

ARKLIŲ *HERPES* VIRUSŲ PAPLITIMAS LIETUVOS ŽIRGYNuose

Vida Liutkevičienė¹, Violeta Mockeliūnienė², Algirdas Šalomska^{1,2}, Marija Stankevičienė¹, Saulius Petkevičius^{1,2}, Raimundas Mockeliūnas¹

¹Lietuvos veterinarijos akademija, Užkrečiamųjų ligų katedra, Tilžės g. 18, LT - 47181 Kaunas; tel. (8~37) 36 35 59; faks. (8~37) 36 24 17; el. paštas: petkevicius@lva.lt

²Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Virusologijos skyrius, Instituto g. 2, LT- 56115, Kaišiadorys; tel. 8~615 15 233; el. paštas: salomska@lva.lt

Santrauka. Arklių *herpes* susirgimas pirmą kartą pastebėtas JAV, o virusą pirmieji išskyrė amerikiečiai praėjusio amžiaus ketvirtajame dešimtmetyje. Didžiausią ekonominę reikšmę turi 1 ir 4 serotipo arklių *herpes* virusai (EHV-1 ir EHV-4). Lietuvoje pirmieji tyrimai pradėti 2003 metais. Iki šiol šių virusų atžvilgiu ištirta 140 arklių iš 9 žirgynų, jokių klubų ir žemės ūkio bendrovių, esančių skirtinguose šalies regionuose. Antikūnai prieš EHV-1 ir EHV-4 buvo nustatyti visuose žirgynuose, o serotegiamų individų buvo nuo 33,3 iki 100 proc. EHV-1 ir EHV-4 infekotumas buvo patvirtintas virusų izoliavimu ląstelių kultūroje ir tiesiogine imunofluorescencija. Visa tai rodo, kad Lietuvos arklių populiacijoje abiejų serotipų *herpes* virusai yra paplitę ir gali būti abortų, kvėpavimo takų ligų ir encefalitų priežastis.

Raktažodžiai: arklių *herpes* virusai, paplitimas.

SEROPREVALENCE OF EQUID HERPESVIRUS IN THE LITHUANIAN HORSE FARMS

Vida Liutkevičienė¹, Violeta Mockeliūnienė², Algirdas Šalomska^{1,2}, Marija Stankevičienė¹, Saulius Petkevičius^{1,2}, Raimundas Mockeliūnas¹

¹Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės st. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania; Phone +370 37 36 35 59; faks. +370 37 36 24 17; e-mail: petkevicius@lva.lt

²Department of Virology, Veterinary Institute of Veterinary Academy, Instituto st. 2, LT-56115, Kaišiadorys; Phone: +370 8~615 15 233; e-mail: salomska@lva.lt

Summary. Equid herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1/4) infection is a highly contagious viral disease registered worldwide. EHV-1 can cause abortion, respiratory disease and paralysis. EHV-4 can also cause abortion but usually causes only respiratory disease. Infected foals can pass the infection to healthy mares via inhalation of the virus contaminated respiratory secretions. Once a pregnant mare is infected she may abort from 4 months onwards, but it is usually between the 8th and 11th months. Abortion may take place several months after infection or as little as 2 weeks later.

One hundred forty horses from 9 horse farms, rider clubs and agricultural companies from different Lithuania regions were investigated for EHV-1 and EHV-4. It was estimated that in different horse farms from 33.3% to 100% of horses were seropositive to EHV-1 or EHV-4. These results were approved by isolation of virus in cell cultures and direct fluorescent antibody test. The results from this study indicate that EHV has a high prevalence in Lithuania horse population, which can cause abortions, respiratory diseases and encephalitis.

Key words: Equid herpesvirus, seroprevalence.

Įvadas. Arklių *herpes* virusai yra išplitę daugelyje pasaulio šalių ir padaro didelių ekonominių nuostolių, nes daug kumelių abortuoja, sutrinka bandos reprodukcija, nemažai lėšų išleidžiama susirgimui likviduoti. Liga pirmą kartą pastebėta JAV, o pirmieji virusą išskyrė W. W. Dimock ir P. R. Edwards praėjusio amžiaus ketvirtajame dešimtmetyje (Thein, 2000). Virusai priklauso DNR virusų grupei, *Herpesviridae* šeimai. Virusų DNR – dvigrandė, nukleokapsidė – kubinės simetrijos, viriono dydis – 120–300 nm, kai kurie virusai turi superkapsidę. Optimalus viruso terpės išgyvenimo pH – 6–6,7. Jis greitai inaktyvuojamas, kai pH daugiau kaip 4 ir mažiau nei 10. Kultūriniame skystyje 56°C temperatūroje virulentiškumą išlaiko 10 min., 4°C temperatūroje – 7–8 mėn., o 10–18°C temperatūroje iki 12–14 mėnesių. Virusai jautrūs eteriui ir chloroformui (Bryans, Prickett, 1970; Singh et al., 2001). Jų antigeninė struktūra išstudijuota nepakankamai, yra išskirtas S (tirpstantis) ir V (virusinis) antigenai. Virusų replikacija vyksta ląstelės branduolyje, kur susiformuoja

ezoinofiliniai intarpai. Elektroforezės būdu identifikuota 20 polipeptidų, kurių molekulinė masė – 115–13000 D mol. Superkapsidės neturinčiuose virionuose nustatyta 14 polipeptidų, o pačiuose apvalkalėliuose – 3 polipeptidai. Virusams būdingas citopatogeninis efektas (CPE) (Lawrence et al., 1994; Mizukoshi et al., 2002; Tearle et al., 2003). Pagrindiniai šios šeimos atstovai yra EHV-1 ir EHV-4 (Borchers, Slater, 1993; Kirasawa et al., 1993; Maanen, 2002). Virusai arkliams sukelia skirtingų simptomų kompleksą, rinopneumoniją (EHV-4, rečiau EHV-1). EHV-1 infekcijai dažniausiai sukelia abortą ir neurologinius reiškinius (Sutton et al., 1998).

Be paminėtų arklių *herpes* virusų, gamtoje egzistuoja universaliojoje virusų klasifikacijoje jokioms gentims nepriskirti *Alphaherpesvirinae* EHV-3, EHV-6, EHV-8 ir *Betaherpesvirinae* pošeimių EHV-2, EHV-5, EHV-7 patogenai (Thein, 2000).

Mieloencefalopatijos atveju pastebima ataksija, užpakalinių galūnių ir sfinkterių parėzė, pūslės paralyžius,

susilpnėjęs uodegos tonusas. Tipišku mieloencefalopatijos atveju arkliai nekarščiuoja, nepažeidžiami kvėpavimo organai, o virusai nustatomi CNS ląstelėse (Dutta et al., 1983.; Huleihel et al., 2002).

EHV-1, EHV-4 virusai patogeniški įvairaus amžiaus arkliams. Eksperimentiškai galima užkrėsti jūrų kiaulytes ir žiurkėnus, kurie dažniausiai nugaišta. Sergantys ir persirgę arkliai virusus platina su išskyromis iš nosies, plaučių ir lyties organų. Kvėpavimo organai dažniausiai pažeidžiami pavasarį ir žiemą, o lyties takų – įvairiu metu laiku (Foote et al., 2003; Gilkerson et al., 2000; Smith et al., 2003). Į organizmą virusas dažniausiai patenka per kvėpavimo takus, dauginasi kvėpavimo organų ląstelėse, pereina į leukocitus, o su jais – į placentą. Čia virusų toksinai, audinių irimo produktai ir transudatas mechaniškai atskiria vaisiaus dangalus, ir kumelės abortuoja 7–11 kumelimumo mėnesį (Carvalho et al., 2000; Mair, 1996; Schroer et al., 2000). EHV-1 virusas yra didžiausia kumelių išsimitimo priežastis. Jei kumelei kartais pavyksta atsivesti kumeliuką, jis būna silpnas. EHV-1 virusas gali sukelti ir tokias patologijas kaip paralyžių ar kvėpavimo takų ligas. Kumeliukams EHV-1/EHV-4 sukelta infekcija praeina kaip ūmus, kontaginis, karščiavimu pasireiškiantis viršutinių kvėpavimo takų susirgimas, kurio baigtis 90–100 proc. letalinė. Kaip profilaktinė priemonė taikoma kumelių vakcinacija gyvomis arba inaktyvuotomis vakcinomis (Wilson, 1999; Breathnach et al., 2001; Foote et al., 2003; Patel et al., 2003; Schroer et al., 2000).

Nors arklių *herpes* virusų infekcija registruojama daugelyje pasaulio šalių tiek naminių arklių, tiek ir laukinių vienakanopių populiacijose (Borchers, Frolich, 1997; Moreira et al., 2000; Schroer et al., 2000; Szeredi et al., 2003), Lietuvoje arklių *herpes* virusų paplitimo tyrimai iki šiol nėra atlikti ir publikacijų šiuo klausimu nėra.

Darbo tikslas – atlikti diagnostinius EHV-1 ir EHV-4 tyrimus ir įvertinti *herpes* virusų išplitimą Lietuvos arklių populiacijoje.

Medžiagos ir metodai. Tyrimams atlikti kraujas iš arklių buvo imtas devyniose arklių bandose (žirgynai, žemės ūkio bendrovė, jojimo klubai). Specifiniai antikūnai nustatyti imunofluorescencijos analizės (IFA) metodu ir viruso neutralizacijos reakcija (VN), virusai išskirti klasiškiniu virusologijos metodu.

Kraujas serologiniams tyrimams steriliai imtas iš *vena*

jugularis į 10 ml vakuuinius mėgintuvėlius be antikoagulianto. Serumui atskirti mėginiai 15 min. centrifuguoti 1500 aps./min. Kraujo serumo mėginiai buvo sunumeruoti ir iki tyrimo laikomi minus 20°C temperatūroje. Arklių *herpes* virusų tyrimui IFA metodu buvo naudotas komercinis diagnostinis rinkinys, pagamintas ir standartizuotas Švedijoje (*SVANOVIR*).

Arklių *herpes* virusų atžvilgiu ištirta 140 atsitiktiniai parinktų arklių. EHV-1 infekcijos paplitimas įvairaus amžiaus arklių grupėse priklausomai nuo lyties tirta retrospektyviuoju metodu, analizuojant tyrimų rezultatus iš keturių žirgynų ir suskirstant 114 arklių į grupes. Palyginamasis EHV-1 ir EHV-4 infekcijų serologinis paplitimas tirtas penkiose (26 arkliai) bandose.

Virusų nustatymas. Virusų išskyrimui buvo surinkti 7 abortavusių kumelių vaisiaus vidaus organai, iš kurių paruošta 10% suspensija 199 terpėje.

Herpes virusams išskirti naudotos arklių dermos ląstelė (ED 39.P.7.6.), augintos plastikiniuose 50 ml kultūriniuose indeliuose MEM terpėje su 5 proc. fetaliniu veršelių serumu (FEVS, Biochemijos institutas, Lietuva) 37°C temperatūroje. Užaugus ląstelių monosluoksniui, į visus indelius buvo pilama po 0,5 ml paruoštos 10 proc. suspensijos, 37°C temperatūroje inkubuota 1 val. kas 10 min. atsargiai horizontaliai pajudinant. Po kontakto, nupilant užkrato, įpilta 5 ml MEM terpės su 5 proc. FEVS ir laikyta termostate stebint kiekvieną dieną. Vienas kontrolinis indelis buvo inkubuojamas be užkrato. Kontrolei naudoti etaloniniai *herpes* virusai EHV-1 ir EHV-4. Cito-patogeniniam efektui (CPE) nustatyti ląstelės dažytos akridino oranžu, o *herpes* virusų antigenai nustatyti atlikta tiesioginės imunofluorescencijos reakcija su „Gamakon“ diagnostikumu (Mevak, Slovakija) pagal gamintojo instrukciją.

Tyrimų rezultatai. Tiriant arklių *herpes* virusų išplitimą buvo rinkti arklių kraujo serumo mėginiai iš 9 bandų skirtinguose šalies regionuose. Nustatyti specifiniai antikūnai ir atliktas serologinių tyrimų metodų IFA ir VN palyginamasis įvertinimas.

Arklių 1 tipo *herpes* infekcijos atžvilgiu keturiuose žirgynuose buvo ištirta 114 arklių. Gauti tyrimų duomenys pateikti lentelėje.

1 lentelė. Arklių 1 tipo *herpes* virusų paplitimo serologinių tyrimų rezultatai

Žirgynas	Tirtų gyvulių skaičius	Teigiamų skaičius	
		vnt.	proc.
A	90	81	90,0
B	6	2	33,3
C	8	6	75,0
D	10	10	100,0
Iš viso:	114	99	86,8

Vertinant lentelėje pateiktus duomenis galima konstatuoti, kad visuose tirtuose žirgynuose buvo nustatyti EHV-1 viruso antikūnai, nors išplitimo laipsnis juose ir skyrėsi. Mažiausia dalis (33,3proc.) seroteigiamų arklių tiriamu laikotarpiu nustatyta B žirgynė. Tuo metu A ir D

žirgynuose beveik visi arkliai buvo užsikrėtę EHV-1 virusu.

Tiriant standartine neutralizacijos reakcija nustatytas ir nevienodas specifinių antikūnų tirtų prieš EHV-1 virusą pasiskirstymas. Vertinant atskirų žirgynų duomenis, išsi-

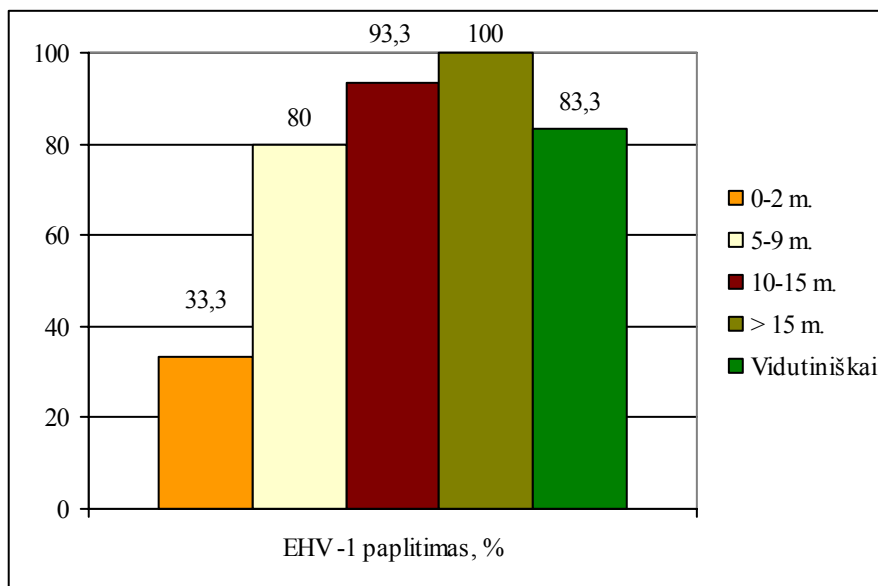
skiria B žirgynas, kuriame visų arklių antikūnų titrai buvo 1:20, ir C žirgynas, kuriame gyvulių antikūnų titrai buvo nuo 1:20 iki 1:160. Tuo metu A ir D žirgynų žirgų kraujo serumo antikūnų titrai buvo nuo 1:5 iki 1:160.

Tyrimų duomenys rodo, kad Lietuvos žirgynuose aktyviai cirkuliuoja EHV-1 virusai. Vertinant epizootinę situaciją svarbu nustatyti pagrindinius veiksnius, darančius įtaką ligos sukėlėjo paplitimui.

Vertinant tyrimo duomenis kumelių grupėje nustatyta 90,1 proc. seroteigiamų gyvulių –16,2 proc. daugiau nei eržilų grupėje. Tuo tarpu vertinant specifinių antikūnų

prieš EHV-1 virusus titrų pasiskirstymą nustatyta, kad kumelių kraujo serumo mėginiuose specifinių antikūnų titrai buvo žemesni (nuo 1:5 iki 1:40) nei eržilų grupėje, kur daugumos gyvulių antikūnų titrai buvo nuo 1:10 iki 1:80.

Gyvulio amžius yra svarbus rodiklis, nes veikiama aplinkos keičiasi gyvulio fiziologinė ir imuninė būklė, kinta organizmo medžiagų apykaita. Tiriant arklių amžiaus įtaką EHV-1 virusų nešiotų skaičiui buvo ištirta 114 arklių. Tyrimų duomenys pateikti 1 pav.



1 pav. EHV-1 virusų nešiotų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes

Analizuojant 3 lentelėje pateiktus tyrimų duomenis matyti, kad mažiausia seroteigiamų gyvulių dalis (33,3 proc.) nustatyta jaunų – iki dvejų metų arklių grupėje. Kitose gyvulių grupėse tyrimų rezultatai rodo, kad užsikrėtusių gyvulių yra daug daugiau, siekia net 80–100 proc. Taigi ryškėja bendra tendencija: su gyvulio amžiumi

daugėja ir EHV-1 virusų nešiotų.

Vertinant specifinių antikūnų pasiskirstymą pagal gyvulio amžių nustatyta, kad visose amžiaus grupėse antikūnų titrai yra nuo 1:10 iki 1:80. Analizuojant EHV-1 ar EHV-4 virusų išplitimą bandose nustatyta, kad trijose iš penkių bandų rasti abiejų tipų virusai (2 lentelė).

2 lentelė. EHV-1 ir EHV-4 palyginamasis paplitimo tyrimas IFA metodu

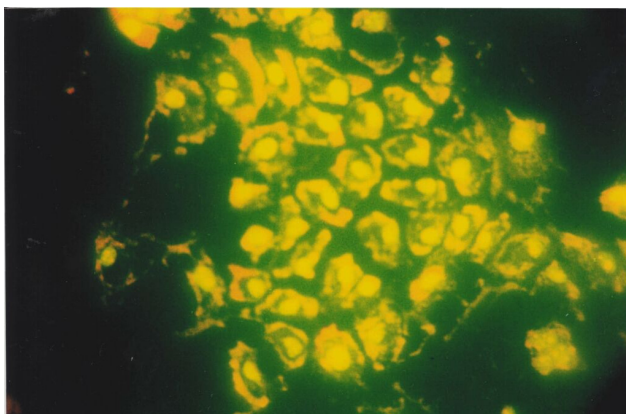
Arklių bandos	EHV-1		EHV-4	
	Tirtų arklių skaičius, vnt.	Teigiamų skaičius	Tirtų arklių skaičius, vnt.	Teigiamų skaičius
I	3	2	3	3
II	9	1	9	9
III	5	0	5	5
IV	5	0	5	5
V	4	4	4	4
Iš viso:	26	7	26	26

Seroteigiamų gyvulių pasiskirstymo EHV-1 ir EHV-4 virusų atžvilgiu analizė parodė, kad 38,5 proc. arklių rasta EHV-4 monoinfekcija. Gyvulio kontaktas su abiejų tipų virusais nustatytas 26,9 proc. tirtų arklių. Serologiniais metodais (IFA, VN) tirtose arklių bandose specifinių antikūnų prieš EHV-1 ir EHV-4 virusus nustatymas rodo, kad

jose cirkuliuoja arklių herpes virusai. Šiuose ūkuose ištirti septynių abortavusių kumelių vaisiaus vidaus organai.

Mikroskopuojant akridino oranžu dažytus septynis preparatus, šeši patologinės medžiagos mėginiai ląstelių augimo neslopino ir citopatogeninio efekto (CPE) nesukėlė. Ląstelių kultūroje, užkrėstoje abortavusios kumelės

vaisiaus plaučių suspensija, trečiąkart persėjus po 18 val. pasireiškė CPE. Ląstelių forma buvo pakitusi nedideliuose monosluoksniu ploteliuose. Po 48 val. pakito beveik visų ląstelių forma: citoplazmoje buvo matyti vakuolės, o apvaskalėlio kraštai buvo nelygūs. Po 72 val. užkrėstos ląstelės pradėjo slinkti nuo paviršiaus ir preparatuose buvo matomi dideli tušti tarpai. Lyginant su etaloninių virusų kamienų CPE ir ląstelių citoplazmos pakitimais atitiko EHV-1 etaloną. Atlikus tiesioginę imunofluorescencijos reakciją su fluoresceino izotiocianatu konjuguotais antikūnais prieš EHV-1, susidarė kompleksas antigenas-antikūnas, kuris, mikroskopuojant liuminescenciniu mikroskopu švytėjo geltona spalva (2 pav.). Vadinasi, kad užkrėstose ląstelėse lokalizavosi *herpes* virusų antigenas.



2 pav. Gelsvai švytintis EHV-1 antigeno-antikūnų kompleksas ląstelių citoplazmoje. Liuminescencinė mikroskopija

Tyrimų rezultatų aptarimas. Arklių *herpes* virusų atžvilgiu Lietuvoje ištirta 140 arklių iš 9 žirgynų, jojimo klubų ir žemės ūkio bendrovių skirtinguose šalies regionuose. Nustatyta, kad arklių bandose nuo 33,3 iki 100 proc. gyvulių turėjo kontaktą su EHV-1 ir/ar EHV-4 virusais. EHV-1 virusai paplitę ir kitose šalyse. Pavyzdžiui, Vokietijoje net 81,5 proc. arklių turėjo antikūnų prieš arklių 1 ir 4 tipo *herpes* virusus (Herbst et al., 1992). Tyrimais taip pat nustatyta, kad vyravo palyginti neaukšti antikūnų titrai, kumelės buvo dažniau infekuotos nei eržilai. Analogiškus dėsningumus pastebėjo ir kiti tyrėjai (Moreira et al., 2000).

Mūsų atliktais tyrimais nustatytas *herpes* virusams būdingas ląstelėms sukeltas CPE ir nustatytas EHV-1 antigenas viename iš septynių tirtų mėginių (14,3 proc.). Vadinasi, Lietuvos arklių populiacijoje abiejų serotipų *herpes* virusai yra paplitę ir gali būti abortų, kvėpavimo takų ligų ir encefalitų priežastis. Panaši padėtis yra ir Vengrijoje, kur 14,9 proc. kumelių abortų priežastis buvo EHV-1 (Szeredi et al., 2003). Nors Lenkijoje paplitę įvairių serotipų arklių *herpes* virusai, čia pagrindine kumelių abortų priežastimi taip pat pripažintas EHV-1 (Rola and Zmudzinski, 2001).

Atlikta nemažai serologinių ir virusologinių tyrimų, bet detalesnei išskirto viruso identifikacijai ir tipizacijai vertėtų atlikti neutralizacijos reakciją su EHV-1 referentiniu imuniniu serumu ir polimerazinę grandininę reakciją,

dažnai taikomą kumelių herpesvirusinės kilmės abortams patvirtinti (Carvalho et al., 2001; Varrasso et al., 2001). Norint detalai išaiškinti arklių *herpes* virusų paplitimą Lietuvos Respublikos arklių populiacijoje, reikalingi kompleksiniai tyrimai, kurių pagrindu būtų galima paruošti šios ligos likvidavimo ir kontrolės programą, sudarančią galimybę žirgynams pasiekti sveikos bandos statusą ir žirgynų savininkams gauti sveiką ir tinkamą parduoti prieauglį.

Išvados.

1. Lietuvos arklių populiacijoje išplitę *herpes* virusai. Nustatyta, kad arklių bandose nuo 33,3 iki 100 proc. gyvulių turėjo kontaktą su *herpes* EHV-1 ir/ar EHV-4 virusais.
2. Ląstelių kultūrose nustatytas *herpes* virusams būdingas CPE, o tiesioginės imunofluorescencijos metodu identifikuotas EHV-1 antigenas.

Literatūra

1. Borchers K., Frolich K. Antibodies against equine herpesviruses in free ranging mountain zebras from Namibia. *Journal of Wildlife diseases*, 33(4), 1997. pp. 512–517.
2. Borchers K., Slater J. 1993. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *Journal of Virological Methods*. 45: 331–336.
3. Breathnach C. C., Yeagan M. R., Sheoran A. S., Allen G. P. 2001. The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with Equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Veterinary Journal*. 33 (7): 651–657.
4. Bryans J. T., Prickett M. E. A. A consideration of the pathogenesis of abortigenic disease by equine herpesvirus. *Infection Diseases*. II. 1970. P. 34–40.
5. Carvalho R., Passos L. M. F., Gouvea A. M. G., Resende M., Martins A. S., Franco, G. C. 2000. Use of an ELISA system for detection of equine herpesvirus 1 (EHV-1) antibodies in non-symptomatic pregnant mares and neonatal foals. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 52 (3): 200–207.
6. Dutta S. K., Talbot N. C., Myrup A. C. 1983. Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*. 44: 1930–1934.
7. Edington N., Welch H. M. And Griffiths L. (1994). The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine vet. Journal*. 26:140–142.
8. Foote C. E., Gilkerson J. R., Whalley J. M., Love D. N. 2003. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in mares and foals on a large Hunter Valley stud farm in years pre- and postvaccination. *Australian Veterinary Journal*. 81 (5): 283–288.
9. Gilkerson J. R., Love D. N., Whalley J. M. (2000). Incidence of equine herpesvirus 1 infection in Thoroughbred weanlings on two stud farms. *Australian Veterinary Journal*. 78 (4): 277–278.
10. Herbst W., Gorlich P., Danner K. Virologico-serologic studies in horses with respiratory tract diseases. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1992 Feb 1;105(2):49–52.
11. Huleihel M., Salman A., Talyshinsky M., Erukhimovitch V. 2002. Evaluation of antiviral activity of propolis extract against herpes viruses by standard and spectroscopic assays. *Antiviral Research*. 53: 54–54.
12. Kirasawa R., Endo A., Iwai H., Kawakami Y. 1993. Detection and identification of equine herpesvirus -1 and -4 by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. 36: 57–67.
13. Lawrence G. L., Gilkerson J., Love D. N., Sabine M., Whalley

- J. M. 1994. Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus -1 and -4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *Journal of Virological Methods*. 47: 59–72.
14. Maanen C. 2002. Equine herpesvirus -1 and -4 infections: an update. *Veterinary Quarterly*. 24 (2): 55–78.
 15. Mair T. S. 1996. Update on infectious respiratory diseases of the horse. *Equine Veterinary Education*. 8 (6): 329–335.
 16. Mizukoshi F., Maeda K., Hamano M., Iwata H., Matsumura T., Kondo T., Sugiur T. (2002). IgG antibody subclass response against equine herpesvirus type 4 in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 88 (1–2): 97–101.
 17. Moreira N., Weiss R. R., Krüger E. R. Frequency of neutralizing antibodies against equine herpesvirus type 1. *Scientia Agraria*, v.1, n. 1–2, p. 9–14, 2000.
 18. Patel J. R., Bateman H., Williams J., Didlick S. 2003. Derivation and characterization of a live equid herpes virus-1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1. *Veterinary Microbiology*. 91 (1): 23–39.
 19. Rola J. and Zmudzinski J. F. Genomic diversity among equine herpesvirus 1 strains isolated in Poland. *Cell. Biol. Mol. Let.* 2001, vol. 6. No. 3a, p. 812.
 20. Schroer U., Lange A., Glatzel P., Ludwig H., Borchers K. 2000. The relevance of equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in a German thoroughbred stud: vaccination, abortion and diagnostics. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 113 (2): 53–59.
 21. Singh B. K., Yadav M. P., Tewari S. C. (2001). Neutralizing and complement-fixing monoclonal antibodies as an aid to the diagnosis of equine herpesvirus-1 infection. *Veterinary Research Communications*. 25 (8): 675–686.
 22. Smith K. C., Blunden A. S., Whitwell K. E., Dunn K. A., Wales A. D. (2003). A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Veterinary Journal*. 35 (5): 496–501.
 23. Sutton G. A., Viel L., Carman P. S. Boag B. L. Pathogenesis and clinical signs of equine herpesvirus-1 in experimentally infected ponies in vivo. *Can J Vet Res*. 1998 January; 62(1): 49–55.
 24. Szeredi L., Pálfi V., Molnár T. 2003. Comparison of methods for the diagnosis of equine herpesvirus type 1 infection. *Acta Veterinaria Hungarica*. 51 (2): 153–163.
 25. Tearle J. P., Smith K. C., Platt A. J., Hannant D., Davis-Poynter N. J., Mumford J. A. 2003. In vitro characterization of high and low virulence isolates of equine herpesvirus -1 and -4. *Research in Veterinary Science*. 75 (1): 83–86.
 26. Thein P. 2000. Herpesvirus infections in horses. *Pferdeheilkunde*. 16 (1): 5–21.
 27. Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C. A., Studdert M. J., Drummer H. E. Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust Vet J*. 2001 Vol. 79(8) p. 563–569.
 28. Wilson W. D. Vaccination Programs for Foals and Weanlings. *AAEP Proceedings*. 1999. Vol. 45 9, p. 254–263.