACCTACGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGT GCGCCTCGTACCCGCCGACGGTCTCACCTCCAGCATCAG GCGCTATCACAGTCAGCCCGAACTCTACGTGACCCCCAG AAACCTGCTGTGGTCTTACACCACTAGAACACCGATTCA ACTAGGAGGGAGGTAGAGAGACAAGCACTAAACAGAC AATTAATATTTTTATCTACGCTGCTGTTGGCCAACCTCAT TCTCGTTATATTTGTCTTTCTTTTCGATTCGCTTCTTTTT TCAACATGAAAATAGTTACATTTTTTGCTACAAAGAAAA AAAAAATATGTATATGTTATAGTGTTTTATTGTAGTTTTG GTTATTACGTTCTTTAGTGTATTAATGGAGTTAGGTAG TTTATG</p>
<p>47V</p>	<p>GAAGGGGGGAGGGCAGTCACACAGAAGAAGAGGAGCC AGCAAATAAGTATTTAGCGTCAGAAAATATAGAAAGCT GGTCACCTCCACCACCATCTACAGGGGTGGAGTCAGGAT GCCATACCAACCAGTACACCTCCTGCTTTGCTATGCC CTCTGGGAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGTGC TATAACGGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTCAC CACCTACGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGTGC GCCTCGTACCCGCCACGGTCTCACCTCCCGCATCAGGC GCTATCACAGTCAACCCGAACCTCTACGTGACCCCCCGAA ACCTGCTGTGGTCTTACACCACTAGAATAACCGTCAACT AACTAGCACTGGGGTTACCTACTAGCAGTACTGTCAACT TGTGGGCCCACTGCTACTAGGTTGGCTTTTGGTTTCTAGT GTGGCTCTGGCATTAGGGTAGGCTTCTGTCTACGGGGCA GGGCCTTCATCTTGGGTTGGTGAAAACCTGTTCTCCTCTC ACAACCTGGTCTTCTATCTACCCTCTTTGTTTCGATTCTTAG TACTTGTAATGTTACAGGGGGGCGTTAGAGCATTGTGAC TGTGCATCGATCGCTGGAGTTTTGCAAGTACACGTTGCC CTCTATTTTGGCGCATTCATTTTTGCTATCTAGTCTCTC</p>

	GGGATCCTCGCTGCATCTCACTAAACAGGTTTTGCCGGA CACCGTTGGTCTCGGGGCTGATCTGCTGCATTTCACTCC CGTATGGTCCGCTCTTTGTTTTGGAGGGGTCACCACGCA TTTCTTTCTACTTTAGCGTCTCTGTGGCTGGTATTGGATG A
23S	CCCTGAAAGGAGTGGTAATCTGTAGCAACGACGGTCAG CTATACATTTTAAACGTAAGAGATATAGAAGGCTGGTCA CCTCCACCACCATCTACAAGGGGTGGAGTCAGGATGCC ATCACCAACCAGTACACCTCCGCTTTGCTATGCCCTCT GGGAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGTGCTAT AACGGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTCACCAC CTACGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGTGCGCC TCGTACCCGCCGACGGTCTCACCTCCGCATCAGGCGCTA TCACAGTCAACCCGAACCTCTACGTGACCCCCAGAACT GCTGTGGTCTTACACCACTAGAACGCGGTCAACACATCC CAGCCGCTGACCGCCAGGCGGGTGATGGTCTTACTATCT AGCATTACGCCACAATGTTTTCTATGTTGGAAGAGTTAA TTTTGCCGAGCTCCTGGAGATGCTACCGATAAGCGGCGA GAGGTTTGTGAGGAGGGGCATGCAATATGTGCTGCACT AACTTGAAGTCCCATACAGGAAGTGTGCCGGATTCTGGT TTTTTAAA
16LN	CCCAGGGGGGTGGAAAATGTTGTAAAAACAACCTGATAA CTACATCTTCTAACATAACAAAAAAAAAAAACTAGTCAT CTCCACCACCATCTACAAAGAGGTGGAATCAAGATGCC ATCACCAACCAATACACCTCCAGCTTTGCTATGCCCTC TGGGAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGTGCTAT AACGGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTCACCAC CTACGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGTGCGCC TCGTACCCGCCGACGGTCTCACCTCCAGCATCAGGCGCT ATCACAGTCAACCCGAACCTCTACGTGACCCCCAGAACT TGCTGTGGTCTTACACCACTAGAACGACGGTCAACTACT CGGCCCAACAGTGACCGTCGTGCTGGTGTGGCCTCTC CTCTGGGGGGCCGGCGCCCGCGCCTTTGGCTGTTTGCGC GTTTCTCGCGTTGCGTTGTGGTGCGGTCCGGTGGGGTGG CGTGCGGCCCGTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGC GTGCGTGGGGTGGGGGTGGGGTGTCTGGCTGCCCGGG GGTTCGCCTTCTCTGGGGCTTGTCGGTGGCCTGTGCCGG TGTGGGGGGGGGGGTGGGGGTGTGCGGTGGGGTGTGG GGGTCTGGGGGGTGTGGGGTGTCTCGTGTGGGGGTGTG TGTGGGGTGGCTTGTGTGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGG TGGGTTCCGGTGTGGTGGGGGGGGGGGGCGGGTGGGGGG GGTGGGGTGGTTGGGGTGGGTGGTGGGTGTGTTCCGGTG GGTGGTGGGGTGGGGGGGGGGGGTGGGGGGGTGTTTGG GTGTGGGGGGGGGTGGGGGGGGGGTGGGGGGGGTTG
52V	CCACATTAAGACAACAACGGTCACTTACAATATAGAGA CCTATGTCTTTAAAGTCAGAAAATATAGAAAGCTGGTCA CCTCCACCACCATCTACAGGGGTGGAGTCAGGATGCCAT CACCAACCAGTACACCTCCGCTTTGCTATGCCCTCTGG

	<p>GAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGTGCTATAAC GGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTCACCACCTA CGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGTGCGCCTCG TACCCGCCGACGGTCTCACCTCCAGCATCAGGCGCTATC ACAGTCAGCCCGAAATCTACGTGACCCCGAGAAACCTG CTGTGGTCTTACACCACTAGAACGACGGTCAACTACTCG GGGGCCTGGCTTTTTTCCTTGGTGGTTGGCCGTCGTTTCGT GTGTTCTGCCCGTGGTTGGCCTTGGGGTTGTCCGGGGTGG GGGCGTTCGTGGGTGTTTGGTGTCTGTGTTGGGGTGTGTT TGTGTTTGTGTTTGGGGCGGTGGGGGGGTGGGTGGGGGG CTGGGGGTGGGGGGGGGGGGTGGGTGGTGGGGGGGGTGT GGGTTTGCGGCCTCGGTGTGGGCGTGGGGGGCGGGTGGT AGTTGGGGGGGGTGTGTTGGTGGGTGGTGTGTTGGTGTGGTT GCGGGGGTTTTTCT</p>
<p style="text-align: center;">13MG</p>	<p>CCAAGGAGCCGGAAGGAAAGAGCAATTACTGCTGCAGC CTTAAGACTTTAAGGCCAGAGTGACCAACGGCTGGTCAC CTCCACCACCATCTACAAGGGGTGGAGTCAGGATGCCAT CACCAACCAGTACACCTCCGCTTTGCTATGCCCTCTGG GAGGCCAGGCTGGTGGATTACAATTATGAGTGCTATAAC GGGATACAGGTGACAGAAAACGGTCACCTCACCACCTA CGTGGACAGGGACGGGTACAACGAGTCCGTGCGCCTCG TACCCGCCGACGGTCTCACCTCCAGCATCAGGCGCTATC ACAGTCAACCCGAACTCTACGTGACCCCGAGAAACCTGC TGTGGTCTTACACCACTAGAACGACGGTCAACACCTGCG GTCAATATCCAGGCACTCGAACGCCGGGGAAATACTGG GCGTAATAAACCGTCCTTATAAAGCCGGAGTCCTGTTGG CAAAAAAAAAACAATGGTATGACGAGGGTACATGTTTCG TAGAGGGTGCATTTCGTGAAAACCTGTGATATTAACAATG GTGAAGATAAGCCCGATTGTTGATTCGAGGACTTGTCCA AGATGCAAGAGAGATAATATAAGTTGTTGGGCGTGAGC GCTTGAGATCGAGTGTATTGTTGCGATTATAGGGCGTAA TCATATTGCAGTGTTCTTGGGATCTCGCTGCAGGGGCAC CACGGTACCGAGAAGTTGTTTAAGGGAGTAGAGCACTC TC</p>

Međusobna nukleotidna homologija navedenih sekvenci gB gena sojeva i izolata EHV-5, kao i homologija sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100% (Slika 26). Izolat 13MG poreklom iz nosnog brisa konja iz opštine Mrkonjić Grad je 100% homologan u poređenju sa svim analiziranim sojevima EHV-5, pri čemu je 99% homologije pokazano njegovim poređenjem sa izolatima 47V i 52V poreklom iz nosnih briseva kobila sa ergele „Vučijak“ i južnokorejskim sojem KREHV5/71. Međusobnim poređenjem nukleotidnih sekvenci delova gB gena izolata 47V i 52V detektovano je 98% homologije. Pored toga, Izolat 57V je 99% sličan sa svim ostalim ispitivanim sojevima, izuzev dva soja 24LN, 3LN iz Srbije i jednog

turskog soja IS-EHV5-TR2011sa kojima poseduje 100% homologiju. Svi ispitivani sojevi i izolati poreklom iz Republike Srbije su bili 99-100% slični kako među sobom, tako i sa sojevima EHV-5 iz međunarodne banke gena.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. 13MG														
2. 16LN	0.00													
3. 23S	0.00	0.00												
4. 24LN	0.00	0.00	0.00											
5. 3LN	0.00	0.00	0.00	0.00										
6. 47V	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01									
7. 52V	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02								
8. HM234090.1 EHV-5 KREHV5/71 Juzna Koreja	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01							
9. JN982959.1 IS-EHV5-TR2011 Turska	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00						
10. JN982960.1 M-EHV5-TR2011 Turska	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00					
11. JN982961.1 RD-EHV5-TR2011 Turska	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00				
12. KC715730.1 EHV-5 Archey SAD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00			
13. KC715732.1 EHV-5 Chantilly Lake SAD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00		
14. GQ325592.1 EHV-5 BB5-5 Island	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	

Slika 26. Međusobne sličnosti sekvenci dela gB gena sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske i sličnosti sa sojevima EHV-5 iz međunarodne banke gena (0,02 predstavlja sličnost od 98%; 0,01 predstavlja sličnost od 99%; 0,00 predstavlja sličnost od 100%)

Rezultati sekvenciranja delova gena ORF30 i ORF68 EHV-1

Sekvencirani su odabrani PCR produkti, odnosno:

- 15 PCR produkata sojeva i izolata EHV-1 pozitivnih na prisustvo specifičnog fragmenta ORF30 gena konjskog herpesvirusa 1 veličina 466bp lančane reakcije polimeraze;
- 15 PCR produkata sojeva EHV-1 pozitivnih na prisustvo specifičnog fragmenta ORF68 gena konjskog herpesvirusa 1 veličine oko 600bp primenom lančane reakcije polimeraze;

Sve dobijene sekvence su analizirane pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) u cilju provjere nukleotidne homologije sa nukleotidnim sekvencama EHV-1 iz međunarodne baze gena.

Nukleotidne sekvence dela ORF30 gena sojeva i izolata EHV-1

Sekvenciranjem 15 odabranih PCR produkata, odnosno dela ORF30 gena sojeva i izolata EHV-1 pod oznakama 2PM, 6LN, 8LN, 25PM, 22KM, 24KM, D1, D2, D3, D4, 44V, 56V, 1KM, 3PM i 21KM uspešno je dobijeno 12 sekvenci prikazanih u Tabeli 24.

Tabela 24. Nukleotidne sekvence dela ORF30 gena sojeva i izolata EHV-1

Naziv soja/izolata EHV-1	Nukleotidna sekvenca ORF30 gena
D1	GGGGGCCGGGTCGGAGGCGTGGGCTACCAGGGAGCAAG GTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACCCCGTG GTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCATTATCC AGGCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTCGATG AAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGACTCCT CGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTATTTTTGTCC ACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTGCTGC GCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGCGCGA ATCCCCACCAGCACCCCAAGGAGGCAGTTTTACTAGAT AAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACTCGGTT TACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGCCTGCC TGGAAGGATAAAAGGACGGGCGGCGGGC
D2	TTTTTTTTTTTTCTGAACAGGAAACGGGGGAACCGCGA CCTCCGTGGGTCCGTGGTCGACCAGGGAGCAACATTTAT GGCCCCCGGATCCGGCTTTCATAAGGCCCCCTCGTTGGG GGTGGAGTTGGGGAGTTGATACCCAAGCATTATCCAGG CCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTCGTGGAAG TGGATATGGCGGGGGTTCAAACAACCATAGATTCCTCCA CGTACGAGAGGGGCGACCAAAAGGGGTTTGGGTCCACG CCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGAAATTTGTAAGAAAT ACGGGCACCATGGGAAACAACACAGCGCTGTTACTTTTG AAAACGGAGGCCCTGCTACTTGGAAAATGCTGCTCTTTT AGATAAAGGAGGCGGGCCAATGCACACCGTCTAAATNT ATCTGAAGTCTTNCNNG
D3	GGGGCGGGGGGGCTGGGGTGGCCGTGGGCTCCAGGGAG CAAGGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACC CCGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCA

	<p>TTATCCAGGCCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGC TCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCG ACTCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTT TTGTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCT TGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGG GCGCGAATCCCCACCAGCACCCCAAGGAGGCAGTTTT ACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCA ACTCGGTTTACGATTACGGGGGTGGCAAACGGCCTGT TGCCTGCTTTAAAGGAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGCA CC</p>
D4	<p>GGGGCGGGGGGTTGGGGATGCCGTGGGCTCCAGGGAGC AAGGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACCC CGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCATT ATCCAGGCCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTC GATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGAC TCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTTT GTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTG CTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGC GCGAATCCCCACCAGCACCCCAAGGAGGCAGTTTTACT AGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT CGGTTTACGATTACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGC CTGCTTAAAAGGAAAAAACGGAGGCGGCACGGGGGG GGGG</p>
44V	<p>TCCGGGGGAGGGGGAGGGGGGGTGAATGTGGTCAGAG GAAAGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACCC CGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCATT ATCCAGGCCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTC GATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGAC TCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTTT GTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTG CTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGC GCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTTACT AGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT CGGTTTACGATTACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGC CGTGTCTGAGGATAAACCCAGCCGGGCGCGG</p>
1KM	<p>GGGGCGGGGAGGGGTGAGGGTGTTCGTTGTCAAAGTA AAAGGATATTCCCGTGCCCCGGCTTGAAGGTAGGACCC CGTGGTTGTGTTTGACGTCGCTGGCTTATCCCAAGCAT TATCCAGGCCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCT CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGA CTCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTT TGTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTT GCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGG CGCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTTAC TAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT CGGTTTACGATTACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGC CGTGTCTGAGGATAAAGGGACGAGGGCGGTTCGGACGGA AGGGTAGGGGACGGAGCAGTCAAGAGAGTGGTAGCTGG</p>

	ACGATTAGGATGGTTGAGGGG
2PM	CNNNCNNGAGGNGGANNNGNGAGNTAATNGTGTCNGA GGANAGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACC CCGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCA TTATCCAGGCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGC TCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCG ACTCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTATTTT TTGTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCT TGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGG GCGCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTT ACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCA ACTCGGTTTACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGT TGCCGTGTCTGAGGATAA
3PM	NNGNANGNGNCGNTGCTNTGTNTGATGAGNTGTCAGAG GCATAAGGCATAGACCCCGCGGATCCGGCTTGACGGTAG GACCCCGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCA AGCATTATCCAGGCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTG GCGCTCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCC GTCGACTCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTA TTTTTTGTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGC ATCTTGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTG AGGGCGCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGT TTTACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATG CAACTCGGTTTACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCT GTTGCCGTGTCTGAGGATAA
6LN	CCGGGGCAAGGGGGAGCGTGTCTGAGGAGAGGCCGAGT CTGAGGATAGACCCCGCGTGCCGGGCTTGAGGGTAGGAC CCCGGGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGC ATTATCCAGGCCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCG CTCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTC GACTCCTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTATTT TTTGTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATC TTGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAG GGCGCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTT TACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCA ACTCGGTTTACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGT TGCCGTGTCTGAGGATAAACTCTCTCGTGCGTGTGGG GG
8LN	TNGNNCCAANANNNNNGNGNGNNGAGTTGCCGAGTCTG AGGANATTCTGTTGCCGTGTCTGAGGATAAGACCCCGGG GTTGTGTTTCGATGCCGCTGGTTGGTTTTTGCAGGGAGCC AGGCCCAAAGACACTGTTTCACCACCCTGGCGCTCGATG AAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCAACTCCT CGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTATTTTTTGTCC ACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTGCTGC GCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGCGCGA ATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTTTACTAAAT AAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACTCGGTT

	TACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTACCATG AAAAANGATAAA
22KM	GGGGAGGGGGGAGGGGGGGGGCGGGAAGATGTGAAGT GAAGTTCTAGACGCCGTAGCGGGCTTTCATGTGGACCCC GTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCATT ATCCAGGCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTC GATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGAC TCCTCGACGTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTTT GTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTG CTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGC GCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTTACT AGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT CGGTTTACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGC CGTGTCTGAGGATAAAGGGAGTTCTGGAGCCTCCGTTTT AGGAGGG
25PM	CCGGTAATGGGTGAAGTGGCTGAGGAATACGGCGGAGG AAGGGGCTAGGGGGGAGAATCGGGCTTTCGTGTGGACCC CGTGGTTGTGTTTGACTTCGCTAGCTTATACCCAAGCATT ATCCAGGCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTC GATGAAGTGGATCTGGCCGGGCTTCAACCATCCGTCGAC TCCTCGACGTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTTT GTCCACGCCCATATTCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTG CTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGC GCGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTTACT AGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT CGGTTTACGGATTCACGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGC CGTGTCTGAGGATAAAGGGGGAGGGGGGGGGCAGGAGA GG

Nukleotidne sekvence ORF68 gena sojeva i izolata EHV-1

Sekvenciranjem 15 odabranih PCR produkata, odnosno delova ORF68 gena sojeva i izolata EHV-1 pod oznakama 2PM, 6LN, 8LN, 25PM, 22KM, 24KM, D1, D2, D3, D4, 44V, 56V, 1KM, 3PM, 21KM uspešno su dobijene 2 sekvence prikazane u Tabeli 25.

Tabela 25. Nukleotidne sekvence dela ORF68 gena izolata EHV-1

Naziv soja EHV-2	Nukleotidna sekvencija dela gB gena
D1	GGGGGGGGTGTGAGCTAGATAGAAACGGGGTGGTTTACCACGAAGA TAGAATGGGTGTGAGCATAGAGTGGCTCTCTGTACTCTCTGGCTA

	TAACCATCTCAACTCCAGCCTTATCATTAATCAGCCCTATCACCTC TGGGTGCTGGGGGCAGCAGACTTGTGCAAGCCGGTGTTTGACCTG ATACCCGGTCCTAAACGAATGGTATACGCAGAGATAGCAGATGA GTTTCATAAATCTTGGCAGCCTCCCTTCGTGTGTGGAAAACCTGTTT GAGACAATACCATGGACCACCGTTGAGCATAATCATCCGCTCAA TTAAGAGCGGCGGGTGGAGAAGACACCGTAGTGGGTGAGTGTGG GTTTTCCAAACATAGCTCGAATTCATTAGTTCATCCACCCACAGTT AAGCGGGTGATTTAGCGGTGGTCGACCCCGCGCGCCTTCGGGAAA TTCCCGCCCCGGGGCGGCCGCTGCCGCGGCGGGCGGCCGTCGGAGG GGGGGATGCGCGCCCCGAGGCGGCGCTCGCGCGCTCCCGCGCCC GCTCGGTCCACGGCCCGCCGCGACGCCGCCCGCCCCGGGGAC CCGCGGGCGCCCCGCCGCCCGGGCGGGAGACGTGACGTGGAT GGAACGCCTACTCTGGGGAGTGTTTCGGCCGGACATCCACACGTTA AAAGGTAGGGGACTCTCGCCAGTACCTCACCTCGCTTTGTGGGTT GAGCAGTGGGCGTCGGG
D4	TAACGGCACACCGTAGATAGAAACGGGGTGGTTTACCACGAAGA TAGAATGGGTGTGAGCATAGAGTGGCTCTCTGTA CTCTGGCTA TAACCATCTCAACTCCAGCCTTATCATTAATCAGCCCTATCACCTC TGGGTGCTGGGGGCAGCAGACTTGTGCAAGCCGGTGTTTGACCTG ATACCCGGTCCTAAACGAATGGTATACGCAGAGATAGCAGATGA GTTTCATAAATCTTGGCAGCCTCCCTTCGTGTGTGGAAAACCTGTTT GAGACAATACCATGGACCACCGTTGAGCATAATCATCCGCTCAA TTAAGAGCGGCGGGTGGAGAAGACACCGTAGTGGGTGAGTGTGG GTTTTCCAAACATAGCTCGAATTCATTAGTTCATCCACCCACAGTT AAGCGGGTGATTTAGCGGTGGTCGACCCCGCGCGCCTTCGGGAAA TTCCCGCCCCGGGGCGGCCGCTGCCGCGGCGGGCGGCCGTCGGAGG GGGGGATGCGCGCCCCGAGGCGGCGCTCGCGCGCTCCCGCGCCC GCTCGGTCCACGGCCCGCCGCGACGCCGCCCGCCCCGGGGAC CCGCGGGCGCCCCGCCGCCCGGGCGGGAGACGTGACGTGGAT GGAACGCCTACTCTGGGGAGTGTTTCGGCCGGACATCCACACGTTA AAAGGTAGGGGACTCTCGCCAGTACCTCACCTCGCTTTGTGGGTT GAGCAGTGTGCGCTCTT

Rezultati utvrđivanja redosleda nukleotida u regionu ORF30 genoma EHV-1

Konsenzus sekvence delova gena ORF30 sojeva i izolata EHV-1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske su primenom programa BioEdit 7.2.5 poređene sa odgovarajućim referentnim sekvencama sojeva konjskog herpesvirusa 1 preuzetim iz GenBank baze podataka. Sojevi EHV-1 upotrebljeni za navedeno poređenje su: Ab4 (G₂₂₅₄ genotip), PL/2012/II (G₂₂₅₄ genotip) i V592 (A₂₂₅₄ genotip). Sekvence dela gena ORF30 analiziranih 11 sojeva i izolata (91,67%) u ovoj studiji su posedovale neurovirulentni genetski marker (G₂₂₅₄), odnosno supstituciju adenina guaninom na

poziciji 2254 (Slika 27). Soj 6LN poreklom iz submandibularnog limfnog čvora konja iz Negotina (Borski okrug) je jedini svrstan u A₂₂₅₄ genotip. Svi neurovirulentni sojevi i izolati sa podacima o njihovom poreklu navedeni su u Tabeli 26. Analizom anamnestičkih podataka prikupljenih prilikom uzorkovanja nosnih briseva konja sa ergele “Vučijak” gde je detektovano prisustvo G₂₂₅₄ soja EHV-1 utvrđeno je da u navedenoj populaciji konja u skorijem vremenskom periodu nisu zabeleženi slučajevi pojave neurološkog oboljenja i/ili pobačaja.

	2220	2230	2240	2250	2260	2270
AY665713.1 Ab4	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTACTCGACGTTTCGAGGTG				
KR080393.1 PL/2012/II	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTACTCGACGTTTCGAGGTG				
AY464052.1 V592	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTACTCGACGTTTCGAGGTG				
D1	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
D2	CGTGAAGTGGATATGGCCGGGGCTTCAACAACCATAGATTTCCTCCACGTACGAGAGG					
D3	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
D4	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
44V	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
1KM	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
2PM	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
3PM	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
6LN	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
8LN	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
22KM	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				
25PM	CGATGAAGTGGATCTGGCCGGGGCTTCAACCATCCGTC	ACTCCTCGACGTTTCGAGGTG				

Slika 27. Analiza redosleda nukleotida parcijalnih sekvenci ORF30 gena izolata i sojeva EHV-1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske. Crvenom bojom je obeležena pozicija 2254 gde se može videti prisustvo guanina (G) kod neurovirulentnih sojeva u poređenju sa predstavnicima A₂₂₅₄ genotipa kod kojih je na istom mestu prisutan adenin (A)

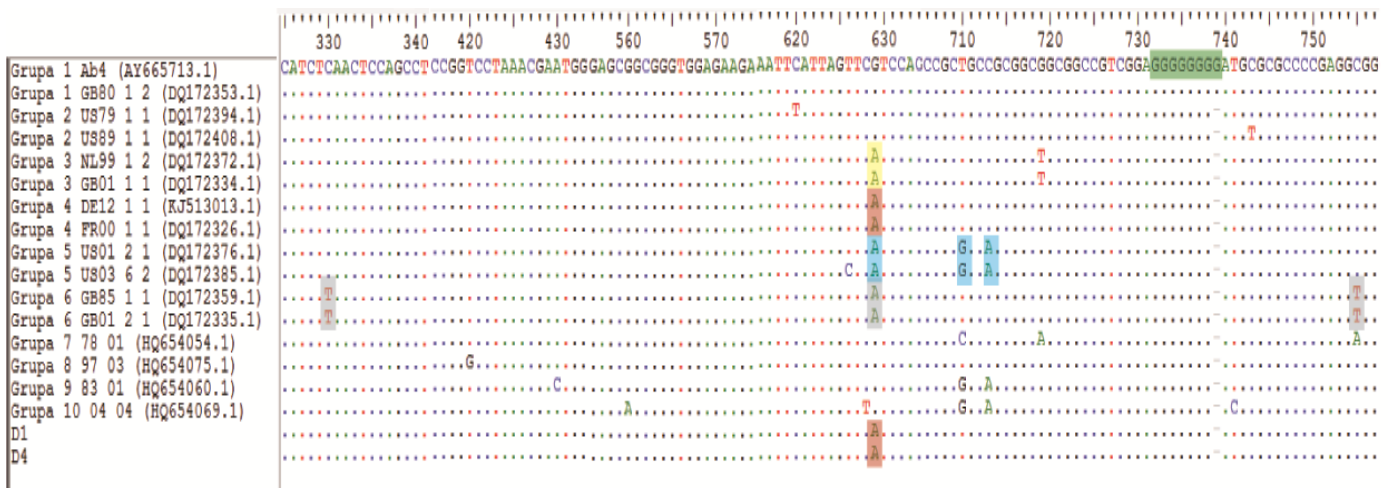
Tabela 26. Osnovni podaci o sojevima i izolatima EHV-1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske koji pripadaju G₂₂₅₄ genotipu

Naziv soja/izolata	Osnovni podaci o poreklu
D1	Arhivirani soj EHV-1 Katedre za mikrobiologiju
D2	Arhivirani soj EHV-1 Katedre za mikrobiologiju
D3	Arhivirani soj EHV-1 Katedre za mikrobiologiju
D4	Arhivirani soj EHV-1 Katedre za mikrobiologiju
44V	Nosni bris kobile, ergela “Vučijak” , Prnjavor

1KM	Uzorak kičmene moždine kobile, opština Inđija, Sremski okrug
2PM	Uzorak produžene moždine kobile, opština Inđija, Sremski okrug
3PM	Uzorak produžene moždine slezine ždrebeta, Inđija, Sremski okrug
8LN	Uzorak submandibilarnih limfnih čvorova konja, Zrenjanin, Srednjobanatski okrug
22KM	Uzorak kičmene moždine konja, Loznica, Mačvanski okrug
25PM	Uzorak produžene moždine kobile, Veliko Gradište, Braničevski okrug

Rezultati utvrđivanja redosleda nukleotida u regionu ORF68 genoma EHV-1 sa filogenetskom analizom

Sekvence delova gena ORF68 sojeva i izolata EHV-1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske su primenom programa BioEdit 7.2.5 poređene sa odgovarajućim referentnim sekvencama sojeva konjskog herpesvirusa 1 preuzetim iz GenBank baze podataka, odnosno sa predstavnicima 10 geografskih grupa (Slika 28). Sekvence delova ORF68 gena izolata D1 i D4 poseduju mutacije na nivou pojedinačnih nukleotida koje su karakteristične za sojeve EHV-1 koji pripadaju četvrtoj geografskoj grupi. Ostale dobijene sekvence (ukupno 13) su posedovale preveliki broj mutacija na osnovu čije analize se nisu mogle svrstati ni u jednu geografsku grupu i zbog preglednijeg prikaza rezultata nisu prikazane na slici. Na osnovu dobijenih sekvenci dela gena ORF68, formirano je filogenetsko stablo (Slika 29).



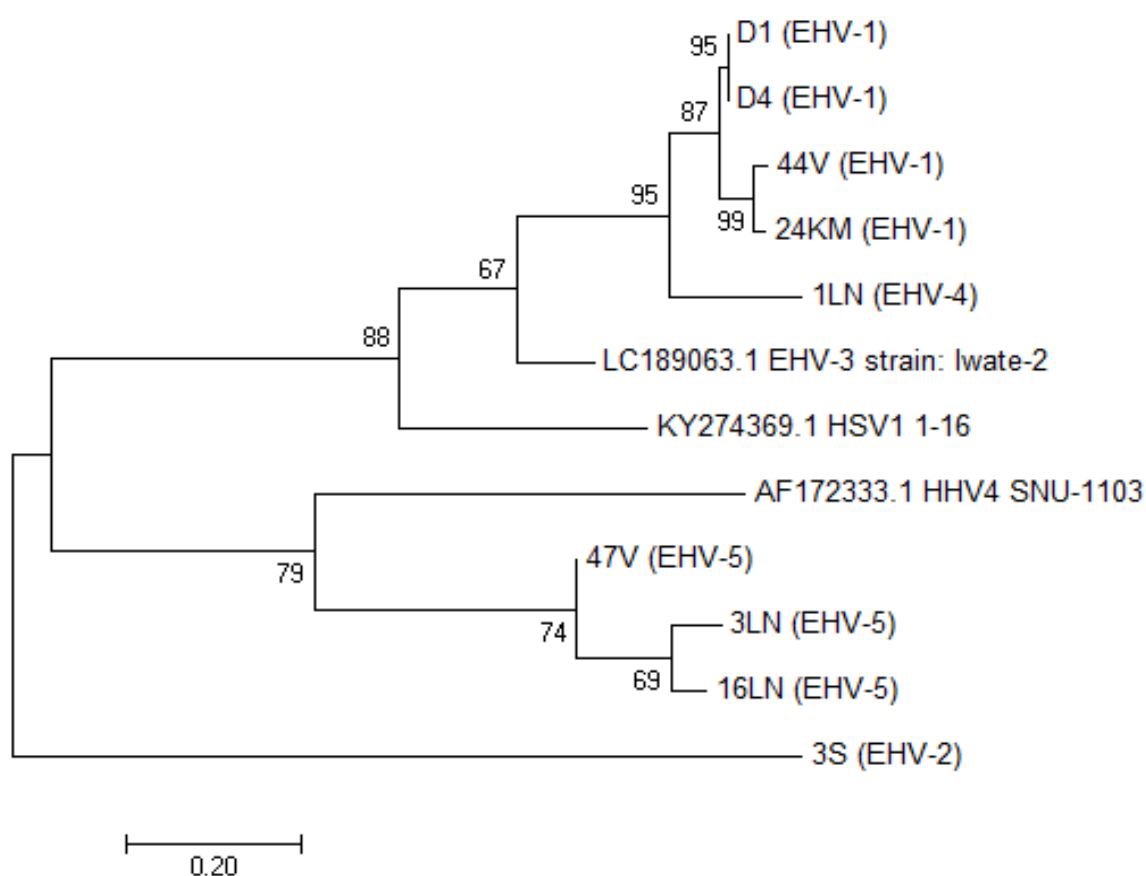
Slika 28. Analiza redosleda nukleotida parcijalnih sekvenci ORF68 gena izolata D1 i D4 u poređenju sa predstavnicima 10 geografskih grupa EHV-1. Bojama su obeležene mutacije na nivou pojedinačnih nukleotida karakteristične za pojedinačne grupe, a tačkama su određene nukleotidne sekvence koje se po položaju poklapaju sa referentnom sekvencom soja Ab4 EHV-1.



Slika 29. Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci ORF68 gena arhiviranih sojeva D1 i D4 i sekvenci 16 predstavnika 10 geografskih grupa EHV-1 preuzetih iz međunarodne banke gena (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

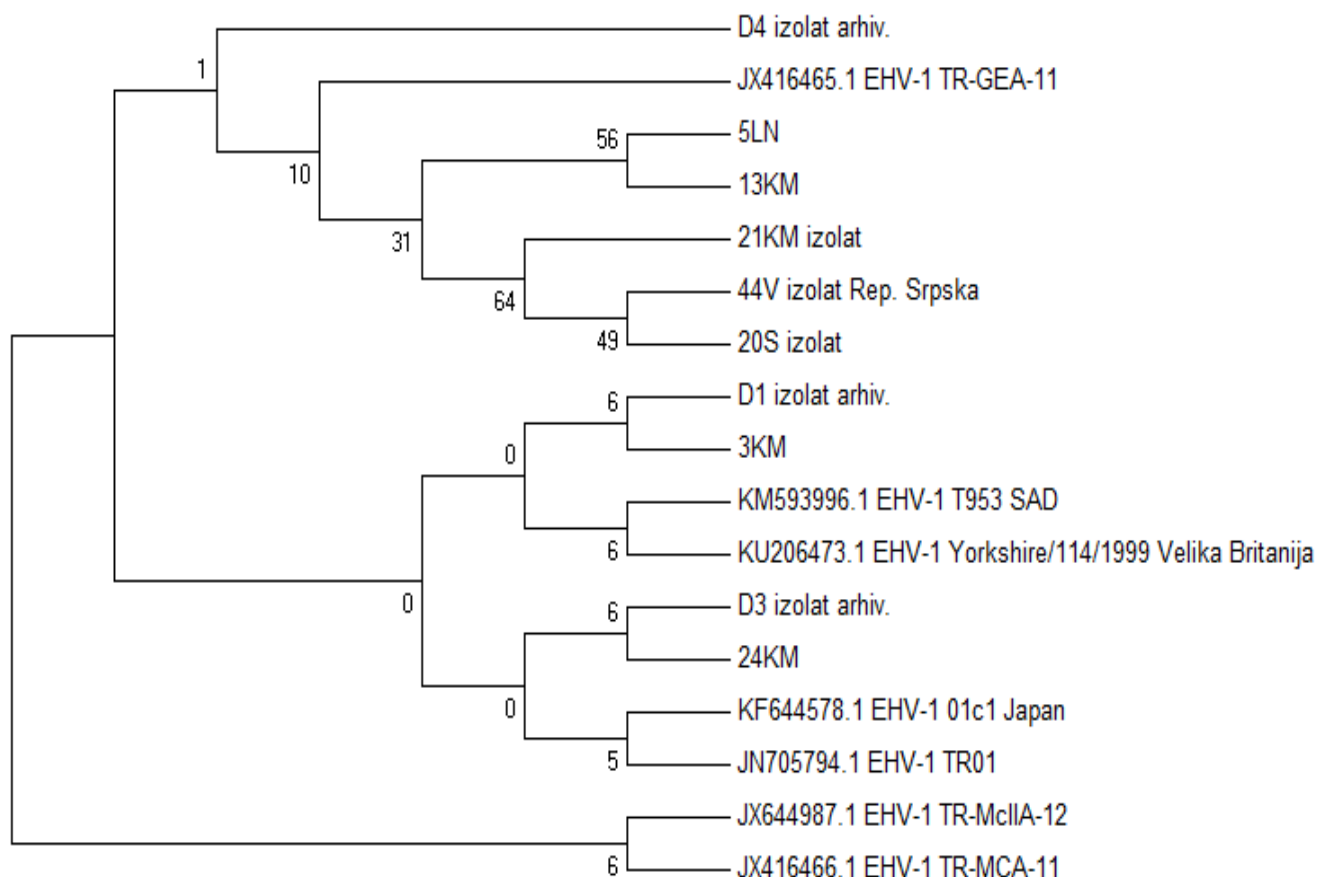
Filogenetska analiza izolata i sojeva konjskih herpesvirusa poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske

Na filogenetskom stablu formiranom na osnovu poređenja sekvenci gB gena odabranih sojeva i izolata konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama predstavnika podfamilija *Alphaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* ustanovljeno je grupisanje prema pripadnosti jednoj od navedenih podfamilija (Slika 30).



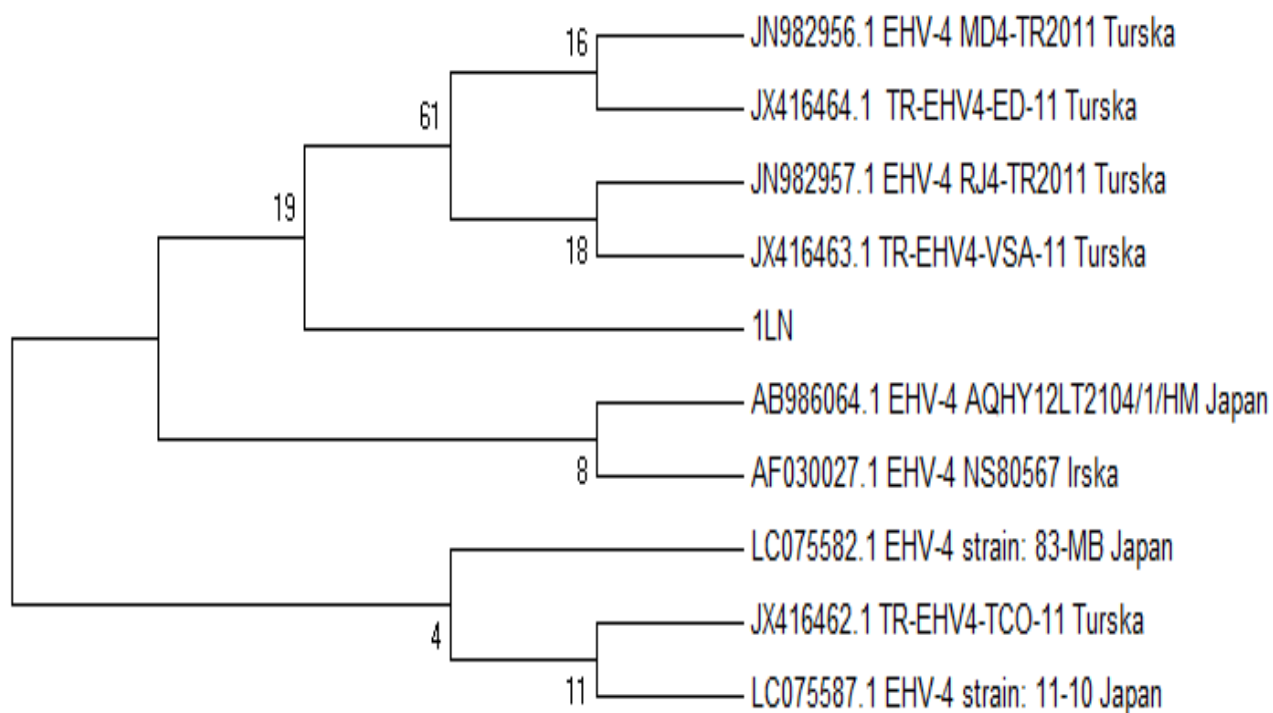
Slika 30. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gB gena sojeva/izolata EHV-1 (D1, D4, 44V, 24KM), EHV-4 (1LN), EHV-2 (3S) i EHV-5 (47V, 3LN, 16LN) iz Republike Srbije i Republike Srpske sa analognim sekvencama virusa iz podfamilija *Alphaherpesvirinae* (EHV-3, HSV-1) i *Gammaherpesvirinae* (HHV-4) (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

Analizom filogenetskog stabla formiranog poređenjem sekvenci delova gB gena odabranih sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama navedenog gena EHV-1 iz međunarodne banke gena utvrđeno je grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske, Velike Britanije, SAD i Japana (Slika 31).



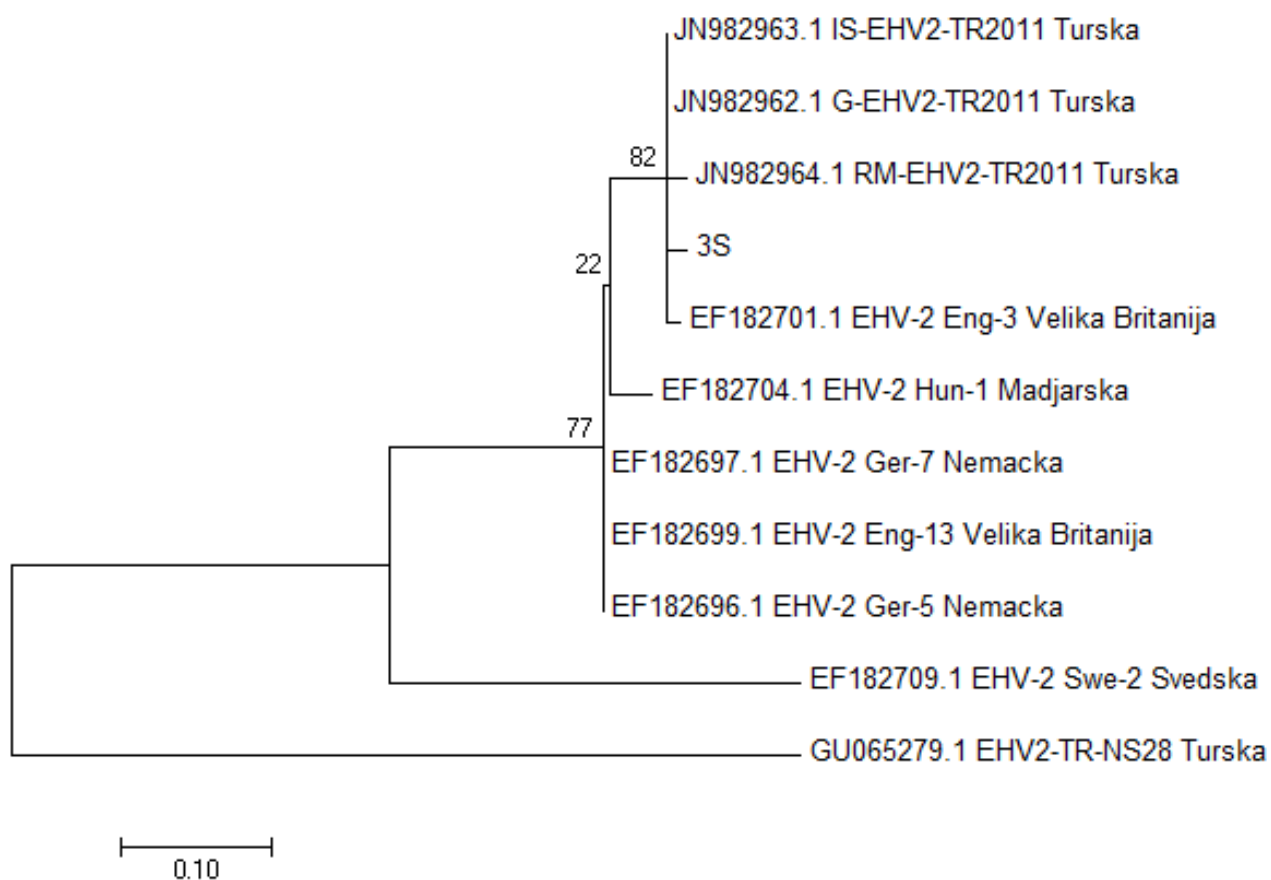
Slika 31. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gB gena sojeva/izolata EHV-1 (D1, D3, D4, 3KM, 5LN, 13KM, 20S, 21KM, 44V, 24KM) iz Republike Srbije i Republike Srpske sa analognim sekvencama virusa preuzetim iz međunarodne banke gena (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

Na filogenetskom stablu koje je sastavljeno na osnovu dela gB gena konjskog herpesvirusa 4 (Slika 32) soj 1LN EHV-4 poreklom iz Republike Srbije je grupisan sa turskim sojevima navedenog virusa, a odvojeno od sojeva iz Irske i Japana.



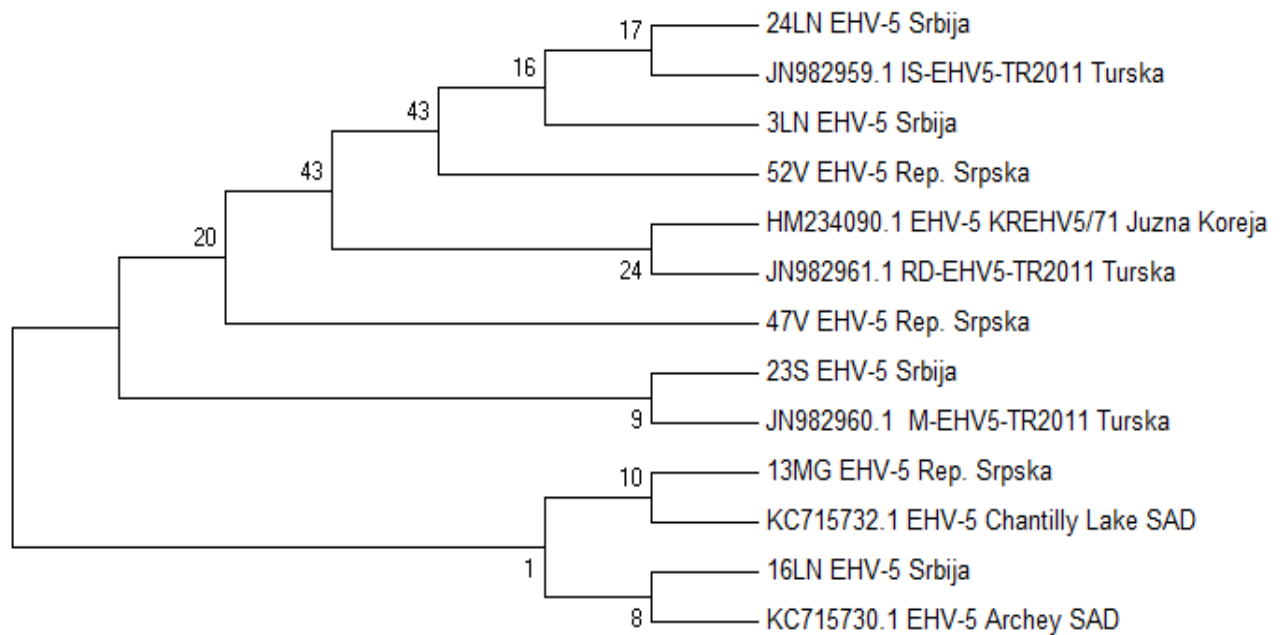
Slika 32. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gB gena soja EHV-4 (1LN) iz Republike Srbije sa analognim sekvencama virusa preuzetim iz međunarodne banke gena (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

Na filogenetskom stablu formiranom na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci dela gB gena soja konjskog herpesvirusa 2 3S poreklom iz Republike Srbije sa sekvencama sojeva iz međunarodne banke gena ustanovljeno je grupisanje sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike Britanije, dok su sojevi iz drugih evropskih zemalja (Mađarska, Nemačka, Švedska) odvojeni od navedene grupe (Slika 33).



Slika 33. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gB gena soja EHV-2 (3S) iz Republike Srbije sa analognim sekvencama virusa preuzetim iz međunarodne banke gena (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

Uvidom u filogenetsko stablo sastavljeno na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci delova gB gena odabranih sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama navedenog gena EHV-5 iz međunarodne banke gena zapaža se grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske i SAD (Slika 34).



Slika 34. Filogenetsko stablo na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gB gena sojeva/izolata EHV-5 (3LN, 16LN, 23S, 24LN, 13MG, 47V, 52V) iz Republike Srbije i Republike Srpske sa analognim sekvencama virusa preuzetim iz međunarodne banke gena (algoritam: Maximum likelihood method, program MEGA 7)

6. DISKUSIJA

Izolacija virusa na kulturi tkiva praćena njegovom identifikacijom primenom standardnih ili molekularnih dijagnostičkih metoda predstavlja standardnu proceduru za dijagnostiku herpesvirusnih infekcija konja, pri čemu je RK-13 ćelijska linija jedna od najčešće korišćenih u svrhu detekcije EHV-1, EHV-2 i EHV-5 (Dunowska i sar., 1999; Williams et al. 2007; Diallo et al. 2008; OIE 2008; Ataseven et al. 2010). U cilju detekcije prisustva konjskih herpesvirusa u uzorcima organa i nosnih briseva konja poreklom iz Srbije i Republike Srpske korišćena je pomenuta ćelijska linija, pri čemu su izolovani virusi EHV-1 i EHV-5. Ukupno je ispitivano 212 uzoraka kliničkog materijala poreklom od konja, pri čemu je posle pojedinačne inokulacije 79 uzoraka (51 uzorka organa i 28 uzoraka nosnih briseva) u ćelijske linije RK-13 ustanovljena pojava karakterističnog citopatogenog efekta (CPE) sa zaokrugljavanjem i skupljanjem ćelija, odvajanjem ćelija od podloge, a u nekim slučajevima i formiranjem višejedarnih sincicijuma. Citopatogeni efekat u inokulisanim ćelijskim linijama je utvrđen posle prve pasaže ukupno 27 uzoraka ispitivanog materijala (34,18%), druge pasaže 44 inokulisana uzorka (55,7%) i treće pasaže ukupno 8 inokulisanih uzoraka (10,13%).

Konjski herpesvirus 1 je izolovan iz ukupno 72 uzorka, pri čemu je njegova identifikacija izvršena primenom VN testa i metode direktne imunofluorescencije, međutim kako se u obe procedure upotrebljava poliklonski imuni serum, rezultati su potvrđeni primenom lančane reakcije polimeraze. Ćelijska linija RK-13 se može koristiti za izolaciju konjskog herpesvirusa 1, što je i potvrđeno u mnogim studijama, pri čemu je često upotrebljavana kao metoda eliminacije prisustva EHV-4 u ispitivanom uzorku, s obzirom da pomenuti virus, iako srodan sa EHV-1, ispoljava veći afinitet prema ćelijskim linijama konjskog porekla (Ballagi-Pordany i sar., 1990; Welch i sar., 1992; Edington i sar., 1994; Heldens i sar., 2001; Gryspeerdt i sar., 2011; OIE, 2008). Kod preostalih 7 izolata je primenom metode lančane reakcije polimeraze potvrđeno prisustvo nukleinske kiseline konjskog herpesvirusa 5. Izolati EHV-5 poreklom iz organa (dva izolata iz limfnih čvorova i dva izolata iz slezine konja) doveli su do pojave CPE na ćelijskoj liniji RK-13 u 3. pasaži suspektnog materijala. Citopatogeni efekat preostala tri izolata EHV-5 iz nosnih briseva konja detektovan prilikom druge pasaže kroz navedenu ćelijsku liniju. Dunowska i sar. (1999) su ispitivali uzorke nosnih briseva

i leukocita konja na prisustvo konjskih herpesvirusa primenom ćelijskih linija RK-13, Vero i EFK (*eng.* equine fetal kidney; fetalni bubreg konja). Posle tri sedmodnevne pasaže suspektne materijala, autori su zabeležili pojavu karakterističnog CPE, pri čemu je primenom metode lančane reakcije polimeraze izvršena identifikacija konjskog herpesvirusa 5. U navedenom ispitivanju je najveći broj sojeva pomenutog virusa izolovan na RK-13 ćelijskoj liniji. Konjski herpesvirusi 2 i 5 u velikom broju slučajeva veoma sporo dovode do pojave citopatogenog efekta u inokulisanim ćelijskim linijama, pri čemu njihova izolacija nije uvek uspešna (Reubel i sar., 1995; Dunowska i sar., 2002; Wang i sar., 2007; Williams i sar., 2007; Diallo i sar., 2008). U ispitivanju Diallo i sar. (2008) konjski herpesvirus 5 je izolovan iz uzoraka nosnih briseva ždrebadi posle 4 sukcesivne pasaže u ćelijskim linijama RK-13 i ED.

Prilikom identifikacije izolata herpesvirusa primenom lančane reakcije polimeraze u ovoj doktorskoj disertaciji ni u jednom uzorku nisu detektovane nukleinske kiseline EHV-2 i EHV-4. Nasuprot tome, primenom metode Nested multiplex PCR u direktnom dokazivanju prisustva virusnih nukleinskih kiselina u ispitivanim uzorcima, EHV-2 je identifikovan u 4, a EHV-4 u 11 uzoraka i to u okviru mešovitih infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5. Veliki broj literaturnih podataka pokazuje da ćelijska linija RK-13 nije pogodna za izolaciju konjskog herpesvirusa 4, što je potvrđeno i u ovoj doktorskoj disertaciji. U studiji Diallo i sar. (2008) detektovana je infekcija konjskim herpesvirusom 4 kod ždrebadi sa simptomima respiratornog oboljenja primenom metode real-time PCR, pri čemu je izolacija navedenog virusa pokušana u ćelijskim linijama Vero, BHK-21, i ED. Pojava karakterističnog citopatogenog efekta EHV-4 zabeležena je samo u ćelijama konjskog porekla. Ploszay i sar. (2013) opisuju prvu uspešnu izolaciju EHV-4 u Poljskoj primenom ćelijske linije Vero, međutim zabeležena je značajno manja osetljivost navedene standardne virusološke metode u poređenju sa primenjenim molekularnim metodama PCR i real-time PCR. Navedeni autori, slično Heldens i sar. (2001), razmatraju da bi se osetljivost metode izolacije EHV-4 povećala primenom ćelijskih linija poreklom od konja. Pored toga, još jedan od važnih faktora vezanih za uspešnu detekciju i izolaciju konjskog herpesvirusa 4 predstavlja sakupljanje uzoraka, odnosno dužina trajanja njihovog transporta (Diallo i sar., 2008; Ploszay i sar., 2013), što je u nekim slučajevima u ovoj studiji moglo da utiče na dobijanje adekvatnih rezultata, naročito prilikom uzorkovanja

vršenog u toplijem periodu godine. Neuspešna izolacija konjskog herpesvirusa 2 može se objasniti malom prevalencijom navedenog virusa u populaciji starijih konja od kojih je poticao veći broj uzoraka u ovoj doktorskoj disertaciji (Dunowska i sar., 2002; Nordegrahn i sar., 2002; Bell i sar., 2006; Hue i sar., 2014). Pored toga, postoji velika verovatnoća da je EHV-2 u ispitivanim uzorcima bio prisutan u latentnoj formi. Metoda reaktivacije latentno prisutnih konjskih herpesvirusa, a naročito EHV-2, obuhvata kokultivaciju ispitivanih uzoraka sa osetljivom ćelijskom linijom, npr. RK-13 ili EEK (Slater i sar., 1994; Reubel i sar., 1995; Franchini i sar., 1997; Bell i sar., 2006). U ispitivanjima u okviru ove doktorske disertacije nije vršena metoda kokultivacije suspektnog materijala sa RK-13 ćelijskom linijom, već su svi ispitivani uzorci inokulisani u navedenu ćelijsku liniju prethodno pripremani filtracijom dobijenih supernatana dobijenih posle njihove obrade. Konjski herpesvirus 2 je u našim ispitivanjima detektovan isključivo primenom metode PCR i to u kičmenoj moždini, produženoj moždini, slezini i submandibularnim limfnim čvorovima jednog ždrebeta. U pomenutim uzorcima je detektovana mešovita infekcija sa EHV-2 i EHV-1 i/ili EHV-5, pri čemu je EHV-1 izolovan iz 3 od 4 pomenuta uzorka što se može objasniti i prisustvom većih količina ovog virusa u ispitivanim uzorcima koji je svojim umnožavanjem sprečio replikaciju EHV-2. S druge strane, u studiji Edington i sar. (1994) je primenom metode kokultivacije iz iste vrste uzoraka u najvećem broju slučajeva izolovan EHV-2 bez obzira na prisustvo mešovite infekcije sa EHV-1 i/ili EHV-4 koji su iz istih uzoraka uspešno izolovani tek ponovljenim postupkom izolacije iz istih uzoraka. Banbura i sar. (2006) su ispitivali uzorke krvi poreklom od klinički zdravih kobilica na prisustvo EHV-1 i EHV-2 primenom metode nested PCR, izolacije virusa na kulturi ćelija i metodom kokultivacije. Za razliku od naših rezultata, iz uzoraka koji su bili pozitivni na prisustvo oba virusa primenom navedene molekularne metode uspešno je izolovan samo EHV-2. S obzirom da EHV-1 nije izolovan ni iz jednog uzorka, autori su ukazali da EHV-2 najverovatnije nema značajnu ulogu u njegovoj reaktivaciji u *in vitro* uslovima, kao ni u patogenezi oboljenja koja izaziva.

Svi uzorci nosnih briseva i organa konja u ovim ispitivanjima su pored metode izolacije virusa na kulturi ćelija ispitivani i primenom metode Nested multiplex PCR. Čijom primenom je zabeležen veliki broj mešovitih infekcija sa dva ili više konjskih herpesvirusa. U poređenju sa izolacijom virusa na kulturi ćelija koja je bila uspešna kod

ukupno 79 uzoraka (37,26%), primenom Nested multiplex PCR identificovano je ukupno 162 pozitivna uzorka (76,42%). Lančana reakcija polimeraze predstavlja pouzdanu metodu za laboratorijsku dijagnostiku virusnih infekcija, pri čemu je njena primenljivost potvrđena u velikom broju istraživanja vezanih za herpesvirusne infekcije konja (Nordegrahn i sar., 2002; Wang i sar., 2007; Torfason i sar., 2008; Ataseven i sar., 2009; Ataseven i sar., 2013). Klasične virusološke metode su manje ekonomične i njihovo izvođenje često zahteva dugačak vremenski period, što nije primenljivo u kliničkoj praksi kada je potrebno brzo dobijanje rezultata ispitivanja. Pored toga, virusi kao što su EHV-2 i EHV-5 veoma sporo dovode do pojave citopatogenog efekta na ćelijskoj kulturi, dodatno produžavajući vreme za dobijanje konačne dijagnoze (Dunowska i sar., 2002; Williams i sar., 2007; Diallo i sar., 2008). Metoda Nested multiplex PCR je osetljiv i specifičan test za simultanu identifikaciju većeg broja različitih konjskih herpesvirusa u ispitivanim uzorcima, čime se dodatno ubrzava dijagnostika pomenutih infekcija konja (Diallo i sar. 2007; Wang i sar. 2007; Ataseven i sar. 2009; Negussie i sar. 2017). Mogućnost primene navedene metode za detekciju i diferencijaciju EHV-1 i EHV-4 među prvima opisuju Kirisawa i sar. (1993) koji pri tom utvrđuju potpuno slaganje između rezultata izolacije virusa na kulturi ćelija i Nested multiplex PCR. Protokol prema Wang i sar. (2007) koji je korišćen i u ovoj studiji, uspostavljen je u cilju simultane identifikacije konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 u kliničkim uzorcima poreklom od konja. U studiji navedenih autora, slično kao i u našem ispitivanju, Nested multiplex PCR je korišćen za analizu uzoraka nosnih briseva konja sa i bez klinički manifestnih simptoma respiratornog oboljenja. U ovoj doktorskoj disertaciji potvrđena je osetljivost i specifičnost pomenute multiplex PCR tehnike i slično rezultatima Wang i sar. (2007) pokazala se osetljivijom od izolacije virusa u kulturi ćelija. U studiji Ataseven i sar. (2009) dokazana je primenljivost pomenute metode u cilju detekcije mešanih respiratornih infekcija konja izazvanih EHV-1 i EHV-4. Autori su takođe dokazali veću osetljivost Nested multiplex PCR u detekciji pomenutih virusa kod konja sa respiratornim simptomima u odnosu na primenjene standardne virusološke metode. Pored toga, rezultati našeg ispitivanja se podudaraju sa zaključkom Ataseven i sar. (2013) koji su potvrdili osetljivost i specifičnost Nested multiplex PCR u detekciji i diferencijaciji EHV-1 i EHV-5 iz uzoraka nosnih briseva i leukocita konja. Potrebno je napomenuti da je u ovoj studiji, uprkos tome što je

primenom metode Nested multiplex PCR detektovan veći broj pozitivnih uzoraka nego primenom klasičnih virusoloških metoda, iz ukupno 8 uzoraka organa koji su bili negativni na prisustvo nukleinskih kiselina ispitivanih virusa uspešno izolovan EHV-1. Navedeni rezultat se može objasniti mogućnošću postojanja PCR inhibitora u reakciji, a pored toga je poznato da prilikom ekstrakcije nukleinskih kiselina iz uzoraka biološkog porekla može doći do gubitka ciljane DNK. U oba pomenuta slučaja dolazi do lažno negativnih rezultata reakcije. S obzirom na navedene mogućnosti, u multiplex PCR protokolima se mogu koristiti interne kontrole, što nije izvedeno u ovom ispitivanju (Markoulatos i sar. 2000).

Primenom Nested multiplex PCR je uspešno detektovan veliki broj mešovitih infekcija iz različitih vrsta uzoraka. U uzorcima organa konja zabeležene su infekcije sa dva ili više konjskih herpesvirusa, pri čemu su EHV-1 i EHV-4 bili simultano prisutni u sva četiri ispitivana tkiva. Mešovite infekcije konjskim herpesvirusima 1 i 2 su pronađene u po jednom uzorku kičmene, odnosno produžene moždine jednog ždrebeta, dok su dva navedena virusa zajedno sa EHV-5 detektovana u uzorcima limfnih čvorova i slezine iste životinje. Pored toga, EHV-5 je bio prisutan u okviru mešovite infekcije sa EHV-1 u ukupno 5 uzoraka slezine i limfnih čvorova. Mešovite infekcije različitim herpesvirusima su bile prisutne i u uzorcima nosnih briseva, pri čemu su simultano detektovani EHV-1 i EHV-4 odnosno EHV-1 i EHV-5. Reubel i sar. (1995) potvrđuju da je multiplex PCR brza i pouzdana metoda za detekciju mešovitih infekcija sa gamaherpesvirusima konja, a slično navedenim autorima, u novijoj studiji Negussie i sar. (2017) detektuju veliki broj mešovitih infekcija konjskim herpesvirusima 2 i 5 u nosnim brisevima u punoj krvi konja primenom Nested multiplex PCR.

U ispitivanim organima konja prisustvo EHV-1 je primenom Nested multiplex PCR detektovano u ukupno 86 uzoraka, pri čemu je nukleinska kiselina pomenutog virusa bila u najzastupljenija u limfnim čvorovima (26,74%), dok je u ostalim tkivima bila ujednačeno zastupljena (po 24,42%). S druge strane, najveći broj izolata navedenog virusa bio je poreklom iz uzoraka kičmene moždine, a zatim iz slezine i submandibularnih limfnih čvorova. Slater i sar. (1994) su pomoću metode lančane reakcije polimeraze identifikovali prisustvo EHV-1 u limfoidnim tkivima, leukocitima iz pune krvi, kao i u uzorcima trigeminalnih ganglija konja. Primenom metode PCR, nukleinska kiselina EHV-1 je otkrivena u svim ispitivanim uzorcima (limfoidno tkivo,

leukociti, trigeminalne ganglije), međutim metodom kokultivacije sa RK-13 ćelijskom linijom, do umnožavanja virusa došlo je samo u uzorcima trigeminalnih ganglija. Navedeni istraživači izvode zaključak je limfoidno tkivo od manjeg značaja od trigeminalnih ganglija kada je u pitanju reaktivacija EHV-1. Edington i sar. (1994) su ispitivali prevalenciju latentnih infekcija konjskim herpesvirusima u različitim tkivima poreklom od konja i u navedenom istraživanju, za razliku od naših rezultata, EHV-1 nije izolovan ni iz jednog uzorka nervnog tkiva. Prilikom prisustva EHV-1 u uzorcima submandibularnih limfnih čvorova i trigeminalnih ganglija ukupno 153 konja primenom PCR, Pusterla i sar. (2010) su zabeležili značajno veću prevalenciju pomenutog virusa u nervnom (12,4%) nego u limfoidnom tkivu (3,3%). U našem ispitivanju konjski herpesvirus 4 bio je prisutan u uzorcima limfoidnog i nervnog tkiva u 3,49% i 2,33% pozitivnih uzoraka detektovanih primenom metode Nested multiplex PCR. Welch i sar. (1992) su ispitivanjem različitih tkiva konja primenom metode lančane reakcije polimeraze takođe detektovali mešovite infekcije sa EHV-1 i EHV-4 isključivo u limfoidnom tkivu (različitim limfnim čvorovima i slezini), navodeći pri tom veću efikasnost PCR u detekciji navedenog virusa. Neurotropizam konjskog herpesvirusa 4 dokazan je i u istraživanju Borchers i sar. (1997) koji su primenom direktne *in situ* PCR metode dokazali prisustvo nukleinske kiseline EHV-4 u uzorcima trigeminalnih ganglija konja. U studiji Edington i sar. (1994) konjski herpesvirus 2 je izolovan iz više od 75% ispitanih uzoraka limfnih čvorova od ukupno 40 konja. Rizvi i sar. (1997) su ispitivali distribuciju EHV-2 u nervnom i limfoidnom tkivu 12 konja primenom metode PCR. Nukleinska kiselina EHV-2 je utvrđena u limfnim čvorovima većine konja pri čemu je identifikovana i u centralnom nervnom sistemu, kao i u trigeminalnim ganglijama kod 50% životinja ukazujući na značaj pomenutih tkiva u ostvarivanju latentne infekcije ovog virusa. U našem ispitivanju prisustvo EHV-5 je primenom Nested multiplex PCR potvrđeno u samo u uzorcima submandibularnih čvorova i slezine i to u 15,91% od ukupnog broja pozitivnih uzoraka limfoidnog tkiva. Nukleinska kiselina EHV-2 je detektovana u svim uzorcima nervnog i limfoidnog tkiva poreklom od jedne životinje. Torfason i sar. (2008) su ispitivali 52 uzorka različitih organa konja primenom semi-nested PCR metode za detekciju i diferencijaciju konjskih herpesvirusa 2 i 5, uključujući i uzorke slezine i limfnih čvorova. Za razliku od navedenih rezultata dobijenih u okviru ove disertacije, ispitivanja drugih autora su pokazala da je u

organima klinički zdrave ždrebadi i odraslih konja konjski herpesvirus 2 bio više zastupljen od EHV-5 što može da zavisi i od uzrasta ispitivanih životinja s obzirom na veću prevalenciju EHV-2 kod mlađih kategorija konja (Hue i sar., 2014).

Ispitivanjem uzoraka nosnih briseva konja primenom metoda izolacije virusa na kulturi ćelija i Nested multiplex PCR detektovano je ukupno 28, odnosno 76 pozitivnih uzoraka. Izolacija herpesvirusa iz uzoraka nosnih briseva konja u velikom broju slučajeva nije uspešna s obzirom na osetljivost virusa, prisustvo virus neutralizujućih antitela u nosnom sekretu, moment uzorkovanja, kao i količinu vijabilnih viriona neophodnih za formiranje vidljivog CPE na ćelijskoj kulturi. Lančana reakcija polimeraze iz navedenog razloga u nekim situacijama predstavlja metodu izbora jer može biti podjednako, a često i više osetljiva od standardnih metoda detekcije virusa (van Maanen, 2002; Hussey i sar., 2006; Wang i sar., 2007; Perkins i sar., 2009). Odsustvo kliničkih simptoma kod većine životinja iz čijih nosnih briseva je uspešno izolovan EHV-1 ili EHV-5 u ovoj studiji se može objasniti na više načina. Konjski herpesvirusi su prisutni u nosnom sekretu životinja često i više od od 4 nedelje posle infekcije pri čemu u tom periodu klinički simptomi respiratornog oboljenja ne moraju biti prisutni. Pored toga, navedeni konji mogu predstavljati latentno inficirane jedinke kod kojih je došlo do reaktivacije virusa bez klinički manifestnih simptoma (Burrows i Goodridge, 1984; Gilkerson i sar., 1999a; Foote i sar., 2004; Patel i Heldens 2005; Pusterla i sar., 2005; Pusterla i sar., 2010; Slater i sar., 2014). U nosnim brisevima poreklom od konja iz individualnih gazdinstava sa teritorije Republike Srbije primenom Nested multiplex PCR identifikovano je prisustvo EHV-1 i EHV-4 u ukupno 24 uzorka, pri čemu je EHV-4 detektovan u okviru mešovite infekcije u nosnom brisu poreklom od jednog konja. Sve pomenute životinje su držane zajedno u manjim grupama, pri čemu su preostali ispitivani uzorci koji su bili negativni poticali od konja koji su držani pojedinačno u individualnim gazdinstvima ili su bili slobodni na ispaši. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u potpunosti bili u skladu sa poznatim činjenicama vezanim za epizootiološke karakteristike herpesvirusnih infekcija konja. Konjski herpesvirusi 1 i 4 se u populaciji konja brzo šire direktnim i indirektnim kontaktom pri čemu uloga aerosola u prenošenju ovih infekcija zavisi od količine oslobođenog infektivnog virusa, klimatskih uslova, provetrenosti prostorija u kojima se konji nalaze kao i udaljenosti među životinjama. Širenje ovih infekcija indirektnim

putem ima najveći značaj kod konja koji se drže u malom ili zatvorenom prostoru (Friday i sar., 2000; Van Maanen, 2002; O'Callaghan i Osterrieder, 2008; Slater, 2014). Slični rezultati su dobijeni i ispitivanjem uzoraka nosnih briseva konja poreklom iz Republike Srpske. U grupi od 20 bosanskih brdskih konja sa jednog individualnog gazdinstva detektovana je nukleinska kiselina EHV-5 u nosnim brisevima 6 životinja starosti od 2 do 5 godina, dok je kod preostalih 14 nosnih briseva konja starosti od 2 meseca do 14 godina utvrđeno prisustvo EHV-1. Od ukupno 42 uzorka nosnih briseva lipicanera sa ergele "Vučijak" ispitivanih metodom Nested multiplex PCR, 32 uzorka su bila pozitivna na prisustvo nukleinskih kiselina EHV-1 i/ili EHV-5. U prvoj grupi od ukupno 16 konja držanih u jednoj štali, EHV-1 je identifikovan u nosnim brisevima 15 klinički zdravih kobila, dok je prisustvo EHV-5 utvrđeno u nosnom brisu jedne omice sa kliničkim simptomima respiratornog oboljenja. U nosnim brisevima druge grupe od ukupno 16 kobila držanih zajedno EHV-1 je detektovan u 14, a EHV-5 u 9 uzoraka konja starosti od 6 do 8 godina. Mešovita infekcija sa dva pomenuta virusa bila prisutna u nosnim brisevima 7 konja. Treću grupu konja činili su pastuvi držani odvojeno od pomenutih kobila starosti od 8 do 17 godina u čijim uzorcima nosnih briseva nije detektovano prisustvo nijednog od ispitivanih herpesvirusa konja. Navedeni rezultati se slažu sa rezultatima drugih autora koji tvrde da upravo populacija kobila i ždrebadi predstavlja rezervoar EHV-1 u velikim grupama konja (Gilkerson i sar., 1999a; Foote i sar., 2004).

Uzimajući u obzir starost svih konja u ovom ispitivanju (8 meseci do 27 godina), prisustvo konjskih gamaherpesvirusa je utvrđeno kod mlađih kategorija konja, pri čemu je EHV-2 identifikovan u uzorcima poreklom od jednog ždrebeta starog 8 meseci, dok je EHV-5 detektovan iz uzoraka organa i nosnih briseva konja starosti od 8 meseci do 8 godina. Veliki broj ispitivanja drugih autora pokazuje slične rezultate dovodeći u vezu uzrast konja sa infekcijama pomenutim virusima. Nordengrahn i sar. (2002) su dokazali visoku prevalenciju EHV-2 i EHV-5 u populacijama konja u Švedskoj, Mađarskoj i Velikoj Britaniji primenom PCR sa prajmerima za deo gena koji kodira sintezu glikoproteina H (gH) EHV-2, odnosno EHV-5. Konjski herpesvirus 2 je identifikovan kod 93% uzorka nosnih briseva ispitivanih konja, dok je ustanovljena prevalencija EHV-5 bila značajno niža i kretala se od 15 do 24%. Pored toga, utvrđeno je da do infekcije konjskim herpesvirusom 2 dolazi u uzrastu između 6 i 8 nedelja, dok je

prisustvo EHV-5 detektovano nešto kasnije, kod ždrebadi uzrasta od 4 do 6 meseci. Slično, Dunowska i sar. (2002) zaključuju da do infekcije konjskim gamaherpesvirusima dolazi u prvih nekoliko meseci života konja. Konjski herpesvirus 5 je identifikovan u uzrocima leukocita i nosnih briseva 78% ždrebadi i 47% odraslih konja u ispitivanju Wang i sar. (2007), dok je EHV-2 detektovan u kod 30% ždrebadi od kojih su kod većine bili ispoljeni simptomi respiratornog oboljenja. Marenzoni i sar. (2010) potvrđuju rezultate ispitivanja starosne prevalencije infekcija konjskim herpesvirusom 5 dobijene u drugim studijama. Zastupljenost EHV-5 u nosnim brisevima i leukocitima mladih konja u ispitivanju pomenutih autora iznosila je 73,3%, odnosno 80%, dok je kod starijih kategorija životinja navedeni virus detektovan u 20% uzoraka krvi i 40% nosnih briseva. Bell i sar. (2006) su u svojim istraživanjima ustanovili da je pored dokazane visoke prevalencije prisustva EHV-2 i EHV-5 u ispitivanoj populaciji konja, nalaz EHV-2 u uzorcima nosnih briseva bio češći kod mlađih životinja, dok se infekcija konjskim herpesvirusom 5 uglavnom pojavljivala nekoliko meseci kasnije u periodu kada ždrebadi češće dolaze u kontakt sa drugim konjima. Slično, Negussie i sar. (2017) su ustanovili visoku prevalenciju infekcije konjskim herpesvirusom 5 kod konja mlađih od 3 godine. Hue i sar. (2014) takođe dovode u vezu uzrast konja sa detekcijom pomenutih virusa. Prisustvo EHV-2 je bilo češće kod najmlađih kategorija konja, pri čemu su i prevalencija infekcije i količina detektovanog virusa opadali sa starošću životinja. Autori su pokazali da prevalencija EHV-5 u populaciji raste u prvih nekoliko meseci života, pri čemu prilikom poređenja starijih i mlađih kategorija konja nema razlika u količinama izlučenog virusa. Laabassi i sar. (2017) ispituju prisustvo konjskih herpesvirusa u ukupno 100 nosnih briseva konja uzrasta od 1 do 27 godina primenom metode real-time PCR pri čemu su ustanovili da je 97,3% konja starosti do 3 godine inficirano konjskim herpesvirusom 5 i da prevalencija navedene infekcije kao i količina izlučenog virusa opadaju sa starošću životinja.

Nalaz konjskog herpesvirusa 2 u uzorcima poreklom od samo jednog konja od ukupno 212 ispitanih uzoraka primenom metode Nested multiplex PCR se pored većeg broja starijih konja u našoj studiji može objasniti iz još jedne perspektive. U velikom broju studija ustanovljena je značajna genetska heterogenost među različitim sojevima EHV-2 i to upravo u predelu gena koji kodira sintezu glikoproteina B čiji segment je predstavljao ciljni region amplifikovan primenom metode Nested multiplex PCR u

ovom ispitivanju (Bell i sar., 2006;. Ataseven i sar., 2010; Brault i sar., 2011; Bilge Dagalp i sar., 2018). Ruzczyk i sar. (2004) su prilikom ispitivanja prevalencije infekcija konjskim herpesvirusom 2 u uzorcima leukocita poreklom od ukupno 139 konja pored izolacije virusa na kulturi tkiva koristili dve kombinacije prajmera s obzirom na veliku genetsku heterogenost sojeva EHV-2, pri čemu je primenom prajmera za gB gen uspešno identifikovano svega 8 izolata za razliku od rezultata PCR sa prajmerima za IL-10 homolog kada je potvrđen identitet 34 izolata EHV-2. Iz navedenog razloga Thorsteinsdóttir i sar. (2013) analiziraju sekvence gena koji kodiraju sintezu gB, gH, DNK polimeraze i DNK terminaze terenskih sojeva EHV-2 sa Islanda. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju značajnu varijabilnost u okviru gB i gH gena (73-99% sličnosti), za razliku od gena DNK terminaze i DNK polimeraze (98-100% sličnosti). Pretpostavlja se da razlike u sekvencama gB gena različitih sojeva gamaherpesvirusa konja najverovatnije odražavaju razlike u imunološkom odgovoru na navedene patogene kod pojedinačnih životinja tako da se prisustvo mutacija u gB genu može smatrati mehanizmom adaptacije virusa iz podfamilije *Gammaherpesvirinae* (Dunowska i sar., 2000).

S obzirom da nukleotidna sekvenca gena koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) predstavlja visokokonzerviran region u genomima konjskih herpesvirusa 1 i 4, velike sličnosti sojeva i izolata ispitivanih u ovoj studiji u poređenju sa sojevima EHV-1, odnosno EHV-4 iz celog sveta su očekivan rezultat. Međutim, analizom dobijenih filogenetskih stabala ustanovljeno je grupisanje sojeva EHV-1 i EHV-4 poreklom sa ovih prostora sa turskim sojevima pomenutih virusa. Turan i sar. (2012) su na osnovu filogenetske analize turskih sojeva EHV-1 i EHV-4 utvrdili da su isti grupisani zajedno, izuzev jednog soja EHV-1 koji je izdvojen i grupisao se sa evropskim sekvencama pomenutog virusa. Ataseven i sar. (2016) su prilikom ispitivanja sličnosti delova gB gena turskih izolata EHV-1 pokazali da u Turskoj genetski identični sojevi EHV-1 cirkulišu na terenu, međutim za razliku od rezultata Turan i sar. (2012), svi su bili srodni sa sekvencama sojeva poreklom iz Evrope. Analizom filogenetskog stabla sastavljenog poređenjem sekvenci delova gB gena domaćih sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 1 sa sekvencama navedenog gena EHV-1 iz međunarodne banke gena utvrđeno je njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske, Velike Britanije, SAD i Japana. Bilge Dagalp i sar. (2018) su ustanovili da su sekvence gB gena svih ispitivanih

turskih sojeva EHV-4 veoma slične i formiraju zasebnu grupu na filogenetskom stablu zajedno sa sekvencama EHV-4 prijavljenim u studiji Turan i sar. (2012), pri čemu se jedan soj EHV-4 izdvajao i grupisao sa sojevima iz Evrope i Japana. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena domaćeg soja 1LN EHV-4 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je 99%, međutim rezultati filogenetske analize su pokazali njegovo grupisanje sa turskim sojevima navedenog virusa, a odvojeno od sojeva iz Irske i Japana, kao što je opisano i u studiji Bilge Dagalp i sar. (2018). Sličnost sojeva konjskih herpesvirusa poreklom sa ovih prostora sa turskim sojevima navedenih virusa se može objasniti aktivnim transportom životinja koji se između Evrope i Azije odigrava preko područja Balkana.

Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena domaćeg soja 3S konjskog herpesvirusa 2 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 80 do 99%. Ispitivani soj bio je 97-99% homologan sa sojevima poreklom iz Turske, odnosno 94-98% sa evropskim sojevima EHV-2 iz Nemačke i Velike Britanije, a još niži stepen homologije utvrđen je poređenjem sa mađarskim sojem Hun-1 (92%), odnosno sojem sa Islanda (80%). Analizom dobijenog filogenetskog stabla zapaža se grupisanje sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike Britanije, dok su sojevi iz drugih evropskih zemalja (Mađarska, Nemačka, Švedska) odvojeni. Filogenetska analiza izvršena u radu Ataseven i sar. (2010) pokazuje da nijedan turski soj EHV-2 nije 100% identičan u poređenju sa evropskim izolatima ovog virusa što su potvrdili i rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije. Filogenetska analiza gamaherpesvirusa sprovedena od strane Bilge Dagalp i sar. (2018) pokazala je visok stepen genetske heterogenosti njihovih gB sekvenci, nasuprot prethodno pomenutim sojevima EHV-4. Parcijalne sekvence gB gena turskih sojeva konjskog herpesvirusa 2 su bile 85,7-99,7% i 92,4-99,7% slične izolatima navedenog virusa iz studije Ataseven i sar. (2010). Pored toga, ispitivani turski sojevi navedenog virusa su posedovali visok stepen sličnosti sa evropskim sojevima EHV-2. Filogenetska analiza identifikovanih sojeva gamaherpesvirusa detektovanih kod konja u Etiopiji pokazala je njihovu veliku genetsku heterogenost, pri čemu su se međusobne sličnosti sojeva EHV-2 i EHV-5 kretale od 94 do 99,4%, odnosno od 95,1 do 100%. Sličnost pomenutih sojeva EHV-2 i EHV-5 sa izolatima iz drugih zemalja iznosila je od 92,9 do 99,5% (Negussie i sar., 2017). Nukleotidna homologija sekvenci gB gena sojeva i izolata EHV-5 utvrđena u

našim ispitivanjima kao i homologija sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%. Filogenetska analiza delova sekvenci gB gena izolata i sojeva EHV-5 sa ovih prostora pokazala je značajne sličnosti i grupisanje sa izolatima navedenog virusa poreklom iz Turske i SAD. Turski izolati konjskog herpesvirusa 5 analizirani u studiji Ataseven i sar. (2010) su se izdvajali od evropskih sojeva na zasebnu granu filogenetskog stabla, a poređenjem njihovih nukleotidnih sekvenci određena je njihova međusobna sličnost od 77,3–90,2%, ukazujući na veliku genetsku heterogenost sekvenci gB gena pomenutih sojeva. Analiza sekvenci turskih sojeva EHV-5 u radu Bilge Dagalp i sar. (2018) pokazala je iste poseduju visok stepen međusobne sličnosti od 98,8 do 99,7%, slično rezultatima u našem ispitivanju. Analizom nukleotidnih sekvenci gB gena EHV-2 i EHV-5 u studiji Bell i sar. (2006) pokazana je veća genetska heterogenost sojeva konjskog herpesvirusa 2 u odnosu na EHV-5 (95,5–99,3% nasuprot 98,8–99,3% homologije). Genetska heterogenost sojeva EHV-5 opisana u ovom ispitivanju se slaže sa rezultatima drugih autora, pri čemu se može zaključiti da su varijacije u genomu EHV-5 uglavnom manje učestala pojava nego u slučaju EHV-2 (Dunowska i sar., 2000; Brault i sar., 2011).

Dobijene sekvence dela gena ORF30 analiziranih 11 od ukupno 12 ispitanih sojeva i izolata (91,67%) u ovoj doktorskoj disertaciji su posedovale neurovirulentni genetski marker (G₂₂₅₄). Podaci retrospektivnog ispitivanja Smith i sar. (2010) pokazuju da su neurovirulentni sojevi EHV-1 prisutni na terenu još od pedesetih godina prošlog veka, pri čemu je njihov broj rastao od zabeleženih 3,3% šezdesetih godina, do čak 19,4% 2006. godine. Ovakvi rezultati ukazuju da prevalencija mutiranih neuropatogenih sojeva raste iz godine u godinu čime se povećava rizik od epizootija neurološkog oboljenja u populacijama konja. Među neurovirulentnim sojevima EHV-1 identifikovanim u našim ispitivanjima bila su i četiri arhivirana izolata iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju. Poznato je da su pomenuti virusi izolovani osamdesetih godina prošlog veka iz slučajeva pobačaja gravidnih kobila, odnosno uginuća novorođene ždrebadi sa ergele „Ljubičevo“. U retrospektivnoj studiji Perkins i sar. (2009) ispitivana je prevalencija neurovirulentnog genotipa EHV-1 među ukupno 176 terenskih izolata prikupljenih u laboratoriji Univerziteta Cornell u periodu od 1984. do 2007. godine. Pomenuti autori su zabeležili da je svega 11% izolata pripadalo neurovirulentnim sojevima, pri čemu je većina izolovana iz slučajeva mijeloencefalitisa,

a manji broj izolata je poreklom iz kliničkih slučajeva pobačaja i/ili respiratornog oboljenja. Malik i sar. (2010) su ispitivali 35 terenskih izolata EHV-1 iz perioda od 1977. do 2008. godine poreklom iz slučajeva pobačaja gravidnih kobila u Mađarskoj. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da 14,3% od ukupnog broja ispitivanih izolata EHV-1 poseduje G₂₂₅₄ genotip. Fritsche i Borchers (2011) su ispitivali rasprostranjenost neuropatogenih sojeva EHV-1 među izolatima iz slučajeva pobačaja gravidnih kobila u Nemačkoj, kao i među arhiviranim izolatima prikupljenim u periodu od 1987. do 2009. godine. Za razliku od rezultata ove doktorske disertacije, svega 10,6% izolata EHV-1 je posedovalo neurovirulentni genetski marker. Marenzoni i sar. (2013) su ispitivali etiologiju pobačaja kobila u Italiji u periodu od 2004. do 2011. godine, pri čemu su u 50% uzoraka detektovali EHV-1 i dokazali veću prevalenciju neurovirulentnih sojeva u navedenim slučajevima. Pored toga, Damiani i sar. (2014) su opisali enzootiju abortusa na ergeli u Nemačkoj pri čemu je sprovedenim virusološkim ispitivanjima dokazano da su izolovani sojevi virusa pripadali neurovirulentnom genotipu EHV-1.

Kod preostalih sojeva EHV-1 ispitivanih u ovoj doktorskoj disertaciji poreklom iz nervnog tkiva i limfnih čvorova 6 konja iz različitih krajeva Republike Srbije identifikovana je G₂₂₅₄ mutacija u okviru ORF30 gena. Jedini dostupni podaci o navedenim životinjama su da su iste bile nevakcinisane i klinički zdrave. Navedeni rezultat ukazuje na postojanje latentnih infekcija neurovirulentnim sojevima EHV-1 u populaciji konja u Srbiji. U istraživanju Pusterla i sar. (2010) izvršena je detekcija i karakterizacija sojeva EHV-1 iz uzoraka submandibularnih limfnih čvorova i trigeminalnih ganglija konja pri čemu je u 44% ispitivanih uzoraka tkiva, pretežno uzoraka trigeminalnih ganglija, detektovano prisustvo DNK kako neurovirulentnih, tako i A₂₂₅₄ sojeva. Allen i sar. (2008) su prilikom ispitivanja uzoraka submandibularnih limfnih čvorova poreklom od 132 odrasle kobile uginule sa simptomima mijeloencefaloopatije, prisustvo latentne infekcije G₂₂₅₄ sojem EHV-1 identifikovali u 18% uzoraka, naglasivši pri tom da značajan broj životinja koje su latentno inficirane neurovirulentnim sojevima pomenutog virusa može predstavljati ozbiljan epizootiološki problem. Jedan izolat G₂₂₅₄ soja EHV-1 je poreklom iz nosnog brisa kobile sa ergele "Vučijak" gde je detektovana visoka prevalencija infekcija konjskim herpesvirusom 1. Preostali sojevi i izolati EHV-1 nisu ispitani na prisustvo navedene mutacije u ovoj studiji. Anamnestički podaci pokazuju da u ispitivanoj populaciji konja u skorijem

vremenskom periodu nisu zabeleženi slučajevi pojave neurološkog oboljenja i/ili pobačaja. Postoji verovatnoća da je pomenuta populacija konja imunološki adaptirana na infekciju konjskim herpesvirusom 1, odnosno da postoji zadovoljavajuć nivo specifičnog imuniteta prema pomenutim sojevima virusa koji očigledno cirkulišu u ovoj populaciji. Međutim, rizik može predstavljati uvođenje novih nevakcinisanih konja ili mešanje jedinki latentno inficiranih neurovirulentnim sojevima sa imunološki naivnim populacijama konja. Najveći broj autora se bavio isključivo ispitivanjem postojanja neurovirulentnog markera kod izolata EHV-1 poreklom od konja kod kojih su prethodno ustanovljeni klinički simptomi neuroloških i/ili reproduktivnih poremećaja (Gryspeerdts i sar., 2002; Barbić i sar., 2012; McFadden i sar., 2014; Negussie i sar., 2015; Stasiak i sar., 2017) tako da ne postoji adekvatna osnova za poređenje sa rezultatima koji se odnose na detekciju ovih sojeva kod konja bez kliničkih simptoma.

U cilju umnožavanja fragmenta ORF68 gena EHV-1 čija je očekivana veličina bila oko 600bp primenom lančane reakcije polimeraze prema protokolu i sa kombinacijama prajmera opisanim od strane Nugent i sar. (2006) ispitano je ukupno 15 ekstrakata DNK odabranih sojeva i izolata EHV-1. Pored očekivanih fragmenata, prilikom analize agaroznog gela ustanovljeno je prisustvo više nespecifičnih fragmenata različitih veličina. Uvidom u literaturu i primenom PCR protokola opisanih u radovima drugih autora dobijani su uvek isti rezultati. Da bi se izbeglo dobijanje neispravne sekvence ORF68 gena, fragmenti od oko 600bp su isecani iz agaroznog gela odakle je posle adekvatne obrade vršeno sekvenciranje u cilju analize redosleda nukleotida u navedenom polimorfnom genetskom segmentu pri čemu su uspešno dobijene samo 2 sekvence sojeva D1 i D4. Njihovim poređenjem sa predstavnicima 10 geografskih grupa prema Nugent i sar. (2006) i Malik i sar. (2012) otkriveno je da sekvence delova ORF68 gena izolata D1 i D4 poseduju mutaciju na nivou pojedinačnih nukleotida koja je karakteristična za sojeve EHV-1 koji pripadaju četvrtoj geografskoj grupi (prisustvo A umesto G na poziciji 629), odnosno evropskim sojevima EHV-1. U navedenu grupu su svrstani još i sojevi iz Velike Britanije, Francuske i Nemačke. Ostale dobijene sekvence ORF68 gena EHV-1 u ovoj disertaciji su posedovale veliki broj mutacija na osnovu čije analize se nisu mogle svrstati ni u jednu geografsku grupu i zbog preglednijeg prikaza rezultata nisu dalje posebno analizirane. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da ORF68 ne predstavlja pogodan molekularni marker za analizu sojeva EHV-1 sa ovih

prostora. Pored toga, prajmeri opisani od strane Nugent i sar. (2006) nisu dovoljno specifični da bi se pravilno vezali za genetski segment ORF68 gena domaćih sojeva EHV-1 zbog njegovog izraženog polimorfizma. Prema Nugent i sar. (2006), u grupe 1, 3, 4 i 6 spadaju pretežno evropski sojevi, dok su u grupama 2 i 5 uglavnom izolati iz SAD. Malik i sar. (2012) su svrstali mađarske izolate iz slučajeva pobačaja u periodu od 1977. do 2008. godine u nekoliko geografskih grupa, pri čemu su samo 23 od 35 ispitanih izolata pripadala grupama prethodno opisanim od strane Nugent i sar. (2006), dok su zabeleženi polimorfizmi na nivou pojedinačnih nukleotida u sekvencama preostalih 12 izolata EHV-1 usloveli stvaranje 4 dodatne geografske grupe. Autori su koristili nukleotidnu sekvencu referentnog soja Ab4 EHV-1 koji je svrstan u 1. grupu kao osnovu za pravljenje poređenja na nivou pojedinačnih nukleotida. Dobijeni podaci pokazuju da sojevi EHV-1 iz ovog dela Evrope pokazuju poseban polimorfizam, što bi uslovalo formiranje velikog broja grupa pri čemu postoji rizik da čitava podela izgubi smisao. Mađarski sojevi EHV-1 su svrstani u grupe 2, 3 i 4, pri čemu je najveći broj pripadao 2. geografskoj grupi. Navedeni nalaz je u suprotnosti sa podacima Nugent i sar. (2006) koji su u grupu 2 svrstali severnoameričke izolate pomenutog virusa. Mađarski sojevi konjskog herpesvirusa 1 iz 7. grupe su, prema Malik i sar. (2012), introdukovani iz Srbije prilikom transporta konja u Nemačku preko Mađarske, međutim u našem ispitivanju nisu detektovani virusi iz navedene grupe. Anagha i sar. (2016) su ukupno 9 indijskih izolata EHV-1 i svrstali u geografske grupe 4 i 5, pri čemu se jedan izolat razlikovao na pozicijama C₇₁₀ i C₇₁₃ čime su i ovi autori formirali dodatnu grupu. Cuxson i sar. (2014) su analizom sekvenci ORF68 genetskog segmenta 66 australijskih izolata EHV-1 ustanovili veliku genetičku heterogenost među pomenutim sojevima i pored njihove klasifikacije u geografske grupe 2, 3 i 5 kod nekih sojeva je utvrđen visok nivo varijabilnosti u okviru ORF68 sekvenci, ne dovodeći ih pri tom u vezu sa geografskim poreklom. Slični su rezultati Stasiak i sar. (2017) koji su vršili karakterizaciju 38 izolata EHV-1 poreklom iz slučajeva pobačaja kobila iz perioda od 1999. do 2016. godine.. Većina ispitivanih sekvenci (81,6%) nije klasifikovana ni u jednu od grupa prema Nugent i sar. (2006), pri čemu su preostale sekvence pripadale 3., odnosno 4. grupi. Stasiak i sar. (2017) su na osnovu dobijenih podataka takođe zaključili da ORF68 ne predstavlja pouzdan molekularni marker za izvođenje epizootioloških studija infekcija izazvanih konjskim herpesvirusom 1.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih identifikacijom i molekularnom karakterizacijom sojeva konjskih herpesvirusa 1, 4, 2 i 5 sa teritorija Republike Srbije i Republike Srpske, kao i arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Metodom izolacije i identifikacije virusa na kulturi tkiva primenom testa virus neutralizacije, direktne imunofluorescencije i metode Nested multiplex PCR od ukupno 212 ispitivanih uzoraka organa i nosnih briseva konja prisustvo konjskog herpesvirusa 1 je utvrđeno u 72 uzorka, dok je metodom izolacije virusa na kulturi ćelija sa identifikacijom primenom metode Nested multiplex PCR iz prethodno navedenih uzoraka konjski herpesvirus 5 detektovan u 7 uzoraka, a konjski herpesvirusi 4 i 2 nisu izolovani ni iz jednog uzorka nosnih briseva i organa konja.

2. Prisustvo nukleinskih kiselina EHV-1, EHV-4, EHV-2 i EHV-5 je utvrđeno u ukupno 162 ispitana uzorka nosnih briseva i organa konja pri čemu je EHV-1 detektovan u 153 uzorka, EHV-4 u 11, EHV-2 u 4, a EHV-5 u 23 uzorka ispitivanog materijala.

3. Metodom Nested multiplex PCR je ustanovljeno prisustvo mešovutih infekcija sa dva ili više konjska herpesvirusa u 16,67% od ukupnog broja pozitivnih uzoraka, pri čemu su EHV-2 i EHV-4 identifikovani isključivo u okviru mešovutih infekcija sa EHV-1 i/ili EHV-5.

4. Metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru dobijeno je ukupno 10 sekvenci delova gB gena EHV-1, jedna sekvenca dela gB gena EHV-4, jedna sekvenca dela gB gena EHV-2 i 7 sekvenci delova gB gena EHV-5, 12 sekvenci dela gena ORF30 EHV-1 i 2 sekvence dela gena ORF68 EHV-1.

5. Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih sojeva EHV-1 kao i homologija njihovih sekvenci sa sekvencama sojeva navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%, dok je analizom filogenetskog stabla sastavljenog poređenjem sekvenci delova gB gena odabranih sojeva konjskog herpesvirusa 1 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama navednog gena EHV-1 iz međunarodne banke gena ustanovljeno njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske, Velike Britanije, SAD i Japana.

6. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-4 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je 99%, a na filogenetskom stablu sastavljenom na osnovu dela gB gena konjskog herpesvirusa 4, soj EHV-4 poreklom iz Republike Srbije grupisan je sa turskim sojevima navedenog virusa i odvojeno od sojeva iz Evrope i Japana.

7. Nukleotidna homologija sekvence dela gB gena identifikovanog soja EHV-2 sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 80 do 99%, dok je na filogenetskom stablu formiranom na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci dela gB gena soja konjskog herpesvirusa 2 poreklom iz Republike Srbije sa sekvencama sojeva iz međunarodne banke gena utvrđeno njegovo grupisanje sa sojevima EHV-2 iz Turske i Velike Britanije, pri čemu su sojevi iz drugih evropskih zemalja (Mađarska, Nemačka, Švedska) bili odvojeni od navedene grupe.

8. Međusobna nukleotidna homologija sekvenci delova gB gena identifikovanih sojeva EHV-5 kao i njihova sličnost sa sojevima navedenog virusa iz međunarodne banke gena iznosila je od 98 do 100%, a na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci delova gB gena odabranih sojeva i izolata konjskog herpesvirusa 5 poreklom iz Republike Srbije i Republike Srpske sa sekvencama sojeva EHV-5 iz međunarodne banke gena ustanovljeno je njihovo grupisanje sa sojevima poreklom iz Turske i SAD.

9. Sekvence dela gena ORF30 11 analiziranih sojeva EHV-1 (91,67%) su posedovale neurovirulentni genetski marker (G₂₂₅₄) što je posledica supstitucije adenina guaninom na poziciji 2254, pri čemu su među identifikovanim neurovirulentnim sojevima EHV-1 bila i četiri arhivirana soja EHV-1 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju.

10. U sekvencama delova ORF68 gena arhiviranih sojeva EHV-1 Katedre za mikrobiologiju utvrđene su mutacije na nivou pojedinačnih nukleotida karakteristične za sojeve EHV-1 koji pripadaju četvrtoj geografskoj grupi, odnosno evropskim sojevima pomenutog virusa, dok je kod ostalih dobijenih sekvenci ustanovljen veliki broj mutacija na osnovu čije analize se isti nisu mogli svrstati ni u jednu geografsku grupu što ukazuje da ORF68 ne predstavlja pogodan molekularni marker za proučavanje sojeva EHV-1 sa ovih prostora.

8. SPISAK LITERATURE

1. Agius CT, Nagesha HS, Studdert MJ 1992: Equine herpesvirus 5: comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure. *Virology* **191**: 176–186
2. Agius CT, Studdert MJ 1994: Equine herpesviruses 2 and 5: comparisons with other members of the subfamily gammaherpesvirinae. *Adv Virus Res* **44**: 357–379
3. Akkutay AZ, Osterrieder N, Damiani A, Tischler BK, Borchers K, Alkan F 2014: Prevalence of equine gammaherpesviruses on breeding farms in Turkey and development of a TaqMan MGB real-time PCR to detect equine herpesvirus 5 (EHV-5). *Arch Virol* **159**(11): 2989-2995
4. Allen GP 2006: Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am J Vet Res* **67**(8):1401-5
5. Allen GP 2007: Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J Vet Diagn Investig* **19**:69–72
6. Allen GP 2008: Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am J Vet Res* **69**:1595–1600
7. Allen GP, Bolin DC, Bryant U, Carter CN, Giles RC, Harrison LR, Hong CB, Jackson CB, Poonacha K, Wharton R, Williams NM 2008: Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus–1 in the thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine Vet J* **40**(2): 105 – 110
8. Allen GP, Breathnach CC 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 Vet J* **38**:252–257
9. Allen GP, Bryans JT 1986: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol* **2**: 78-144

10. Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC 1998: Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. Proceedings 8th International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, 129 – 146
11. Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC 1999: Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. Proceedings of the Eight International Conference on Equine Infectious Diseases, 129-146
12. Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC 2004: Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds.): Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press, Oxford, pp. 829–859
13. Allen GP, MJ Murray 2004: Equid herpesvirus 2 and equid herpesvirus 5 infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds.): Infectious Diseases of Livestock. Oxford Press, Cape Town, pp 860-867
14. Anagha G, Gulati BR, Riyesh T, Virmani N 2017: Genetic characterization of equine herpesvirus 1 isolates from abortion outbreaks in India. Arch Virol **162**(1):157-163
15. Ataseven VS, Bilge-Dagalp S, Oguzoglu TC, Karapinar Z, Guzel M, Tan MT 2010: Detection and sequence analysis of equine gammaherpesviruses from horses with respiratory tract disease in Turkey. Transbound Emerg Dis **57**: 271–276
16. Ataseven VS, Dagalp SB, Güzel M, Başaran Z, Tan MT, 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. Res Vet Sci **86**(2): 339-44
17. Ataseven VS, Oguzoglu TC, Dincer E, Bilge Dagalp S 2016: Partial sequence of the gB gene of equid herpesvirus type 1 isolates associated with abortion in Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg **63**: 277-281
18. Azab W, Tsujimura K, Maeda K, Kobayashi K, Mohamed YM, Kato K, Matsumura T, Akashi H 2010: Glycoprotein C of equine herpesvirus 4 plays a role in viral binding to cell surface heparan sulfate. Virus Res **151**:1–9

19. Azab W, Zajic L, Osterrieder N 2012: The role of glycoprotein H of equine herpesviruses 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) in cellular host range and integrin binding. *Vet Res* **43**:61
20. Back H, Kendall A, Grandon R, Ullman K, Treiberg-Berndtsson L, Stahl K, Pringle J 2012: Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. *Acta Vet Scand* **54**:57
21. Ballagi-Pordány A, Klingeborn B, Flensburg J, Belák S 1990: Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* **22**(4):373-381
22. Banbura MW, Witkowski L, Chmielewska A, Tucholska A 2006: Mixed infections of equine herpes virus types 1 and 2 (EHV-1 and EHV-2). *Med Weter.* **62**(9):1071-1072
23. Banbura MW, Witkowski L, Chmielewska A, Tucholska A, Rzewuska M, Ruszczyk A 2004: Isolation of equine herpesvirus type 1 and 2 (EHV-1 and EHV-2) from foals infected with *Rhodococcus equi*. *Med Weter* **60**:1333–1336
24. Batterson W, Roizman B 1983: Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* **46**:371–377
25. Bell SA, Balasuriya UB, Gardner IA, Barry PA, Wilson WD, Ferraro GL, MacLachlan NJ 2006a: Temporal detection of equine herpesvirus infections of a cohort of mares and their foals. *Vet Microbiol* **116**: 249–257
26. Bell SA, Balasuriya UB, Nordhausen RW, MacLachlan NJ 2006b: Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *J Vet Diagn Invest* **18**: 472–475
27. Bilge Dagalp S, Babaoglu AR, Ataseven VS, Karapinar Z, Timurkan M Özkan, DF, Özkul A, Alkan F 2018: Determination of presence of equid alpha and gamma herpesvirus infections in foals with respiratory distress. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **65**: 63-68
28. Borchers K, Ebert M, Fetsch A, Hammond T, Sterner-Kock A 2006: Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Vet Microbiol* **118**(3-4): 260-266

29. Borchers K, Frolich K, Ludwig H 1999: Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch Virol* **144**: 771–780
30. Borchers K, Slater J 1993: A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods* **45**(3):331-336
31. Borchers K, Wolfinger U, Goltz M, Broll H, Ludwig H 1997: Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch Virol* **142**: 917–928
32. Borchers K, Wolfinger U, Lawrenz B, Schellenbach A, Ludwig H 1997: Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct *in situ* PCR. *J Gen Virol* **78**: 1109-1114
33. Borchers K, Wolfinger U, Ludwig H 1999: Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. *J Gen Virol* **80**(8): 2165–2171
34. Brault SA, Maclachlan NJ 2011: Equid gammaherpesviruses: persistent bystanders or true pathogens? *Vet J* **187**: 14–15
35. Brown JA, Mapes S, Ball BA, Hodder AD, Liu IK, Pusterla N 2007: Prevalence of equine herpesvirus-1 infection among Thoroughbreds residing on a farm on which the virus was endemic. *J Am Vet Med Assoc* **231**: 577-580
36. Browning GF, Studdert MJ 1987a: Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J Gen Virol* **68**(5): 1441–1447
37. Browning GF, Studdert MJ 1987b: Epidemiology of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *J Clin Microbiol* **25**: 13–16
38. Browning GF, Studdert MJ 1988: Equine herpesvirus 2 (Equine cytomegalovirus). *Vet Bull* **58**: 775–790
39. Browning GF, Studdert MJ 1989: Physical mapping of a genome of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Arch Virol* **104**: 77–86
40. Bryans JT 1978: Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. In: Bryans JT, Gerber H (Eds): *Equine Infectious Diseases*, 4th International Conference of Equine Infectious Diseases, Lyon, Veterinary Publications, Princeton, New Jersey pp 83-92

41. Bryans JT 1968: The herpesvirus in disease of the horse, Proceedings of the 14th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Philadelphia, 119–125
42. Bryans JT, Allen GP 1989: Herpesviral Diseases of the Horse. In: Wittmann G (Ed): Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs. Developments in Veterinary Virology, Springer, Boston. pp 176-229
43. Burgess BA, Tokateloff N, Manning S, Lohmann K, Lunn DP, Hussey SB, Morley PS 2012: Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myeloencephalopathy in Western Canada. *J Vet Intern Med* **26**:384–392
44. Burrows R 1968: Laboratory Diagnosis of Some Virus Infections of the Upper Respiratory Tract of the Horse. *Equine Vet J* **1**: 32–38
45. Burrows R, Goodridge D 1973: In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis virus strains. In: Bryans J, Gerber H (Eds.): Proceedings of the 3rd International Conference of Equine Infectious Diseases, Paris, pp 306 321
46. Burrows R, Goodridge D 1984: Studies of persistent and latent equid herpesvirus 1 and herpesvirus 3 infections in the Pirbright pony herd. In: Wittmann G, Gaskell RM, Rhiza HJ: Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 307-319
47. Carvalho R, Passos LMF, Martins S 2000: Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. *J Vet Med B* **47**: 351–359
48. Caughman GB, Staczek J, O'Callaghan DJ 1985: Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: evidence for immediate early/early/late regulation of viral gene expression. *Virology* **145**: 49-61
49. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N 1997: Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol* **71**(5):3437–3443
50. Chowdhury SI, Kubin G, Ludwig H 1986: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses. *Arch Virol* **90**(3-4): 273-88

51. Collinson PN, O'Rielly JL, Ficorilli N, Studdert MJ 1994: Isolation of equineherpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *JAVMA-J Am Vet Med A*, **205**: 329– 331
52. Costa EA, Rosa R, Oliveira TS, Assis AC, Paixão TA, Santos RL 2015: Molecular characterization of neuropathogenic Equine Herpesvirus 1 Brazilian isolates. *Arq Bras Med Vet Zootec* **67**(4): 1183-1187
53. Crabb BS, Allen GP, Studdert MJ 1991: Characterization of the major glycoproteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **72**: 2075-2082
54. Crabb BS, Drummer HE, Reubel GH, McPherson CM, Bowning GF, Studdert MJ 1995: A type specific, serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol* **140**: 245-258
55. Crabb BS, Drummer HE, Reubel GH, McPherson CM, Bowning GF, Studdert MJ 1995: A type specific, serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol* **140**: 245-258
56. Crabb BS, Studdert MJ 1990: Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J Gen Virol* **71**: 2033-2041
57. Crabb BS, Studdert MJ 1993: Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J ViroL* **67**: 6332-6338
58. Crabb BS, Studdert MJ 1995: Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Vir Res* **45**: 153-190
59. Crabb BS, Studdert MJ 1996: Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus 4) and equine abortion (equine herpesvirus 1). In: Studdert MJ (Ed.): *Virus Infections of Equines*. Elsevier, pp 11-37
60. Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM 2000: EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol* **145**: 2371-2385

61. Cuxson JL, Hartley CA, Ficorilli NP, Symes SJ, Devlin JM, Gilkerson JR 2014: Comparing the genetic diversity of ORF30 of Australian isolates of 3 equid alphaherpesviruses. *Vet Microbiol* **169**(1-2):50-57
62. Damiani AM, 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. *Vet Microbiol* **172**(3-4): 555-562
63. Darlington RW, James C 1966: Biological and Morphological Aspects of the Growth of Equine Abortion Virus. *Jour Bact* **92**: 250-257
64. Davison AJ 2008: Herpesviruses: General Features. In: Mahy B, Van Regenmortel M (Eds.): *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Publishing Co, Oxford, pp 430-436
65. Davison AJ, Eberle R., Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E 2009: The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**: 171-177
66. Del Piero F, Wilkins PA 2001: Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Vet Pathol* **38**(4): 474
67. Del Piero F, Wilkins PA, Timoney PJ, Kadushin J, Vogelbacker H, Lee JW, Berkowitz SJ, La Per le KM 2000: Fatal nonneurological EHV-1 infection in a yearling filly. *Vet Pathol* **37**: 672-676
68. Diallo IS, Hewitson G, Wright LL, Kelly MA, Rodwell BJ, Corney BG 2007: Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet Microbiol* **123** (1-3): 93-103
69. Diallo IS, Hewitson GR, de Jong A, Kelly MA, Wright DJ, Corney BG, Rodwell BJ 2008: Equine herpesvirus infections in yearlings in South-East Queensland. *Arch Virol* **153**(9): 1643-1649
70. Dimock WW, 1940: The diagnosis of virus abortion in mares. *F Am Vet Med Assoc* **96**: 665
71. Dimock WW, Edwards PR 1932: Infections of fetuses and foals, *Ky Agr Exp St Bull* 333 Lexington

72. Dimock WW, Edwards PR 1933: Is there a filterable virus of abortion in mares? Ky Agr Exp St Bull **333**: 297-301
73. Dimock WW, Edwards PR 1933: Is there a filterable virus of abortion in mares?, Ky Agr Exp St Bull 333, Supplement, Lexington.
74. Dimock WW, Edwards PR 1936: The differential diagnosis of equine abortion with special reference to a hitherto undescribed form of epizootic abortion in mares Cornell Vet **26**: 231
75. Doll ER, Bryans JT 1962: Incubation periods for abortion in equine viral rhinopneumonitis. J Am Vet Med Ass **141**: 351-354
76. Doll ER, Bryans JT, McCollum WH, Crowe MEW 1957: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. Cornell Vet **57**:3
77. Doll ER, McCollum WH, Bryans JT, Crowe ME 1959: Effect of physical and chemical environment on the viability of equine rhinopneumonitis virus propagated in hamsters. Cornell Vet **49**: 75–81
78. Doll ER, Wallace ME, Bryans JT, Richards MG 1953: Complement fixation antibody response following administration of equine virus abortion vaccine. Am J Vet Res **14**(50): 46– 48
79. Doll ER, Wallace ME, Richards MG 1954: Thermal, hematological and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: Its similarity to equine influenza. Cornell Vet **44**: 181
80. Drummer HE, Reubel GH, Studdert MJ 1996: Equine gammaherpesvirus 2 (EHV2) is latent in B lymphocytes. Arch Virol **141**: 495–504
81. Dunkel B 2012: Pulmonary fibrosis and gammaherpesvirus infection in horses. Equine Vet Educ. **24**: 200–205
82. Dunowska M, Hardcastle MR, Tonkin FB 2014: Identification of the first New Zealand case of equine multinodular pulmonary fibrosis. New Zeal Vet J **62**(4): 226–231
83. Dunowska M, Holloway SA, Wilks CR, Meers J 2000: Genomic variability of equine herpesvirus-5. Arch Virol **145**:1359–1371
84. Dunowska M, Holloway SA, Wilks CR, Meers J 2000: Genomic variability of equine herpesvirus-5. Arch Virol **145**: 1359–1371

85. Dunowska M, Meers J, Wilks CR 1999: Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand. *N Z Vet J* **47**(2): 44-46
86. Dunowska M, Wilks CR, Studdert MJ, Meers J 2002: Equine respiratory viruses in foals in New Zealand. *N Z Vet J*. **50**: 140–147
87. Dynon K, Black WD, Ficorilli N, Hartley CA, Studdert MJ 2007: Detection of viruses in nasal swab samples from horses with acute, febrile, respiratory disease using virus isolation, polymerase chain reaction and serology. *Aust Vet J* **85**: 46–50
88. Dzieciatkowski T 2005: Influence of equine herpes virus type 2 (EHV-2) on productive infections of equine herpes virus type 1 (EHV-1) in vitro. *Med Weter* **61**: 338–340
89. Edington N, Bridges CG, Huckle A 1985: Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J* **17**: 369–372
90. Edington N, Bridges CG, Patel JR 1986: Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch Virol* **90**: 111-124
91. Edington N, Smith B, Griffiths L 1991: The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *J Comp Pathol* **104**: 379-387
92. Edington N, Welch HM, Griffiths L 1994: The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet J* **26**: 140–142.
equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions. *J Vet Intern Med* **26**:1500–1504, 2012.
93. Erasmus BJ 1970: Equine cytomegaloviruses. In: *Proceedings of the 2nd International Conference of Equine Infectious Diseases, Paris*
94. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Wellington JE, Whalley JM 2006: EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Vet Immunol Immunopathol* **111**: 41-46
95. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Whalley JM 2004: Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweaned Thoroughbred foals from vaccinated mares on a large stud farm. *Equine Vet J* **36**(4): 341-345

96. Fortier G, Pronost S, Miszczak F, Fortier C, Leon A, Richard E, van Erck E, Thiry E, Lekeux P 2009: Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Vet J* **182**: 346–348
97. Fortier G, Richard E, Hue E, Fortier C, Pronost S, Pottier D, Lemaitre L, Lekeux P, Borchers K, Thiry E 2013: Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses. *Vet J* **197**: 492–495
98. Frampton, AR Jr, Uchida H, von Einem J, Goins WF, Grandi P, Cohen JB, Osterrieder N, Glorioso JC 2010: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) utilizes microtubules, dynein, and ROCK1 to productively infect cells. *Vet Microbiol* **141**: 12-21
99. Friday PA, Scarratt WK, Elvinger F, Timoney PJ, Bonda A 2000: Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J Vet Intern Med* **14**: 197-201
100. Fritsche AK, Borchers K 2011. Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet Microbiol* **147**(1-2): 176-180
101. Fu ZF, Denby L, Lien DH, Robinson AJ 1987: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of antibodies against equine herpesvirus 2 in equine sera. *Acta Virol* **31**: 468–474
102. Fu ZF, Robinson AJ, Horner GW, Dickinson LG, Grimmett JB, Marshall RB, 1986: Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. *N Z Vet J* **34**: 152–155
103. Galosi CM, de la Paz VC, Fernandez LC, Martinez JP, Craig MI., Barrandeguy M, Etcheverrigaray ME 2005: Isolation of equine herpesvirus-2 from the lung of an aborted fetus. *J Vet Diagn Invest* **17**: 500-502
104. Galosi CM, Vila Roza MV, Oliva GA, Pecorado MR, Echeverria MG, Corva S, Etcheverrigaray ME 2001: A polymerase chain reaction for detection of equine herpesvirus-1 in routine diagnostic submissions of tissues from aborted fetuses. *J Vet Med* **48**: 341 – 346
105. Garré B, Shebany K, Gryspeerdt A, Baert K, van der Meulen K, Nauwynck H, Deprez P, De Backer P, Croubels S 2007: Pharmacokinetics of acyclovir after

intravenous infusion of acyclovir and after oral administration of acyclovir and its prodrug valacyclovir in healthy adult horses. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4308-4314

106. Gentry PA, Feldman BF, O'Neill SL, Madigan JE, Zinkl JG 1992: Evaluation of the haemostatic profile in the pre- and post parturient mare, with particular focus on the perinatal period. *Equine Vet J* **24**: 33-36
107. Gibson JS, Slater JD, Awan AR, Field HJ 1992a: Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol* **123**: 351-366
108. Gibson JS, Slater JD, Field HJ 1992b: The pathogenicity of Ab4p, the sequenced strain of equine herpesvirus-1, in specific pathogen-free foals. *Virology* **189**(1): 317-319
109. Giles RC, Donahue JM, Hong CB, Tuttle PA, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, Tramontin RR, Smith B, Swerczek TW 1993: Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc* **203**(8): 1170-1175
110. Gilkerson JR, Love DN, Drummer HE, Studdert MJ, Whalley JM 1998: Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in thoroughbred foals before and after weaning. *Aust Vet J* **76**: 677-682
111. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE 1999a: Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet Microbiol* **68**: 15-25
112. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert Mi, Love DN 1999b: Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on the Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet Microbiol* **68**: 27-34
113. Gleeson LJ, Coggins L 1980: Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV1). *Cornell Vet* **70**: 391-400

114. Goehring LS, Landolt GA, Morley PS 2010: Detection and management of an outbreak of equine herpesvirus type 1 infection and associated neurological disease in a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* **24**:1176–1183
115. Goehring LS, van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM 2005: Neurological syndromes among horses in The Netherlands: a 5 year retrospective survey (1999–2004). *Vet Q* **27**: 11-20
116. Goehring LS, van Winden SC, van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM 2006: Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in The Netherlands: A four-year retrospective study (1999–2003). *J Vet Intern Med* **20**:601–607
117. Goodman LB, Loregian A, Perkins GA, Nugent J, Buckles EL, Mercorelli B, Kydd JH, Palù G, Smith KC, Osterrieder N, Davis-Poynter N 2007: A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog* **3**:e160
118. Goulden BC, Wilks C, Jones D 1989: Equine herpesvirus (EHV1) disease. Publication of the New-Zealand Equine Research Foundation, 1-32
119. Greenwood RE, Simson AR 1980: Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Vet J* **12**(3):113–117
120. Gryspeerdt A 2011: The Pathogenesis Of EHV1 In Horses: Novel Insights From Experimental Inoculations and Field Situations, doktorska disertacija, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University
121. Gryspeerdt A, Vandekerckhove A, Van Doorselaere J, Van de Walle GR, Nauwynck HJ 2011: Description of an unusually large outbreak of nervous system disorders caused by equine herpesvirus 1 (EHV1) in 2009 in Belgium. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* **80**: 147-153
122. Hafshejani T, Nekoei S, Vazirian B, Doosti A, Khamesipour F, Anyanwu MU 2015: Molecular Detection of Equine Herpesvirus Types 1 and 4 Infection in Healthy Horses in Isfahan Central and Shahrekord Southwest Regions, Iran. *Biomed Res Int* 2015: 917854
123. Hartley CA, Dynon KJ, Mekuria ZH, El-Hage CM, Holloway SA, Gilkerson JR 2013: Equine gammaherpesviruses: perfect parasites? *Vet Microbiol* **167**: 86–92

124. Hartley CA, Wilks CR, Studdert MJ, Gilkerson JR 2005: Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am J Vet Res* **66**(5): 921-928
125. Heldens JG, Hannant D, Cullinane AA, Prendergast MJ, Mumford JA, Nelly M, Kydd JH, Weststrate MW, van den Hoven R 2001: Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* **19**: 4307-4317
126. Holloway SA, Lindquister GJ, Studdert MJ, Drummer HE 1999: Identification, sequence analysis and characterisation of equine herpesvirus 5 glycoprotein B. *Arch Virol* **144**(2): 287-307
127. Hsiung GD, Fishman HR, Fong CKY, Green RH 1969: Characterization of a cytomegalo-like virus isolated from spontaneously degenerated equine kidney cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* **130**: 80-84
128. Hue ES, Fortier GD, Fortier CI, Leon AM, Richard EA, Legrand LJ, Pronost SL 2014: Detection and quantitation of equid gammaherpesviruses (EHV-2, EHV-5) in nasal swabs using an accredited standardised quantitative PCR method. *J Virol Methods* **198**: 18-25
129. Huemer HP, Nowotny N, Crabb BS, Meyer H, Hubert PH 1995: gp13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesviruses. *Virus Res* **37**: 113-126
130. Hussey SB, Clark R, Lunn KF, Breathnach C, Soboll G, Whalley JM, Lunn DP 2006: Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* **18**: 335-342
131. Jackson T, Kendrick JW 1971: Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *F Am Vet Med Assoc* **158**:1351
132. Jackson TA, Osburn BI, Cordy DR, Kendrick JW 1977: Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. *Am J Vet Res* **38**: 709-719
133. Kapoor S, Sharma H, Singh M, Kumar P, Ranjan K, Kumari A, Khirbat R 2014: Equine Herpesviruses: a Brief Review *Adv An Vet Sci* **2** (2S): 46-54

134. Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW 2003: Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol* **9**(3): 285-290
135. Kershaw O, Von Oppen T, Glitz F, Deegen E, Ludwig H, Borchers K 2001: Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Res* **80**:93–99
136. Kieff E, Liebowitz D 1990: Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP (Eds): *Field's Virology*. Raven Press, New York, pp 1889–1920
137. Knopf CW 2000: Molecular mechanisms of replication of herpes simplex virus 1. *Acta Virol* **44**: 289-307
138. Ko S, Kang JG, Yeh JY, Moon JS, Choi GC, Won S, Chae JS 2013: First Report on Molecular Detection of Equine Upper Respiratory Infectious Viruses in Republic of Korea. *J Equine Vet Sci* **33**: 628-636
139. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GJ, Mumford JA 1994: Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity *Equine Vet J* **26**: 470–473
140. Kydd JH, Townsend HG, Hannant D 2006: The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol* **111**: 15-30
141. Laabassi F, Hue E, Fortier C, Morilland E, Legrand L, Hans A, Pronost S 2017: Epidemiology and molecular detection of equine herpesviruses in western Algeria in 2011. *Vet Microbiol* **207**: 205-209
142. Leutenegger CM, Madigan JE, Mapes S, Thao M, Estrada M, Pusterla N 2008: Detection of EHV-1 neuropathogenic strains using real-time PCR in the neural tissue of horses with myeloencephalopathy, *Vet Rec* **162**(21): 688-690
143. Lunn DP, Davis-Pointer N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla, N, Townsend HG 2009: Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J Vet Intern Med* **23**: 450-461
144. Malik P, Bálint A, Dán A, Pálfi V 2012: Molecular characterisation of the ORF68 region of equine herpesvirus-1 strains isolated from aborted fetuses in Hungary between 1977 and 2008. *Acta Vet Hung* **60**(1): 175-187

145. Malik P, Pálfi V, Bálint A 2010: Development of a new primer-probe energy transfer method for the differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J Virol Methods* **169**(2): 425-427
146. Manniger R, Csontos J 1941: Virusabortus der Stuten, *Dtsch Tieraerztl Wochenschr* **49**:103
147. Marenzoni ML, Bietta A, Lepri E, Casagrande Proietti P, Cordioli P, Canelli E, Stefanetti V, Coletti M, Timoney PJ, Passamonti F 2013: Role of equine herpesviruses as co-infecting agents in cases of abortion, placental disease and neonatal foal mortality. *Vet Res Commun* **37**: 311–317
148. Marenzoni ML, Coppola G, Maranesi M, Passamonti F, Cappelli K, Capomaccio S, Verini Supplizi A, Thiry E, Coletti M 2010: Age-dependent prevalence of equid herpesvirus 5 infection. *Vet Res Commun* **34**: 703–708
149. Marenzoni ML, Passamonti F, Cappelli K, Veronesi F, Capomaccio S, Supplizi AV, Valente C, Autorino G, Coletti M 2008: Clinical, serological and molecular investigations of EHV-1 and EHV-4 in 15 unweaned thoroughbred foals. *Vet Rec* **162**: 337–341
150. Marenzoni ML, Passamonti F, Cordioli P, Coppola G, Maranesi M, Passamonti F, Cappelli K, Capomaccio S, Supplizi AV, Thiry E, Coletti M 2010: Clinical and diagnostic features of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infection in 15 foals. *Ippologia* **18**: 37–41
151. Marenzoni ML, Passamonti F, Lepri E, Cercone M, Capomaccio S, Cappelli K, Felicetti M, Coppola G, Coletti M, Thiry E 2011: Quantification of equid herpesvirus 5 DNA in clinical and necropsy specimens collected from a horse with equine multinodular pulmonary fibrosis. *J Vet Diagn Invest* **23**: 802–806
152. Markoulatos P, Mangana-Vougiouka O, Koptopoulos G, Nomikou K, Papadopoulos O 2000: Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **84**(2):161-167
153. Marshall KR, Field HJ 1997: Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology* **229**: 279-282

154. Mathews REF 1979: Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **12**: 166
155. Matthews AG, Handscombe MC 1983: Superficial keratitis in the horse: treatment with the antiviral drug idoxuridine. *Equine Vet J* **2**: 29–31
156. McBrearty KA, Murray A, Dunowska M 2013: A survey of respiratory viruses in New Zealand horses. *N Z Vet J* **61**: 254–261
157. McFadden AM, Hanlon D, McKenzie RK, Gibson I, Bueno IM, Pulford DJ, Orr D, Dunowska M, Stanislawek WL, Spence RP, McDonald WL, Munro G, Mayhew IG 2016: The first reported outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in New Zealand. *N Z Vet J* **64**(2): 125-134
158. McGuire TC, Crawford TB, Henson JB 1974: Prevalence of antibodies to herpesvirus types 1 and 2, arteritis and infectious anemia viral antigens in equine serum. *Am J Vet Res* **35**: 181–185
159. Meissner H, Harms F 1937: Virusabort der Stuten. *Dtsch Tierrztl Wschr* **457**: 685-689
160. Mettenleiter TC, Klupp BG, L Granzow H 2006: Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**: 423-429
161. Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**, 1537-1547
162. Mihajlović B, Rogan D, Krstić Lj 1987: Virusni pobačaj kobila. I - Izolovanje i identifikacija virusa. *Veterinarski glasnik* **41** (10): 741-744
163. Minson AC, Davison AJ, Desrosiers RC, Fleckenstein B, McGeoch DJ, Pellett PE, Roizman B, Studdert DMJ 2000: Herpesviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Eds.): *Virus taxonomy*. Academic Press, New York, pp 203–225
164. Mori E, Borges AS, Delfiol DJ, Oliveira Filho JP, Gonçalves RC, Cagnini DQ, Lara MC, Cunha EM, Villalobos EM, Nassar AF, Castro AM, Brandao PE, Richtzenhain LJ 2011: First detection of the equine herpesvirus 1 neuropathogenic variant in Brazil. *Rev Sci Tech* **30**(3): 949-954
165. Mumford JA 1991: The epidemiology of equid herpesvirus abortion: a tantalizing mystery. *Equine Vet J* **23**(2): 77–78

166. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ 1999: *Veterinary Virology*. Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, 629 p
167. Murray MJ, Eichorn ES, Dubovi EJ, Ley WB, Cavey DM 1996: Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. *Equine Vet J* **28**: 432–436
168. Negussie H, Gizaw D, Tesfaw L, Li Y, Oguma K, Sentsui H, Tessema TS, Nauwynck HJ 2017: Detection of equine herpesvirus (EHV) -1, -2, -4 and -5 in Ethiopian equids with and without respiratory problems and genetic characterization of EHV-2 and EHV-5 strains. *Transbound Emerg Dis* doi:10.1111/tbed.12601
169. Negussie H, Gizaw D, Tessema TS, Nauwynck HJ 2017: Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis* **64**(2): 389-397
170. Nordengrahn A, Klin geborn B, Lindholm A, Merza M 2001: The use of a neutralizing monoclonal antibody to detect infections of equine herpesvirus type 2 (EHV-2). *J Vet Diagn Invest* **13**: 389–393
171. Nordengrahn A, Merza M, Ros C, Lindholm A, Palfi V, Hannant D, Belak S 2002: Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. *Vet Res* **33**: 251–259
172. Nordengrahn A, Rusvai M, Merza M, Ekstrom J, Morein B, Belak S 1996: Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. *Vet Microbiol* **51**: 55–68
173. Nowotny N, Burtscher H, Biiirki F 1987: Neuropathogenicity for suckling mice from the lippizan outbreak 1983 and of selected other EHV1 strains. *J Vet Med B* **34**: 441 – 448
174. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N 2006: Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J Virol* **80**: 4047–4060

175. O'Callaghan DJ, Osterrieder N 2008: Herpesviruses of horses. In: Mahy B, Van Regenmortel M (Eds): *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Publishing Co, Oxford, pp 411-420
176. O'Callaghan DJ, Allen GP, Randall CC 1978: Structure and replication of equine herpesvirus. In: Bryans JT, Gerber H (Eds.): *Equine Infectious Diseases*. Veterinary Publications, Princeton, New Jersey, pp 1-32
177. OIE. Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus -1 and -4). OIE Web sajt. https://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf
178. Osterrieder N 1999: Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res* **59**: 165-177
179. Paillot R, Daly JM, Luce R, Montesso F, Davis-Poynter N, Hannant D, Kydd JH 2007: Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN-gamma synthesising lymphocytes in ponies: The effects of age, pregnancy and infection. *Dev Comp Immunol* **31**: 202–214
180. Patel JR, Heldens J 2005: Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology disease and immunoprophylaxis. *Vet J* **170**: 14–23
181. Pellett PE, McKnight JL, Jenkins FJ, Roizman B 1985: Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans-inducing alpha genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5870–5874
182. Pellett PE, Roizman B 2006: The Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe, DM, Howley, PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Eds.): *Fields Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 2479-2499
183. Perkins G, Ainsworth DM, Erb HN, Del Piero F, Miller M, Wilkins PA, Palmer J, Frazer M 1999: Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal equine herpesvirus–1 infection compared with septic and premature foals. *Equine Vet J* **31**: 422 – 426
184. Perkins GA, Goodman LB, Dubovi EJ, Kim SG, Osterrieder N 2008. Detection of equine herpesvirus-1 in nasal swabs of horses by quantitative real-time PCR. *J Vet Intern Med* **22**(5): 1234-1238

185. Perkins GA, Goodman LB, Tsujimura K, Van de Walle GR, Kim SG, Dubovi EJ, Osterrieder N 2009: Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). *Vet Microbiol.* **139**(3-4): 375-378
186. Platt H, Singh H, Whitwell KE 1980: Pathological observations on an outbreak of paralysis in brood mares. *Equine Vet J* **12**: 118-126
187. Ploszay G, Rola J, Larska M, Zmudzinski JF 2013: First report on equine herpesvirus type 4 isolation in Poland-evaluation of diagnostic tools. *Pol J Vet Sci* **16**(3): 493-500
188. Plummer G, Bowling CP, Goodheart CR 1969: Comparison of Four Horse Herpesviruses. *J Virol* **4**(5): 738-741
189. Plummer G, Goodheart CR, Studdert MJ 1973: Equine herpesviruses: antigenic relationships and deoxyribonucleic acid densities. *Infect Immun* **8**(4): 621-627
190. Plummer G, Waterson AP 1963: Equine herpes viruses. *Virology* **19**: 412-416
191. Pronost S, Legrand L, Pitel PH, Wegge B, Lissens J, Freymuth F, Richard E, Fortier G 2011: Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: a clinical and molecular investigation. *Transbound Emerg Dis* **59**: 256-263
192. Pronost S, Léon A, Legrand L, Fortier C, Miszczak F, Freymuth F, Fortier G 2010: Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet Microbiol* **145**(3-4): 329-333
193. Pusterla N, Leutenegger CM, Wilson WD, Watson JL, Ferraro GL, Madigan JE 2005: Equine herpesvirus-4 kinetics in peripheral blood leukocytes and nasopharyngeal secretions in foals using quantitative real-time TaqMan PCR. *J Vet Diagn Invest* **17**: 578-581
194. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD 2010: Prevalence of equine herpesvirus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem. *Vet Rec* **167**(10): 376-378
195. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD 2012: Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses. *Vet J* **193**(2): 579-582
196. Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Finno C, Isbell D, Arthur RM, Ferraro GL 2009: Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1

- using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet J* **179**(2): 230-239
197. Randall CC, Ryden FW, Doll ER, Schell FS 1953: Cultivation of equine abortion virus in fetal horse tissue in vitro. *Am J Pathol* **29**: 139
 198. Randall CC., Stevens WC, Bracken EC 1954: Viremia in hamsters inoculated with equine abortion virus, *Am J Pathol* **30**: 654.
 199. Reed SM, Toribio RE 2004: Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet Clin N Am-Equine* **20**: 631-642
 200. Reubel GH, Crabb BS, Studdert MJ 1995. Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 and 5 infection by polymerase chain reaction. *Arch Virol* **140**: 1049-1060
 201. Richman LK, Montali RJ, Garber RL, Kennedy MA, Lehnhardt J, Hildebrandt T, Schmitt D, Hardy D, Alcendor DJ, Hayward GS 1999: Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants. *Science* **283**: 1171–1176
 202. Rizvi SM, Slater JD, Wolfinger U, Borchers K, Field HJ, Slade AJ 1997: Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous system of ponies. *J Gen Virol* **78**: 1115-1118
 203. Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K 1981: Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**: 201–217
 204. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ 1992: The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* **123**: 425-449
 205. Roizman B, Pellett PE 2001: The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
 206. Roizman B, Sears AE 1993: Herpes simplex viruses and their replication. In: Roizman B, Whitley RJ, Lopez C (Eds): *The Human Herpesviruses*. Raven Press, New York, pp 11-68
 207. Roizman B, Sears AE 1996: Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields N, Knipe DM, Howley PM (Eds.): *Fields Virology*. Lippincott-Raven, New York, pp. 2231–2295

208. Rudolph J, Osterrieder N 2002: Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology* **293**: 356-367
209. Ruzsczyk A, Cywinska A, Banbura MW 2004: Equine herpes virus 2 infection in horse populations in Poland. *Acta Virol* **48**(3):189-192
210. Sabine M 1980: Differentiation of equine herpesviruses of type 1. *Aust Vet J* **56**: 44-45
211. Salyi J 1942: Beitrag zur Pathohistologie des Virusabortus der Stuten. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* **77**: 244
212. Saxegaard F 1966: Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus 1 (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. *Nord Vet Med* **18**: 501
213. Schlocker N, Gerber-Bretscher R, von Fellenberg R 1995: Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. *Am J Vet Res* **56**: 749-754
214. Schultheiss PC, Collins JK, Hotaling SF 1997: Immunohistochemical demonstration of equine herpesvirus-1 antigen in neurons and astrocytes of horses with acute paralysis. *Vet Pathol* **34**(1): 52-54
215. Schwarz B, Gruber A, Benetka V, Rutgen B, Schwendenwein I, Leidinger E, van den Hoven R 2012: Concurrent T cell leukaemia and equine multinodular pulmonary fibrosis in a Hanoverian warmblood mare. *Equine Vet Educ* **24**: 187-192
216. Schwarz B, Klang A, Bezdekova B, Sardi S, Kutasi O, Hoven R 2013: Equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF): Five case reports. *Acta Vet Hung* **61**(3): 319-332
217. Sedlmeier H 1938: Enzootischer Virusabort bei Stuten. *Mfinch Tiers Wschr* **89**: 37-38
218. Shimizu T, Ishizaki R, Ishii S, Kawakami Y, Sugimura K, Matumoto M 1959: Isolation of equine abortion virus in horse kidney cell culture. *Tpn T Exp Med* **29**: 643
219. Shimizu T, Ishizaki R, Kono Y, Ishii S 1957: Propagation of equine abortion virus in horse kidney culture. *I Exp Med* **27**: 175

220. Slater J 2014: Equine Herpesviruses. In: Sellon DC, Long MT (Eds.): Equine Infectious Diseases. Saunders, Elsevier, St. Louis, pp 134-153
221. Slater JD, Borchers K, Thackray AM, Field HJ 1994: The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol* **75**(8): 2007-2016
222. Slater JD, Gibson BS, Barnett KC 1992: Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet Rec* **131**: 237-240
223. Smith DJ, Hamblin AS, Edington N 2001: Infection of endothelial cells with equine herpesvirus-1 (EHV-1) occurs where there is activation of putative adhesion molecules: A mechanism for transfer of virus. *Equine Vet J* **33**: 138–142
224. Smith DJ, Iqbal J, Purewal A, Hamblin AS, Edington N 1998: In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+/CD8+ leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *J Gen Virol* **79**(12): 2997-3004
225. Smith KC, Borchers K 2001: A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization. *J Comp Pathol* **125**(4): 304–310
226. Smith KC, McGladdery AJ, Binns MM, Mumford JA 1997: Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero. *Am J Vet Res* **58**(9): 997–1002
227. Smith KC, Mumford JA, Lakhani K 1996: A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *J Comp Pathol* **114**(3): 231–247
228. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA 1992: Abortion of virologically negative fetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus-1. *Equine Vet. J* **24**: 246-259
229. Smith KC, Whitwell KE, Blunden AS, Bestbier ME, Scase TJ, Geraghty RJ, Nugent J, Davis-Poynter NJ, Cardwell JM 2004: Equine herpesvirus-1 abortion: Atypical cases with lesions largely or wholly restricted to the placenta. *Equine Vet J* **36**: 79–82

230. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Gower SM, Hannat JP, Tearle JP 1993: An immunological study of the uterus of mares following experimental infection by equid herpesvirus 1. *Equine Vet J* **25**: 36-40
231. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Hannant D, Blunden AS, Tearle JP 2000: Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. *J Comp Pathol* **122**(4): 288–297
232. Smith KL, Allen GP, Branscum AJ, Cook RF, Vickers ML, Timoney PJ, Balasuriya UBR 2010: The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet Microbiol* **141**: 5–11
233. Smith KL, Li Y, Breheny P, Cook RF, Henney PJ, Sells S, Pronost S, Lu Z, Crossley BM, Timoney PJ, Balasuriya UBR 2012: New real-time PCR assay using allelic discrimination for detection and differentiation of equine herpesvirus-1 strains with A2254 and G2254 polymorphisms. *J Clin Microbiol* **50**: 1981-1988
234. Soare T, Leeming G, Morgan R, Papoula-Pereira R, Kipar A, Stewart J, Hetzel U 2011: Equine multinodular pulmonary fibrosis in horses in the UK. *Vet Rec* **169**: 313
235. Spear P 1985: Glycoproteins specified by herpes simplex virus. In: Roizman B (Ed.): *The Herpesviruses*. Plenum Press, New York.
236. Spivack JG, Fraser NW 1988: Expression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcripts and transcripts affected by the deletion in avirulent mutant HFEM: evidence for a new class of HSV-1 genes. *J Virol* **62**(9): 3281-3287
237. Staczek J 1990: Animal cytomegaloviruses. *Microbiol Rev* **54**: 247–265
238. Stasiak K, Dunowska M, Hills SF, Rola J 2017: Genetic characterization of equid herpesvirus type 1 from cases of abortion in Poland. *Arch Virol* **162**(8): 2329-2335
239. Stasiak K, Rola J, Ploszay G, Socha W, Zmudzinski JF 2015: Detection of the neuropathogenic variant of equine herpesvirus 1 associated with abortions in mares in Poland. *BMC Vet Res* **11**:102

240. Stierstorfer B, Eichhorn W, Schmahl W, Brandmuller C, Kaaden OR, Neubauer A 2002: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**: 37-41
241. Stokes A, Alber DG, Greensill J, Amellal B, Carvalho R, Taylor LA, Doel TR, Killington RA, Halliburton IW, Meredith DM 1996: The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res* **40**(1): 91-107
242. Studdert MJ 1974: Comparative aspects of equine herpesviruses. *Cornell Vet* **64**: 94-122
243. Studdert MJ, Blackney MH 1979: Equine herpesviruses: on the differentiation of respiratory from foetal strains of type 1. *Aust Vet J* **55**: 488-492
244. Studdert MJ, Hartley CA, Dynon K, Sandy JR, Slocombe RF, Charles JA, Milne ME, Clarke AF, El Hage C 2003: Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA. *Vet Rec* **153**: 417-423
245. Studdert MJ, Simpson T, Roizman B 1981: Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* **214**: 562-564
246. Studdert MJ, Turner AJ, Peterson JE 1970: Equine herpesviruses I. Isolation and characterisation of equine rhinopneumonitis virus and other equine herpesviruses from horses. *Aust Vet J* **46**: 83-89
247. Subramanian RP, Geraghty RJ 2007: Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 2903-2908
248. Sun Y, MacLean AR, Aitken JD, Brown SM 1996: The role of the gene 71 product in the life cycle of equine herpesvirus 1. *J Gen Virol* **77**: 493-500
249. Svansson V, Roelse M, Olafsdóttir G, Thorsteinsdóttir L, Torfason EG, Torsteinsdóttir S 2009: Immune response against equine gammaherpesvirus in Icelandic horses. *Vet Microbiol* **137**(3-4): 363-368
250. Tajima M, Shimizu T, Ishizaki R 1961: Electron microscopy of equine abortion virus. *Am J Vet Res* **22**: 250-265

251. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Binns MM, Livesay GJ, Mumford JA 1996: Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus. *J Comp Pathol* **115**(4): 385–397
252. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Binns MM, Livesay GL, Mumford JA 1996: Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymis of ponies and venereal shedding of infectious virus. *J Comp Pathol* **115**: 385-397
253. Tearle JP, Smith KC, Platt AJ, Hannant D, Davis-Poynter NJ, Mumford JA 2003: In vitro characterisation of high and low virulence isolates of equine herpesvirus-1 and -4. *Res Vet Sci* **75**(1): 83–86
254. Telford EA, Studdert MJ, Agius CT, Watson MS, Aird HC, Davison AJ 1993: Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. *Virology* **195**: 492–499
255. Telford EA, Watson MS, Aird HC, Perry J, Davison AJ 1995: The DNA Sequence of Equine Herpesvirus 2. *J Mol Biol* **249**(3): 520-528
256. Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ 1992: The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**(1): 304-316
257. Telford EA, Watson MS, Perry J, Cullinane AA, Davison AJ 1998: The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J Gen Virol* **79**(5): 1197-1203
258. Thein P, Darai G, Janssen W, Berg le RD, Strube W, Floss G 1993: Recent information about the etiopathogenesis of paretic–paralytic forms of herpesvirus infection in horses. *Tierärztl Prax* **21**: 445–450
259. Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, Griffiths L, Clapham P 1976: Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet J* **8**(2): 58–65
260. Thormann N, Van de Walle GR, Azab W, Osterrieder N 2012: The role of secreted glycoprotein G of equine herpesvirus type 1 and type 4 (EHV-1 and EHV-4) in immune modulation and virulence. *Virus Res* **169**(1): 203-211
261. Thorsteinsdóttir L, Torfason EG, Torsteinsdóttir S, Svansson V 2013: Genetic diversity of equine gammaherpesviruses (gamma-EHV) and isolation of a syncytium forming EHV-2 strain from a horse in Iceland. *Res Vet Sci* **94**: 170–177.

262. Thorsteinsdóttir L, Torfason EG, Torsteinsdóttir S, Svansson V 2010: Isolation and partial sequencing of Equid herpesvirus 5 from a horse in Iceland. *J Vet Diagn Invest* **22**(3): 420-423
263. Torfason EG, Thorsteinsdóttir L, Torsteinsdóttir S, Svansson V 2008: Study of equid herpesviruses 2 and 5 in Iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* **85**: 605–611
264. Turan N, Yildirim F, Altan E, Sennazli G, Gurel A, Diallo I, Yilmaz H 2012: Molecular and pathological investigations of EHV-1 and EHV-4 infections in horses in Turkey. *Res Vet Sci* **93**(3): 1504-1507
265. Turner AJ, Studdert MJ 1970: Equine herpesviruses. 3. Isolation and epizootiology of slowly cytopathic viruses and the serological incidence of equine rhinopneumonitis. *Aust Vet J* **46**: 581–586
266. Turner AJ, Studdert MJ, Peterson JE 1970: Equine herpesviruses. 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion. *Aust Vet J* **46**: 90-98
267. Turtinen LW, Allen GP 1982: Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1. *J Gen Virol* **63**: 481-485
268. USDA 2007: Equine herpesvirus myeloencephalopathy: A potentially emerging disease. <http://www.aphis.usdagov/vs/nahss/equine/ehv>.
269. Van Beurden S, Engelsma M 2012: Herpesviruses of Fish, Amphibians and Invertebrates. In: Dr. George Dimitri Magel (Ed.): *Herpesviridae - A Look Into This Unique Family of Viruses*. InTech, DOI: 10.5772/29575.
270. Van de Walle GR, Goupil R, Wishon C, Damiani A, Perkins GA, Osterrieder N 2009: A Single-nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to cause lethal neurological disease. *J Infect Dis* **200**: 20–25
271. Van de Walle GR, Peters ST, VanderVen BC, O'Callaghan DJ, Osterrieder N 2008: Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by alphaV integrins and an RSD motif in glycoprotein D. *J Virol* **82**: 11859- 11868
272. Van der Meulen K, Caij B, Pensaert M, Nauwynck H 2006: Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol* **113**: 265-273

273. Van der Meulen K, Vercauteren G, Nauwynck H, Pensaert M 2003a. A local epidemic of equine herpesvirus 1-induced neurological disorders in Belgium. *Vlaams Diergenschkund Tijds* **72**: 366-372
274. Van der Meulen KM, Nauwynck HJ, Pensaert MB 2003b: Absence of viral antigens on the surface of equine herpesvirus-1-infected peripheral blood mononuclear cells: a strategy to avoid complement-mediated lysis. *J Gen Virol* **84**: 93-97
275. Van Maanen C 2001a: Equine herpesvirus 1 and 4 and equine influenza virus infections: diagnosis, epidemiology and vaccinology. Doktorska disertacija, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands
276. Van Maanen C 2002: Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update, *Vet Quart* **24**(2): 57-78
277. Van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Damen EA, Derksen AG 2001b: Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet J* **33**(2): 191–196
278. Van Maanen C, Vreeswijk Joh, Moonen P, Brinkhof J de Boer-Luijtze E, Terpstra C 2000a: Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and, neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in the Netherlands. *Veterinary Quart* **22**: 88-93
279. Van Maanen C, Willink DL, Smeenk LAJ, Brinkhof J, Terpstra C 2000b: An equine herpesvirus 1 (EHV1) abortion storm at a riding school. *Vet Quart* **22**: 83-87
280. Van Regenmortel MHV, International Committee on Taxonomy of Viruses, International Union of Microbiological Societies 2000: Virus taxonomy. classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic, San Diego
281. Vander Werf KA, Davis EG, Janardhan K, Bawa B, Bolin S, Almes K 2014: Identification of equine herpesvirus 5 in horses with lymphoma. *J Equine Vet* **34**: 738–741
282. Varrasso A, Dynon K, Ficorelli N, Hartley CA, Studdert MJ, Drummer HE 2001: Identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust Vet J* **79**: 563–569

283. Wagner WN, Bogdan J, Haines D, Townsend HG, Misra V 1992: Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can J Microbiol* **38**(11): 1193-1196
284. Walter J, Balzer HJ, Seeh C, Fey K, Bleul U, Osterrieder N 2012: Venereal shedding of of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions. *J Vet Int Med* **26**: 1500-1504
285. Wang L 2003: An investigation of the association between herpes viruses and respiratory disease in racehorses in Western Australia. Doktorska disertacija, Murdoch University, Perth, Australia
286. Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N 1992: Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J Gen Virol* **73**(2): 261–268
287. Wellington JE, Love DN, Whalley JM 1996: Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Arch Virol* **141**: 167-175
288. Wharton JH, Henry BE, O'Callaghan DJ 1981. Equine cytomegalovirus: cultural characteristics and properties of viral DNA. *Virology* **109**(1):106–119
289. Whittaker, GR, Taylor LA, Elton DM, Giles LE, Bonass WA, Halliburton IW, Killington RA, Meredith DM 1992: Glycoprotein 60 of equine herpesvirus type 1 is a homologue of herpes simplex virus glycoprotein D and plays a major role in penetration of cells. *J Gen Virol* **73**(4): 801-809
290. Whitwell KE, Smith KC, Sinclair R, Mumford JA 1994: Foetal lesions in spontaneous EHV-4 abortions in mares. In: Plowright W Nakajima H (Eds.): *Equine Infectious Diseases*. R&W Publications, Newmarket, p 354
291. Wilkie GS, Kerr K, Stewart JP, Studdert MJ, Davison AJ 2015: Genome sequences of equid herpesviruses 2 and 5. *Genome Announc* **3**(2):e00119-15
292. Wilkins PA 2008: Equine multinodular pulmonary fibrosis: new, emerging or simply recently described? *Equine Vet Educ* **20**: 477-479
293. Wilkins PA 2013: Equine multinodular pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. *Equine Vet Educ* **25**: 393–397
294. Wilks CR, Studdert MJ 1974: Equine herpesviruses. 5. Epizootiology of slowly cytopathic viruses in foals. *Aust Vet J* **50**: 438–442

295. Williams KJ, Robinson NE, Lim A, Brandenberger C, Maes R, Behan A, Bolin SR 2013: Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. *PLoS One* **8**:e77754
296. Wilson WD 1997: Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* **13**: 53–72
297. Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, Ashton LV, Callan RJ, Hussey SB, Rao S, Goehring LS 2011: Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet Microbiol* **149**: 40–47
298. Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, Ashton LV, Callan RJ, Hussey SB, Rao S, Goehring LS 2010: Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet Microbiol* **149**(1-2): 40-47
299. Wong DM, Belgrave RL, Williams KJ, Del Piero F, Alcott CJ, Bolin SR, Marr CM, Nolen Walston R, Myers RK, Wilkins PA 2008: Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. *J Am Vet Med Assoc* **232**: 898-905
300. Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kondo T, Kai K 2000: Application of a type-specific enzyme-linked immunosorbent assay for equine herpesvirus types 1 and 4 (EHV-1 and -4) to horse populations inoculated with inactivated EHV-1 vaccine. *J Vet Med Sci* **62**(7): 687-691
301. Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kondo T, Kai K, Iwata H, Inoue T 1998: Diagnosis and sero-epizootiology of equine herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type-specific ELISA. *J Vet Med Sci* **60**: 1133–1137
302. Yilmaz H, Altan E, Turan N, Gurel A, Haktanir D, Sonmez K, Deniz S, Gulcubuk A, Gur E, Sonmez G, Richt JA 2012: First Report on the Frequency and Molecular Detection of Neuropathogenic EHV-1 in Turkey. *J Equine Vet Sci* **32**(9): 525-530

BIOGRAFIJA AUTORA

Andrea Radalj

Andrea Radalj rođena je 05.06.1989. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Na Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala se školske 2008/2009. godine, a diplomirala oktobra 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,58. Školske 2013/2014. godine upisala je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom osnovnih studija bavila se naučno-istraživačkim radom i kliničkom praksom, a bila je i član uredništva časopisa studenata Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu „Hiron“. U periodu od maja do oktobra 2014. godine bila je stipendista doktorant Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije uključena na projekat TR 31008. Od 01.10.2014. godine je zaposlena na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu kao asistent za užu naučnu oblast Mikrobiologija sa imunologijom. Od 2015. godine primljena je kao mladi istraživač na projektu: „Razvoj i primena molekularnih metoda zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze (PCR) u brznoj i direktnoj identifikaciji sojeva virusa Newcastle bolesti živine i ispitivanje imunogenosti subjedinične vakcine pripremljene od njihovih antigena“ pod evidencionim brojem TR 31008 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Andrea Radalj aktivno učestvuje u izvođenju praktičnog dela nastave u okviru osnovnih i posle diplomskih studija, a do sada je učestvovala i u izvođenju programa užih veterinarskih specijalističkih studija iz Mikrobiologije sa imunologijom u okviru projekta TEMPUS „Striving Towards Excellence in Veterinary Education (EDUVET)“, kao i u programu kontinuirane edukacije koji se odnosio na primenu metode PCR u kliničkoj mikrobiologiji. Andrea Radalj je objavila 10 naučno – stručnih radova iz uže naučne oblasti Mikrobiologija sa imunologijom. Pored toga, kao autor i koautor do sada je usmeno prezentovala radove na X i XI Kongresu mikrobiologa Srbije (predavanje po pozivu). Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Андреа Радаљ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификација и молекуларна карактеризација херпесвируса коња

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 30.04.2018.

Андреа Радаљ

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Андреа Радаљ

Број уписа

Студијски програм докторске академске студије

Наслов рада Идентификација и молекуларна карактеризација херпесвируса коња

Ментор Проф. др Ненад Милић

Потписани Андреа Радаљ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 30.04.2018.

Handwritten signature of Andrea Radalj in black ink, written over a horizontal line.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Идентификација и молекуларна карактеризација херпесвируса коња

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 30.04.2018.

