

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

ZBORNIK PREDAVANJA
XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAJJA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

**ZBORNİK PREDAVANJA XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA**

Beograd, 2022.

XLIII SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA
Beograd, 25.02.2022.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasni predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Predsednik: Prof. dr Danijela Kirovski

Članovi: Prof. dr Vanja Krstić, Doc. dr Milan Maletić, Doc. dr Slađan Nešić,
Doc. dr Ljubomir Jovanović, Asist. dr Branislav Vejnović, Maja Gabrić

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: Prof. dr Ivan Jovanović, Prof. dr Vladimir Nešić, Prof. dr Nedeljko Karabasil, Prof. dr Dragan Šefer,
Prof. dr Sonja Radojičić, Prof. dr Ivan Vujanac, Doc. dr Miloš Vučićević



Izdavač:

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

CID

Za izdavača:

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

Urednik:

Prof. dr Dragan Gvozdić

Lektura i korektura:

Prof. dr Ivan B. Jovanović
Prof. dr Jakov Nišavić
Prof. dr Dragan Gvozdić

Dizajn korica:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prelom teksta:

Gordana Lazarević

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-46-2

DETEKCIJA NEUROVIRULENTNIH SOJEVA KONJSKOG HERPESVIRUSA 1

Andrea Radalj, Jakov Nišavić, Nenad Milić*

Konjski herpesvirus 1 (EHV-1) kao jedan od najznačajnijih uzročnika infekcija konja koji nanosi velike ekonomske štete dovodeći do pojave rinopneumonitisa, pobačaja i neuroloških poremećaja. EHV-1 opstaje u populaciji prijemčivih domaćina zahvaljujući ciklusima latencije i reaktivacije virusa šireći se direktnim ili indirektnim kontaktom. Mutacija na nivou jednog nukleotida u okviru ORF30 gena koji kodira sintezu virusne DNK polimeraze uslovljava neurovirulentni potencijal sojeva EHV-1. Primenom metoda izolacije virusa i PCR ispitano je 140 uzoraka tkiva i nosnih briseva klinički zdravih nevakcinisanih konja kao i sojevi EHV-1 izolovani iz pobačenih fetusa. Ispitivana je rasprostranjenost i virulencija sojeva EHV-1 kao i klinički značaj dobijenih rezultata. Detektovano je 115 pozitivnih uzoraka pri čemu je utvrđeno da 82% poseduje neurovirulentni genetski marker. Virulencija EHV-1 ne predstavlja presudni faktor za razvoj kliničkih simptoma oboljenja kod inficiranih konja. Neurovirulentni sojevi EHV-1 cirkulišu u populaciji klinički zdravih konja, međutim imaju značaj u slučajevima pobačaja gravidnih kobila. Pored toga, utvrđena je važna uloga nervnog tkiva za ostvarivanje latencije i reaktivacije EHV-1 kod klinički zdravih konja prethodno izloženih stresu. Naši rezultati ukazuju na značaj asimptomatski inficiranih konja koji izlučuju EHV-1 i mogu predstavljati izvor infekcije za imunološki neadaptirane jedinke što se mora uzimati u obzir prilikom mešanja konja iz različitih populacija.

Ključne reči: *asimptomatske kliconoše, EHV-1, konji, neurovirulencija, ORF30, pobačaj*

UVOD

Konjski herpesvirus 1 (EHV-1) predstavlja jedan od najznačajnijih uzročnika infekcija konja i izazivajući rinopneumonitis, pobačaje i neurološke poremećaje, a svrstan je u rod *Varicellovirus* i podfamiliju *Alphaherpesvirinae* u okviru familije *Herpesviridae* (Slater, 2014; ICTV, 2022). Genom EHV-1 je veličine 150 kiloba-

* Dr Andrea Radalj, docent, dr Jakov Nišavić, profesor, dr Nenad Milić, profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju

za (kb) i kodira 76 gena, odnosno 80 otvorenih okvira čitanja (*eng.* open reading frame, ORF) (ICTV, 2022). Pojedini geni navedenog virusa su varijabilni što je često veoma korisno za analizu sojeva EHV-1 jer određene mutacije ukazuju na njihovu patogenost (Lunn i sar. 2009; Negussie i sar. 2017). Infekcija konjskim herpesvirusom 1 je endemski prisutna u populacijama konja širom sveta, a latentno inficirani konji predstavljaju najvažniji rezervoar infekcije (Slater, 2014). Posle primarne infekcije, EHV-1 uspostavlja latenciju u trigeminalnim ili sakralnim ganglijama i leukocitima pri čemu dolazi do njegove reaktivacije u stresnim uslovima (Slater, 2014; Samoilowa i sar. 2021). Konjski herpesvirus 1 se među prijemčivim životinjama prenosi direktnim i indirektnim kontaktom, a u visokim titrima se može naći u nosnom sekretu, pobačenim fetusima i placenti (Wang i sar. 2007; Turan i sar. 2012; Negussie i sar. 2017; Stasiak i sar. 2020). Periodi reaktivacije EHV-1 mogu proteći asimptomatski ili uz pojavu blagih kliničkih simptoma, što je veoma značajno sa aspekta održavanja endemskih ciklusa infekcije ovim virusom (Slater, 2014). Pobačaji izazvani EHV-1 su često pojedinačni slučajevi, ali se mogu javiti i kod većeg broja kobila na nekoj teritoriji, odnosno u vidu epizootija (Turan i sar. 2012). Gravidne kobile najčešće abortiraju tokom trećeg trimestra, a ukoliko se žderebad rode, dolazi do uginuća usled komplikacija izazvanih intersticijalnom pneumonijom (Turan i sar. 2012; Stasiak i sar. 2020). Novija ispitivanja su pokazala da je mutacija, odnosno, supstitucija adenina (A) guaninom (G) na poziciji 2254 gena virusne DNK polimeraze EHV-1 (koju kodira ORF 30 genetski fragment) jedinstvena za sojeve virusa sa neurovirulentnim potencijalom. Kao posledica ove mutacije, na poziciji 752 u okviru DNK polimeraze EHV-1 asparagin (N) zamenjuje asparaginska kiselina (D) tako da se neurovirulentni sojevi u literaturi obeležavaju kao D₇₅₂ EHV-1 (Goodman i sar. 2007; Lunn i sar. 2009). Smatra se da supstitucija navedenih aminokiselina ima uticaj na funkciju DNK polimeraze EHV-1 dovodeći do efikasnije replikacije virusa u leukocitima, a samim tim i do visokog stepena viremije (Goodman i sar. 2007; Samoilowa i sar. 2021). Neurološko oboljenje izazvano navedenim sojevima virusa se još naziva i herpesvirusna mijeloencefalopatija konja i karakteriše se pojavom simptoma koji variraju od blage ataksije do kompletne paralize u zavisnosti od lokalizacije i veličine zahvaćenog dela CNS (Lunn i sar. 2009; Negussie i sar. 2017). Visokovirulentni sojevi EHV-1, kao što je soj Ab4, su endoteliotropni, uspostavljaju visoke nivoe viremije vezane za leukocite i posledično dovode do pojave pobačaja i neurološkog oboljenja, dok drugi, slabije virulentni sojevi poput V592 nisu povezani sa teškim kliničkim simptomima (Goodman i sar. 2007). Upravo je na osnovu razlika u genetskim sekvencama ova dva soja EHV-1 ustanovljeno da mutacija na nivou jednog nukleotida u ORF30 regionu može da se upotrebljava kao molekularni marker za detekciju neurovirulentnih sojeva navedenog virusa (Lunn i sar. 2009; Garvey i sar. 2019).

Konjski herpesvirus 1 je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu prvi put izolovan osamdesetih godina prošlog veka i to iz slezine, jetre, pluća, placente i amnionske tečnosti poreklom od pobačenih fetusa tokom epizootija pobačaja na ergeli "Ljubičevo". Pomenuti izolati virusa se od tada čuvaju na Katedri za mikrobiologiju kao arhivski uzorci. Cilj našeg ispitivanja bio je da prime-

nom molekularnih metoda analiziramo navedene arhivske izolate EHV-1 i uzorke poreklom od nevakcinisanih klinički zdravih konja kako bismo ustanovili postojanje diverziteta cirkulišućih sojeva EHV-1 i njihovog kliničkog značaja.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovano je ukupno 40 nosnih briseva nevakcinisanih klinički zdravih konja i 100 uzoraka tkiva (submandibularni limfni čvorovi, slezina, kičmena moždina i produžena moždina) poreklom od 25 konja sa klanice. Uzorci tkiva su prikupljeni od lipicanera ili konja mešanih rasa preklom iz različitih delova Srbije (Južna Bačka, Srem, Banat, Beograd, Mačva, Braničevo i Bor). Nosni brisevi su uzorkovani od konja rase lipicaner iz ergele u Prnjavoru u Republici Srpskoj (BiH). Konji u navedenoj ergeli su držani u tri odvojene štale: dve štale sa po 15 kobila i jedna štala sa ukupno 10 pastuva. Kobile u pojedinačnim štalama nisu držane odvojeno u boksevima i sve su bile u direktnom kontaktu. Pored navedenih uzoraka, ispitivani su i arhivirani sojevi EHV-1 izolovani iz pobačenih fetusa sa ergele "Ljubičevo".

Prikupljeni uzorci su homogenizovani u fosfatnom slanom puferu (PBS) i centrifugirani na 5000 obrtaja/min tokom 10 minuta, a dobijeni supernatanti su pre inokulacije na kulturu ćelija profiltrovani pomoću filtera za jednokratnu upotrebu sa veličinom pora od 0.22µm. Kao materijal za ekstrakciju DNK upotrebljen je talog poreklom od uzoraka briseva i tkiva i svi uzorci inokulisanih ćelija u kojima je prilikom izolacije virusa zapažena pojava karakterističnog citopatogenog efekta (CPE). Ekstrakcija DNK je vršena primenom kita GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD).

Izolacija virusa je vršena primenom ćelijske linije Rabbit Kidney 13 (RK-13, ATCC CCL-37, IZSBS, Breša, Italija). Neinokulisane ćelije su predstavljale negativnu kontrolu, dok je kao pozitivna kontrola korišćen soj EHV-1 dobijen ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije. Posle pojave izraženog CPE, inkubacija je prekidana i materijal sa umnoženim virusom je zamrzavan. Ćelije 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 inokulisane materijalom iz prve pasaže. Utrošeno vreme za ispitivanje svih uzoraka 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.

Potvrda prisustva EHV-1 u inokulisanim ćelijskim linijama sa vidljivim CPE je vršena primenom metode nested PCR, pri čemu je ista metoda korišćena i za utvrđivanje prisustva virusne nukleinske kiseline direktno u uzorcima nosnih briseva i tkiva konja (Wang i sar. 2007). Uzorci u kojima je utvrđeno prisustvo EHV-1 su zatim dalje ispitivani metodom PCR u cilju umnožavanja varijabilnog regiona ORF30 veličine 466bp (Goodman i sar. 2007). Negativnu kontrolu u PCR metodi predstavljala je DNK konjskog herpesvirusa 5 (EHV-5), dok je kao pozitivna kon-

trola korišćena ekstrahovana DNK kontrolnog soja EHV-1 korišćenog u metodi izolacije virusa.

Produkti PCR sa umnoženim delom gena ORF30 su poslani na uslužno sekvenciranje u Macrogen Europe laboratoriju u Amsterdamu (Holandija). Dobijene sekvence su dalje analizirane u odnosu na dostupne sekvence iz Banke gena (GenBank) primenom BLAST softvera (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Odabrane reprezentativne sekvence dela gena ORF30 su zatim analizirane na prisustvo mutacije povezane sa neurovirulencijom u poređenju sa sekvencama referentnih sojeva EHV-1 iz Banke gena pomoću softvera BioEdit 7.2.5.

REZULTATI

Prisustvo citopatogenog efekta (CPE) u inokulisanim ćelijama zabeleženo je nakon prve pasaže sva četiri arhivirana soja EHV-1 kao i u prvoj, drugoj ili trećoj pasaži 51 uzorka tkiva, odnosno 19 nosnih briseva (Slika 1). Identifikacija EHV-1 je zatim primenom metode nested PCR izvršena u 47 inokulisanih uzoraka tkiva i 17 nosnih briseva. Direktnim ispitivanjem uzorkovanog materijala primenom metode nested PCR prisustvo nukleinske kiseline EHV-1 ustanovljeno je u 86 uzoraka tkiva i 29 nosnih briseva (Tabela 1). Uzorci tkiva pozitivni na prisustvo EHV-1 pripadali su 23 od ukupno 25 konja sa klanice, a navedeni virus je detektovan i kod 29 kobilica iz obe štale, dok je preostalih 10 pastuva iz treće štale bilo negativno.

Tabela 1 Rezultati detekcije EHV-1 primenom metode izolacije virusa i nested PCR

| Metoda detekcije | Kičmena moždina | Produžena moždina | Limfni čvor | Slezina | Nosni bris | Ukupno |
|------------------|-----------------|-------------------|-------------|---------|------------|-----------|
| Izolacija virusa | 15 | 8 | 11 | 13 | 17 | 64 (46%) |
| Nested PCR | 23 | 21 | 21 | 21 | 29 | 115 (82%) |



Slika 1. Izolacija EHV-1 u ćelijskoj liniji RK-13, citopatogeni efekat

Ukupno 29 uzoraka je odabrano za sekvenciranje dela gena ORF30 i to poreklom od tkiva 23 EHV-1 pozitivna konja (jedan uzorak po životinji), 4 arhivirana izolata EHV-1 i dva uzorka poreklom od nosnih briseva kobila (jedan reprezentativni uzorak po štali u kojoj su smeštene EHV-1 pozitivne jединke). Dobijene sekvence su zatim poređene sa referentnim sekvencama sojeva EHV-1 sa i bez prisutne mutacije koja uslovljava neurovirulentni potencijal: sojem Ab4 (AY665713.1) i sojem V592 (AY464052.1) (Slika 2). Sva četiri arhivirana izolata EHV-1, oba izolata iz nosnih briseva kobila i ukupno 18 uzoraka tkiva svrstano je u neurovirulentne sojeve EHV-1. Pored toga, 4 uzorka poreklom iz tkiva konja nije posedovalo neurovirulentni genetski marker, a jedan uzorak nije bio pogodan za dalju analizu. Ukupno 82% reprezentativnih uzoraka pripadalo je neurovirulentnim sojevima EHV-1 dok prisustvo drugih mutacija nije zabeleženo. Analizom anamnestičkih podataka nije utvrđena skorija pojava neuroloških simptoma oboljenja i/ili pobačaja u populaciji životinja sa ergele od kojih su prikupljeni nosni brisevi. Dobijene sekvence ORF30 genetskog segmenta su dostupne u Banci gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) sa obeležjima od MW316760 do MW316787.

| | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 |
|--------------------------------|------|------------|------------|------------|
| EHV-1 strain Ab4 (AY665713.1) | CT | TCAACCATCC | GTCGACTACT | CGACGTTCGA |
| EHV-1 strain V592 (AY464052.1) | . | . | A | . |
| EHV1_A130 (MW316760) | . | . | . | . |
| EHV1_A230 (MW316761) | . | . | . | . |
| EHV1_A330 (MW316762) | . | . | . | . |
| EHV1_A430 (MW316763) | . | . | . | . |
| EHV1_NS4 (MW316764) | . | . | . | . |
| EHV1_NS18 (MW316765) | . | . | . | . |
| EHV1_S13 (MW316766) | . | . | A | . |
| EHV1_LN6 (MW316767) | . | . | A | . |
| EHV1_M16 (MW316768) | . | . | A | . |
| EHV1_S19 (MW316769) | . | . | A | . |
| EHV1_LN8 (MW316770) | . | . | . | . |
| EHV1_LN24 (MW316771) | . | . | . | . |
| EHV1_M2 (MW316772) | . | . | . | . |
| EHV1_M3 (MW316773) | . | . | . | . |
| EHV1_M14 (MW316774) | . | . | . | . |
| EHV1_M17 (MW316775) | . | . | . | . |
| EHV1_M18 (MW316776) | . | . | . | . |
| EHV1_M21 (MW316777) | . | . | . | . |
| EHV1_M23 (MW316778) | . | . | . | . |
| EHV1_S12 (MW316779) | . | . | . | . |
| EHV1_SC1 (MW316780) | . | . | . | . |
| EHV1_SC4 (MW316781) | . | . | . | . |
| EHV1_SC5 (MW316782) | . | . | . | . |
| EHV1_SC7 (MW316783) | . | . | . | . |
| EHV1_SC15 (MW316784) | . | . | . | . |
| EHV1_SC20 (MW316785) | . | . | . | . |
| EHV1_SC22 (MW316786) | . | . | . | . |
| EHV1_SC25 (MW316787) | . | . | . | . |

Slika 2. Poređenje sekvenci ORF30 genetskog segmenta detektovanih sojeva EHV-1 sa referentnim sojevima Ab4 i V592. Identični nukleotidi su obeleženi tačkama, a sojevi EHV-1 bez neurovirulentnog markera su označeni sivom bojom.

DISKUSIJA

Rezultati našeg ispitivanja ukazuju da većina analiziranih sekvenci EHV-1 (82%) poseduje genetski marker povezan sa neurovirulentnim potencijalom što ukazuje na rasprostranjenost navedenih sojeva virusa u Srbiji i Republici Srpskoj (BiH). Veliki broj ispitivanja na temu prisustva neurovirulentnih sojeva EHV-1 ukazuje na njihovo prisustvo u populacijama konja širom sveta koje je poslednjih godina u naročitom porastu (Castro i Arbiza, 2017; Negussie i sar. 2017; Preziuso i sar. 2019). Takođe, veliki broj autora ukazuje da je pojava herpesvirusne mijeloencefalopatije kod konja u najvećem broju slučajeva povezana upravo sa infekcijom neurovirulentnim sojevima EHV-1 (Negussie i sar. 2017; Garvey i sar. 2019). Uprkos tome, većina D_{752} sojeva detektovanih u našem ispitivanju potiče od klinički zdravih jedinki. Izolati EHV-1 poreklom iz nosnih briseva kobila iz obe štale su posedovali neurovirulentni genetski marker, međutim ne postoje anamnestički podaci koji ukazuju na pojavu neurološkog oboljenja ili pobačaja u navedenoj populaciji životinja. Ovakav nalaz ide u prilog hipotezi da faktori rizika za pojavu neurološkog oboljenja ne zavise isključivo od virulencije soja EHV-1 već predstavljaju kombinaciju faktora poreklom kako iz spoljašnje sredine tako i od samog domaćina (Lunn i sar. 2009; Garvey i sar. 2019). Oboljenje izazvano EHV-1 često može imati subklinički tok i naši rezultati ukazuju da pomenuta pojava ne zavisi od neurovirulentnog potencijala soja virusa. Postoji verovatnoća da je ispitivana populacija konja imunološki adaptirana na infekciju EHV-1, odnosno da postoji zadovoljavajući nivo specifičnog imuniteta protiv neurovirulentnih sojeva virusa koji su u cirkulaciji. Nedavna ispitivanja herpesvirusne mijeloencefalopatije konja otkrivaju postojanje novog genotipa kao posledice nukleotidne supstitucije na poziciji C_{2254} gena ORF30 što dodatno komplikuje povezivanje genotipa virusa sa njegovim patogenim potencijalom, međutim, u našim ispitivanjima nije detektovan nijedan soj sa ovim karakteristikama (Sutton i sar. 2020; Pusterla i sar. 2021).

Veliki broj detektovanih D_{752} sojeva u uzorcima tkiva EHV-1 pozitivnih konja u našem ispitivanju je u korelaciji sa rezultatima drugih autora (Castro i Arbiza, 2017). Konji od kojih potiču naši uzorci su svi nevakcinisani, klinički zdravi i poreklom iz privatnih gazdinstava gde su uglavnom služili kao radne životinje. U poređenju sa rezultatima izolacije virusa, veći broj pozitivnih uzoraka tkiva detektovan je primenom metode nested PCR što ukazuje na postojanje slabo produktivne ili latentne infekcije. Detekcija EHV-1 u određenim tkivima u našem ispitivanju, slično rezultatima drugih autora, ukazuje na tropizam ovog virusa prema limfoidnom i nervnom tkivu (Giessler i sar. 2020; Samoilowa i sar. 2021).

Većina neurovirulentnih izolata EHV-1 u našoj studiji je poreklom upravo iz nervnog tkiva konja kao najčešćeg mesta gde navedeni virus ostvaruje latentnu infekciju usled čega je njegova izolacija često bezuspešna (Slater, 2014; Giessler i sar. 2020; Samoilowa i sar. 2021). Uspešna izolacija EHV-1 iz uzoraka kičmene i produžene moždine konja u našem ispitivanju potvrđuje važnost nervnog tkiva kao mesta ostvarivanja latentne infekcije, odnosno reaktivacije navedenog virusa (Giessler i sar. 2020; Samoilowa i sar. 2021). Replikacija EHV-1 u je ovom slu-

čaju verovatno posledica stresa koji je za konje predstavljao transport u klanicu i smeštanje u depo, pri čemu istovremeno odsustvo kliničkih simptoma oboljenja ukazuje na mogućnost postojanja asimptomatskih kliconoša koji izlučuju neurovirulentne sojeve EHV-1.

Rezultati naše studije potvrđuju da su epizootije pobačaja tokom osamdesetih godina prošlog veka na ergeli "Ljubičevo" bili posledica infekcije neurovirulentnim sojevima EHV-1. Slično, Damiani i sar. (2014) opisuju pojavu pobačaja na jednoj ergeli u Nemačkoj izazvanu D₇₅₂ sojevima navedenog virusa. Skorije studije takođe ukazuju na visko stepen povezanosti infekcije neurovirulentnim sojevima EHV-1 i pojavu multipnih pobačaja kao i neurološkog obojenja (Garvey i sar. 2019). Ispitivanja sprovedena u Italiji takođe potvrđuju visoku prevalenciju D₇₅₂ EHV-1 u slučajevima pobačaja gravidnih kobila i ukazuju na široku rasprostranjenost ovih sojeva virusa u populaciji konja u ovoj zemlji (Preziuso i sar. 2019). Uprkos tome, rezultati nekih drugih studija ne potvrđuju isključiv značaj infekcije sojevima EHV-1 sa neurovirulentnim genetskim markerom u etiologiji pobačaja (Turan i sar. 2012; Stasiak i sar. 2020).

Rezultati našeg ispitivanja doprinose saznanju o distribuciji, diverzitetu i potencijalnom kliničkom značaju sojeva EHV-1 koji cirkulišu u populaciji konja u Srbiji i Bosni i Hercegovini. Naime, označavanje detektovanog soja EHV-1 kao neurovirulentnog nije dovoljan parametar u smislu određivanja kliničkog značaja takvog nalaza i drugi faktori poput imuniteta domaćina i forme infekcije moraju biti uzeti u obzir prilikom pravljenja takvih procena. Asimptomatski inficirani konji izlučuju EHV-1 u spoljašnju sredinu i predstavljaju izvor virusa za druge konje što svakako zahteva sprovođenje adekvatnih kontrolnih mera, naročito prilikom uvođenja novih životinja u zapat. Konjski herpesvirus 1 ispoljava tropizam prema limfoidnom i nervnom tkivu konja i ova studija dodatno potvrđuje značaj nervnog tkiva u ciklusima latencije i reaktivacije virusa.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-9/2021-14).

LITERATURA

1. Castro ER, Arbiza J, 2017, Detection and genotyping of equid herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech*, 36(3), 799–806.
2. 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), 555–62.
3. Garvey M, Lyons R, Hector RD, Walsh C, Arkins S, Cullinane A, 2019, Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017, *Pathog (Basel, Switzerland)*, 8(1).
4. Giessler KS, Samoilowa S, Soboll Hussey G, et al., 2020, Viral load and cell tropism during early latent equid herpesvirus 1 infection differ over time in lymphoid and neural tissue samples from experimentally infected horses, *Front Vet Sci*, 7, 621.

5. Goodman LB, Loregian A, Perkins GA, Nugent J, Buckles EL, et al., 2007, A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity, *PLoS Pathog*, 3(11), e160.
6. ICTV, 2022, Dostupno na: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae (pristupljeno: 29.01.2022.)
7. Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJBF, Horohov DW, Osterrieder K, et al., 2009, Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement, *J Vet Intern Med*, 23(3), 450–61.
8. 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), 389–97.
9. Prezioso S, Sgorbini M, Marmorini P, Cuteri V, 2019, Equid alphaherpesvirus 1 from Italian Horses: Evaluation of the Variability of the ORF30, ORF33, ORF34 and ORF68 Genes, *Viruses*, 11(9).
10. Pusterla N, Barnum S, Miller J, Varnell S, Dallap-Schaer B, et al., 2021, Investigation of an EHV-1 Outbreak in the United States Caused by a New H752 Genotype, *Pathogens*, 10(6).
11. Samoilowa S, Giessler KS, Torres CEM, Hussey GS, Allum A, et al., 2021, Equid herpesvirus-1 Distribution in Equine Lymphoid and Neural Tissues 70 Days Post Infection, *Pathogens*, 10(6).
12. Slater J, 2014, Chapter 14 - Equine Herpesviruses, In Sellon DC, Long MT, editors, *Equine infectious diseases*, St. Louis, W.B. Saunders, 151-68.e8.
13. Stasiak K, Dunowska M, Rola J, 2020, Outbreak of equid herpesvirus 1 abortions at the Arabian stud in Poland, *BMC Vet Res*, 16(1), 374.
14. Sutton G, Thieulent C, Fortier C, Hue ES, Marcillaud-Pitel C, et al., 2020, Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C(2254)/H(752) Strain in French Horses Showing no Major Impact on the Strain Behaviour, *Viruses*, 12(10),1160.
15. Turan N, Yildirim F, Altan E, Sennazli G, Gurel A, et al., 2012, Molecular and pathological investigations of EHV-1 and EHV-4 infections in horses in Turkey, *Res Vet Sci*, 93(3), 1504–7.
16. Wang L, Raidal SL, Pizzirani A, Wilcox GE, 2007, Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR, *Vet. Microbiol*, 121(1), 18–28.

THE DETECTION OF NEUROVIRULENT EHV-1 STRAINS

Andrea Radalj, Jakov Nišavić, Nenad Milić

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) is one of the most important equine pathogens and causes rhinopneumonitis, abortion, and neurological disorders, leading to major economic losses. EHV-1 is maintained through latency and reactivation cycles, and spreads among horses by direct or indirect contact. The single nucleotide polymorphism within the ORF30 gene encoding the viral DNA polymerase conditions the neurovirulent potential of EHV-1 strains. A total of 140 tissue and nasal swab samples from clinically healthy unvaccinated horses, as well as EHV-1 strains isolated from aborted fetuses, were examined using virus isolation and PCR. The distribution and virulence of EHV-1 strains along with the clinical implications of the obtained results were analyzed. Overall, 115 positive samples were detected, with 82% containing the neurovirulent marker. EHV-1 virulence is not crucial for clinical symptom development in infected horses. Neurovirulent EHV-1 strains circulate among clinically healthy horses, however, they are also important in cases of abortion. Additionally, neural tissue has a major role in EHV-1 latency and reactivation in clinically healthy horses exposed to stress. Our results indicate that asymptotically infected horses shed EHV-1 and may represent an infection source for immunologically unadapted individuals, which must be taken into account when mixing different populations of horses.

Key words: abortion, EHV-1, horses, neurovirulence, ORF30, silent shedders

**Organizaciju XLIII simpozijuma za inovacije znanja veterinara,
finansijski su podržale sledeće organizacije i preduzeća:**

Pokrovitelj

Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu
uz podršku Veterinarske komore Srbije

Veliki sponzori:

Ave & Vetmedic
Aevum pet care
Kinološki savez Srbije
Veterinarski institut dr Vaso Butozan

Sponzori:

VSI Kraljevo
VSI Jagodina
Naučni institut za veterinarstvo Srbije
Institut za higijenu u tehnologiju mesa
Marlofarma
Promedia
Vivogen
VS Bujanovac
Veterinarski zavod Subotica
Hrana produkt
Superlab
VSI Šabac
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad
UVPS
VSI Niš
Krka Farma
Fishcorp 2000 feed
Evrolek
Zoolek
Biochem Balkan
VSI Subotica
VSI Sombor
VS Mladenovac
Naturavitalis
VSI Pančevo
VSI Zaječar
Lusa vet
Royal Vet
VSI Požarevac
Primavet

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд

636.09(082)

СЕМИНАР за иновације знања ветеринара (43 ; 2022 ; Београд)

Zbornik predavanja XLIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Beograd, [25.02.2022.] / [urednik Dragan Gvozdić]. - Beograd : Fakultet veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2022

(Beograd : Naučna KMD). - [7], 205 str. : ilustr. ; 24 cm

Na vrhu nasl. str.: Univerzitet u Beogradu. - Tiraž 450. - Str. [3]: Predgovor / Milorad Mirilović, Danijela Kirovski. - Bibliografija uz svaki rad. - Summeries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-46-2

а) Ветерина - Зборници

COBISS.SR-ID 58357769