

< Short Communication >

Real-time PCR에 의한 equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy의 진단

최성균¹ · 김주형² · 조길재^{2*}

대구경북과학기술연구원¹, 경북대학교 수의과대학², 경북대학교 말의학연구소²

A diagnosis of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy using real-time PCR

Seong-Kyoon Choi¹, Joo-Hyung Kim², Gil-Jae Cho^{2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Cellular Engineering, Division of NanoBio Technology, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology, Daegu 711-873, Korea

²College of Veterinary Medicine and Institute of Equine Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 7 February 2014; revised 26 February 2014; accepted 12 March 2014)

Abstract

Equine herpesvirus myeloencephalopathy, out of symptoms by equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection, can cause devastating losses on individual farms. Although myeloencephalopathy syndromes of horses in Korea have been recognized for a couple of years in horse populations, there is little study regarding the occurrence of EHV-1 infections. The present study was performed to detect the viral infection of horses with neurological syndrome using real-time PCR. Fifteen horses (27.3%) out of 55 horses with neurological deficiency were positive for EHV-1 viral antigen. Among these 7 horses, 4 horses were detected genotype of A2254/N752 and 3 horses G2254/D752 strain, respectively.

Key words : Equine herpesvirus 1, Myeloencephalopathy, Real-time PCR

서 론

Equine herpesvirus는 *Herpesviridae* 과, *Alphaherpesvirinae* 아과, 그리고 *Varicellovirus* 속에 속한 DNA 바이러스로 아주 흔한 말의 바이러스 병원체이다. 이것은 호흡기 증상(비폐렴), 유산, 그리고 신경증상(마비)을 유발한다. Equine herpesvirus 1 (EHV-1)에 의한 신경병적 증후군의 증상은 운동실조, 양측 하지 마비 그리고 요실금에서부터 완전한 마비와 죽음에까지 다양한 범위로 발생한다(Bagust 등, 1972; Borchers 등, 2006; Matumoto 등, 1965; Stater 등, 2006; van Maanen, 2002; Wilson, 1997). 또한 말 뇌척수염은 말

산업에 상당한 경제적 손실을 일으키며 호흡기 질환, 유산, 조기사망, 그리고 골수뇌질환이 일어나는 증후군을 발생시킨다(Lunn 등, 2009). 이 증후군의 증상 중에서 신경병(equine herpesvirus성 골수뇌질환 또는 equine herpesvirus myeloencephalopathy; EHM)은 말에게 고통을 주고 수명을 단축시킬 뿐 아니라 운동의 제한, 출산, 훈련 스케줄에 영향을 미치며 훈련소, 경마장, 승마장의 말 관리를 어렵게 한다(Goodman 등, 2007; Lunn 등, 2009).

최근 들어 정부의 말산업육성법 시행과 FTA 이후 축산업의 대체산업으로 말산업에 대해 정부 및 지자체의 관심이 집중되고 있는 실정이다. 국내 말 산업은 생산(1차 산업)에서부터 말과 관련된 상품의 공급, 관광, 레저(3차 산업)까지 연계된 친환경적인 복합 산

*Corresponding author: Gil-Jae Cho, Tel. +82-53-950-5978, Fax. +82-53-950-5955, E-mail. chogj@knu.ac.kr

업으로 과거와 달리 경제적 가치변화로 새로운 용도의 길을 모색하는 시점에 도달하고 있으며, 국민소득의 증가에 따른 레저 인구의 증가로 건강 스포츠인 승마의 확산과 개인마주제에 의한 경주마 보유 가정의 증가에 의해 말이 우리 생활에 친근한 반려가축으로 자리매김과 레저동물로서 축산인의 소득증대에 기여하는 등 그 가치가 매우 높다고 할 수 있다.

또한 도시민의 다양한 레저 수요를 충족시키고 농촌관광 및 도농간의 교류의 장으로 활용 가능하다는 측면에서 농촌의 지역경제 활성화에 대한 잠재력이 매우 클 것으로 기대되고 있다.

농림축산식품부 기타가축통계 자료 등에 의하면 국내에서 사육중인 말은 약 3만여 마리로 알려지고 있고 점차 그 사육두수가 증가되고 있다(최 등, 2011). 또한 각종 국내외 승마대회 혹은 승마 트레킹 등으로 인해 말의 이동이 빈번해짐에 따라 말의 전염성 질병의 발생이 우려되고 있어 이에 대한 체계적이고 효과적인 예방 대책의 수립이 요구되고 있다.

최근 들어 국내에서 사육중인 말에서 매년 원인불명의 후구마비성 신경증상을 보이는 말들이 약 100여 마리 정도 발생되는 것으로 추정하고 있다. 이러한 형태의 질병은 국내뿐 아니라 전 세계적으로 말 관련 산업 및 경제에 치명적 악영향을 미치는 것으로 알려지고 있다.

국내의 경우 2008년 이후 매년 발생되고 있어 국내 승마장 운영자 및 말 사육가 사이에서 정신적 혹은 경제적 피해 등 많은 어려움을 호소하고 있다. 그래서 국내 말산업 발전에 가장 기본이 되는 말의 체계적인 보건관리를 통해 말 사육가 혹은 승마장 운영자의 경제적 손실을 최소화하고 생산성 향상을 이루도록 노력해야 한다.

이러한 배경 하에서 본 연구는 FTA 이후 예상되는 대체산업으로서 국내 말산업의 안정적인 기반 구축과 말 사육가의 생산성 향상에 도움을 주고자 현재 국내에서 문제시되고 있는 후구마비성 신경증상을 동반한 질병의 병인학적 진단을 통해 체계적이고 효과적인 예방 대책을 제시함으로써 말 사육가 혹은 승

마장 운영자의 고소득 창출과 국내 말산업의 발전에 기여하고자 일련의 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시 재료

2012년 8월에서부터 2013년 11월 사이 국내에서 사육중인 말 중에서 후구마비성 신경증상(운동실조, 요실금, 전도 등)이 의심되거나 발현하는 말 55마리(전남 승마장 1곳에서 3마리, 울산 승마장 1곳에서 1마리, 경남 승마장 7곳에서 28마리, 경북 승마장 9곳에서 23마리, 충북 승마장 1곳에서 1마리)를 대상으로 하였다. 승마장별 사육두수는 2마리에서 30마리 사이였으며, 55마리 중에서 후구마비성 신경증상을 발현하는 말은 37마리였다. 시료채취는 말의 경정맥으로부터 헤파린 및 플레인 튜브(BD vacutainer, USA)를 이용하여 채취하였다. 혈액분석은 Hematology Analyzer (HEMAVET[®] 950, DREW Scientific Inc. USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 항응고제로 처리된 전혈 1 mL를 E-tube에 옮겨 로딩한 후 결과를 분석하였다.

바이러스 감염 진단

혈액으로부터 genomic DNA의 추출은 혈액에서 백혈구가 풍부한 부분인 buffy coat 층을 분리하기 위해 leucosep 튜브를 이용하였다. 먼저 전혈 3 mL를 leucosep 튜브에 옮긴 다음, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 buffy coat를 포함하는 중간부분의 용액(시료)으로 genomic DNA를 분리하였다. Genomic DNA의 분리는 TOYOBO (일본)사의 MagExtractor를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행한 후 실험에 사용하였다.

일반적으로 사용하는 PCR기법보다 더욱 민감도와 특이성이 좋은 real time-PCR (RT-PCR)기법을 이번

Table 1. Primer sequences used for real-time PCR analysis

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	GenBank accession No.
ORF30-F	AAC CTA TAG CCC CTG GAA AAT TG	NC-001491.2
ORF30-R	ACG ATA GGA CGC GAC ATG CT	
GAPDH-F	AGC AAT AGG GTG GTG GAC CTT	NC-009149.2
GAPDH-R	GCT GAG GGC CTT TCT CCT TCT	

연구에 적용하였다. 연구에 사용한 primer의 염기서열은 Table 1에서 보는 바와 같다. 먼저 GeneBank AP012321.1에서 찾은 Equine herpesvirus 1 DNA에서 ORF30의 크기를 확인한 후 Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용하여 primer를 디자인하였다. 또한 RT-PCR의 internal standard로서 GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Equus caballus)를 사용하였다. RT-PCR은 ABI SYBR Green PCR master mix kit으로 ABI 7500 RT-PCR을 이용하여 수행하였으며, 조건은 먼저 50°C에서 2분간 가열하여 변성을 유도하고, 95°C에서 10분간 denaturation 한 후 95°C에서 15초 그리고 60°C에서 1분 등 총 40회 반복하였다.

DNA 염기서열 분석

EHV-1 specific DNA polymerase gene (ORF30)을 타겟으로 하는 증폭된 PCR 생산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였다. 50 ng/μL 보다 많은 정제된 생산물은 ABI 3730 DNA Analyzer에 BigDye Terminator v3.1 Cyclic Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 5 μM PCR primer (ORF30-F)에 대해 염기서열을 분석하였다.

결 과

혈액 분석

뇌척수증 질병이 의심되거나 유발한 말의 경정맥으로부터 채취한 시료의 혈액 분석 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 호중구는 0.44 K/μL로 정상 범위인 2.3~9.6 K/μL(평균 6.0 K/μL)보다 낮은 수치였으며, 림프구는 26.11 K/μL로 정상 범위인 1.5~7.1 K/μL

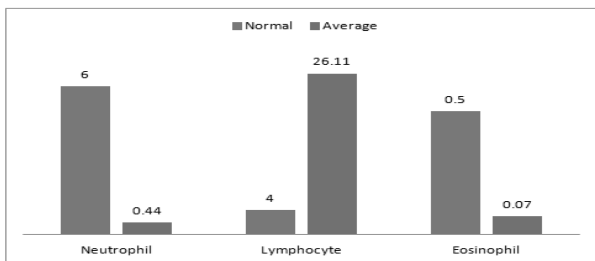


Fig. 1. Analysis of hematology in horse.

(평균 4.0 K/μL)보다 월등하게 높은 수치를 보였고, 호산구는 0.07 K/μL로 정상 범위인 0.0~1.0 K/μL (평균 0.5 K/μL)보다 낮은 수치를 나타내었다.

EHV-1에 대한 감염 진단

국내에서 사육중인 말에서 후구마비성 신경증상을 발현하게 된 승마장 혹은 사육장의 말로부터 EHV-1의 감염상황을 RT-PCR로 분석한 결과는 Table 2와 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 후구마비성 신경증상을 나타낸 말 37마리를 포함하여 검사대상 두수 55마리 중에서 15 (27.3%)마리가 EHV-1 양성으로 진단되었다. 특히 경남의 F승마장의 경우 13마리로부터 시료를 채취하여 분석한 결과 8마리에서 EHV-1 양성을 나타내었으나 실제 임상증상을 발현한 말은 2마리였다. 지역별로는 5곳 중에서 경남과 경북에서만 EHV-1에 대해 양성으로 확인되었다.

EHV-1에 대한 양성으로 진단된 15마리 중에서 EHV-1 specific DNA polymerase gene (ORF30)을 타겟으로 하는 증폭된 PCR 생산물을 가지고 염기서열을 분석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 7마리 (A2254 strain 4마리, G2254 strain 3마리)에서 확인되었다.

Table 2. Results of EHV-1 positive horse by using RT-PCR

Province	Farm	No. of collected sample	No. of sign occurrence	No. of EHV-1 positive
Jeonnam(1)	A	3	3	0
Ulsan(1)	B	1	1	0
Gyungnam(7)	C	9	6	4
	D	2	2	1
	E	1	1	0
	F	13	2	8
	G	1	1	0
	H	1	1	0
	I	1	1	0
Gyungbuk(9)	J	6	6	2
	K	6	2	0
	L	2	2	0
	M	1	1	0
	N	2	2	0
	O	1	1	0
	P	1	1	0
	Q	2	2	0
	R	1	1	0
Chungbuk(1)	S	1	1	0
Total		55	37	15

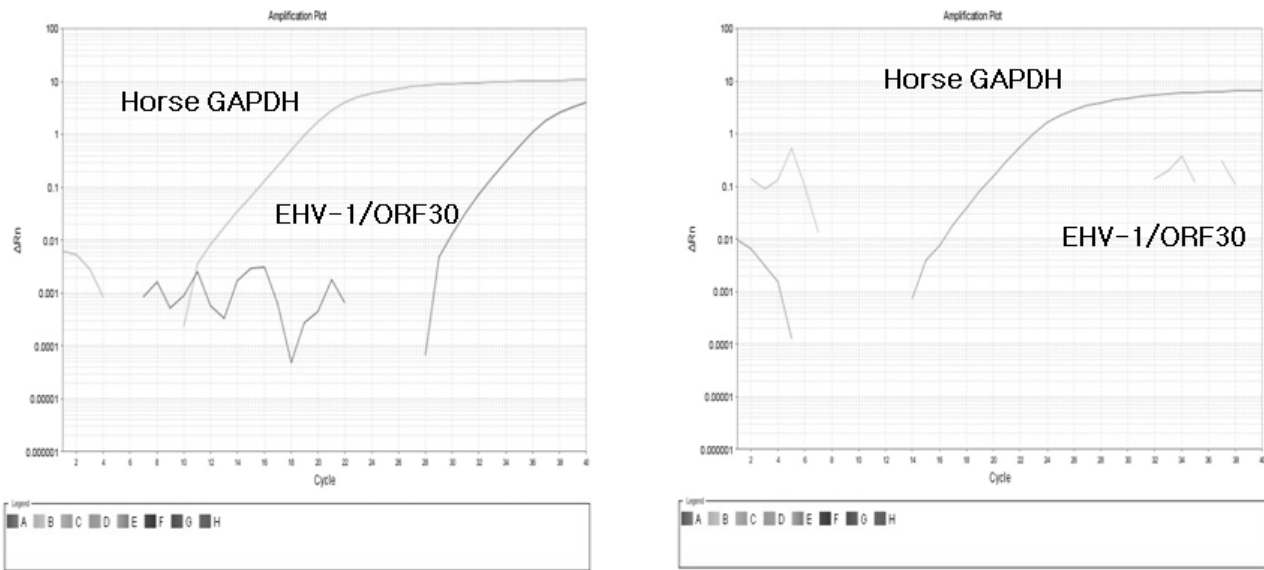


Fig. 2. Real-time PCR detection of EHV-1 specific DNA polymerase (ORF30) gene. Positive sample (left) and negative sample (right).

Table 3. Prevalence of EHV-1 strains categorized by the ORF30 genotype

	Genotype of EHV-1		Total
	A2254 strain	G2254 strain	
First EHM horse	JRC-1	1	6
	KNRC-1	1	
	KNRC-2	1	
	MRC-1	1	
	KBRC-1	1	
	GORC	1	
Neighboring horse	JRC-2	0	1
Total (%)	4 (57.0)	3 (43.0)	7 (100.0)

고 찰

최근 들어 국내에서 사육되고 있는 말에서 문제시 되고 있는 후구마비성 신경증상을 보이는 질병의 원인으로서는 바이러스, 기생충 등 국내 연구자들간에 다양하게 주장하고 있다. 이번 연구를 통해 국내 발생 말의 임상증상이나 발생역학 등을 종합하여 살펴볼 때 아마도 EHM으로 판단되고 있다. 바이러스성인지 기생충성인지를 추정하고자 혈액치를 분석한 결과, 호중구는 0.44 K/ μ L로 정상 범위인 2.3~9.6 K/ μ L (평균 6.0 K/ μ L)보다 낮은 수치였으며, 림프구는 26.11 K/ μ L로 정상 범위인 1.5~7.1 K/ μ L (평균 4.0 K/ μ L)보다 월등하게 높은 수치를 보였고, 호산구는 0.07 K/ μ L로 정상 범위인 0.0~1.0 K/ μ L (평균 0.5 K/ μ L)보다 낮은 수치를 나타내어 기생충성보다는 바이러스

성 감염으로 추정이 되지만, 앞으로 더 많은 말과 시료(뇌척수액 등)에 대해 다양한 방법으로 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

EHV-1의 탐지를 위한 빠른 실험실의 검사는 잠재적인 전염병에서 가장 유용하다. 왜냐하면 원인체의 빠른 동정은 말의 관리 전략에 매우 중요하기 때문이다. 전통적으로 코인두의 swab나 혈액 시료로부터의 바이러스 분리는 각각의 바이러스 잠복이나 바이러스 혈증의 진단을 위한 gold standard로 생각되어 왔다(Pusterla 등, 2009). 이들 시료는 바이러스 DNA의 제한효소단편다형성(Allen과 Bryans, 1986)과 EHV-1 gC유전자의 탐색을 위한 PCR 또는 면역 조직화학의 검사에 의해 EHV-1로 진단하는데 유용하다(Lawrence 등, 1994). 이들 진단방법 중에서 PCR방법은 그것의 높은 민감도와 특이성 때문에 진단 방법으로 선택되어 왔고 많은 시간이 소비되는 바이러스 분리과정을 크게 교체했다(Borchers와 Slater, 1993; Hussey 등, 2006; Sharma 등, 1992). 또한 single 혹은 nested 방법을 이용한 것과 특이 EHV-1 유전자를 타겟으로 하는 많은 PCR방법이 보고된 바 있다(Borchers와 Slater, 1993; Kirisawa 등, 1993; Lawrence 등, 1994; Sharma 등, 1992; Wagner 등, 1992). EHV-1 genome은 1992년에 첫 발표되었고(Telford 등, 1992), 그 이후로 150 Kb EHV-1 genome의 이해와 그것의 76 open-reading frame (ORFs)의 연구가 상당히 진행되었다(Slater, 2007). 가장 중요한 단일발견은 ORF30에 의해 encode된 바이러스 DNA polymerase 유전자 속에서 single

nucleotide polymorphism (SNP)와의 연계와 EHM의 발생이다(Nugent 등, 2006). Nugent 등(2006)에 의해 실시된 분자 역학적 연구는 바이러스 DNA polymerase 유전자 속의 2254 위치에 있는 아데닌(A)에 대한 구아닌(G)의 단일 비 동의어 염기치환을 발견했는데 이것이 신경병 증상의 발생과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

이번 연구에서 EHV-1 후구마비성 신경증상의 발병은 신경병 증후군을 가지고 있는 말의 응고되지 않은 혈액으로부터 분자단위의 접근법(PCR분석)에 의해 확인되었다. 검사대상 두수 55마리 중에서 후구마비성 신경증상을 나타낸 말은 37마리였고, 15 (27.3%) 마리가 EHV-1 양성으로 진단되었다. 특히 경남의 F 승마장의 경우 13마리로부터 시료를 채취하여 분석한 결과 8마리에서 EHV-1 양성을 나타내었으나 실제 임상증상을 발현한 말은 2마리였다. 이는 바이러스 감염 후 시료를 채취한 시기, 즉 viremia 상태와 관련이 있는 것으로 추정된다. 지역별로는 5곳 중에서 경남과 경북에서만 EHV-1에 대해 양성으로 확인되었다. 또한 양성 시료 중에서 그것이 신경병원성 strain인지 비신경병원성 strain인지 구별하기 위하여 EHV-1 specific DNA polymerase gene (ORF30)을 타겟으로 하는 증폭된 PCR생산물을 가지고 염기서열을 분석한 결과 EHV-1에 대한 양성으로 진단된 15마리 중 A2254 strain 4마리, G2254 strain 3마리로 염기서열이 분석되었으나 특이한 차이를 발견하지 못하였다. 이 또한 더 많은 시료를 대상으로 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

최근 수년간 EHV-1에 의한 뇌척수병증의 발생은 미국과 유럽 등 각국에서 많은 발생보고 및 연구가 있었다. 이번 연구에서 최근 국내 말들에서 신경질환을 유발하는 가능성과 직접적으로 관련이 있을 거라고 추측한 EHV-1에 의한 감염이 다수의 두수에서 확인되지 않았던 이유는 먼저 시료를 채취하는 순간에 시료속에 바이러스의 양이 적거나 거의 없어 EHV-1에 대한 탐색율이 낮은 것으로 생각된다. 이는 전통적인 PCR방법에서 더 심하게 확인되었다. 이를 뒷받침하듯이, Hussey 등(2006)에 의하면 EHV-1에 감염된 말에서 첫 번째 고열기를 겪는 동안에 채취한 혈액시료는 PCR법에 의한 탐지에 종종 음성인 것으로 나타난다고 하였다. 또 다른 것은 EHV-1 감염과 관련된 신경계 손상을 가진 말에서 첫 발열을 시작하는 동안에 얻어진 혈액 속에서 EHV-1 탐색이 어려울 수 있다는 것도 추측할 수 있다. 마주나 관리인은 EHV-1

감염초기 동안에 신경증상을 가지는 말의 면역계를 자극하기 위하여 양질의 사료 공급을 통한 사양관리에 더욱 노력하기 때문에 EHV-1 물질은 빠르게 진행되고 특히 Herpesviridae과의 특성상 EHV-1의 활동이 활성화된 말에서 잠복감염으로의 빠른 전환이 이루어져 혈액이 모아지는 시간에 잠재적인 상태가 될 수 있는 것도 고려할 수 있다. 다음은 이번 연구의 ORF30 유전자 탐지에 양성을 보인 15마리의 말들 중 EHV-1 genomic type을 판별하기 위해 sequencing한 결과 오직 7마리의 말에서만 분석되었다. PCR 결과 양성의 증폭물에서 염기서열 분석이 잘 안되었던 이유들 중 가장 큰 원인은 DNA 증폭물에 존재하던 non-specific band에 의한 간섭현상으로 추정하고 있다. 신경단위 감염을 통한 뇌염을 유발하는 다른 신경병증 원인체와는 달리 EHV-1은 중추신경계로 향하는 동맥을 통하여 신경실질조직 특히 뉴런, 교질세포, 뇌실막세포에 감염하여 출혈 및 뇌척수의 맥관염을 일으키는 혈액유출, 혈전증에 의해 신경병증을 일으킨다(Jackson 등, 1977). 따라서 환마의 부검을 통한 면역조직화학염색에 의한 검사 및 병리조직학적 관찰 등의 다양한 방법을 통한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

EHV-1의 확산을 조절하는 것의 중요한 것 중 하나는 어떤 말이 바이러스를 방출 할지, 어떤 말이 질병의 전염성의 위험을 보여줄지를 판단하는 것이다. EHM 증상을 가지고 있는 자연감염된 말에서 예상되는 바이러스 방출의 기간에 대한 정보는 거의 없다. 대부분의 연구자들이 격리를 권고하고 있는 실정이다. 만약 EHV-1에 감염된 말이 안락사를 해야 할 정도의 치명적인 신경손상을 보인다면 감염된 말은 다른 말에게 전염시킬 수 있으므로 예방을 위한 시스템으로 즉시 감염된 말과 분리될 수 있도록 해야 하고, EHM 발병지역 내에서 주변말로의 바이러스 전염위험에 대한 추가적인 연구를 최소 7일째까지 수행해야 한다. 본 연구에서 JRC-2의 말이 본 질병의 증상을 발현한 후 JRC-1의 말이 감염되어 신경병의 발병 사이는 보통 6~10일이 걸렸다. 이는 Burgee 등(2012)이 EHV-1에 감염된 말의 대다수는 질병의 유발 이후 5~7일 후에 바이러스를 방출한다는 보고한 것과 유사하였다.

국내 말산업을 활성화하고 농가의 생산성을 제고하기 위해서는 백신접종에 대한 방안도 고려해 볼 필요가 있다. 현재 국내에서 말의 백신 접종은 선역, 인플루엔자, 일본뇌염 등 3종에 한해서 시행하고 있다.

EHV-1형에 대한 백신은 선진국에서 실시되는 전두수 접종과는 달리, 국내는 임신마의 유산방지를 위한 예방차원의 백신 접종만 실시되고 있다. 이러한 백신 접종 시스템은 국내 말 뇌척수염의 원인체 중 하나인 EHV-1형 감염에 의한 농장의 생산성 및 경제성 저하를 유발하는 가장 현실적인 문제이다. 따라서 경마산업 및 승마산업에서의 수요 증가에 따른 국내 사육마의 경제적 손실을 줄이고 농가의 소득창출에 기여하기 위해서는 EHV-1의 백신접종이 필요하리라 판단된다.

앞으로 본 질병을 포함하여 국내 말 전염병의 발생에 대비하여 더욱 더 체계적이고 철저하게 관리되고 혹시 전염병이 발생할 경우 즉각적으로 역학조사가 시행될 수 있도록 국가차원의 지원이 필요하다고 생각된다. 또한 바이러스 분리 및 기생충 감염 확인 등이 질병의 예방을 위해서는 다양한 방법을 통해 더 많은 연구가 필요하리라 본다.

결 론

국내에서 사육중인 말에서 뇌척수병증이 의심되거나 임상증상이 발현하는 말 55마리를 대상으로 real-time PCR방법을 통해 검사한 결과 15 (27.3%)마리가 EHV-1 양성으로 진단되었다. 또한 양성 시료중에서 그것이 신경병원성 strain인지 비신경병원성 strain인지 구별하기 위하여 EHV-1 specific DNA polymerase gene (ORF30)을 타겟으로 하는 증폭된 PCR 생산물을 가지고 염기서열을 분석한 결과, EHV-1에 대한 양성으로 진단된 15마리 중 A2254 strain 4마리, G2254 strain 3마리로 염기서열이 분석되었으나 특이한 차이를 발견하지 못하였다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비와 2013년 한국마사회 말산업연구소 연구공모 수행과제로 한국마사회 특별적립금 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- 최성균, 김성국, 조길재. 2011. 제주지역에서 사육중인 더러브렛 말 호흡기로부터 분리된 병원성 *Streptococcus* spp.의 생화학 성상 및 약제감수성 양상. 한국가축위생학회지 34: 209-216.
- Allen GP, Bryans JT. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol.* 2: 78-144.
- Bagust TJ, Pascoe RR, Harden TJ. 1972. Studies on equine herpesviruses 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. *Aust Vet J* 48: 47-53.
- Borchers K, Slater J. 1993. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods* 45: 331-336.
- Borchers K, Thein R, Sterner-Kock A. 2006. Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation. *Equine Vet J* 38: 283-287.
- Burgee BA, Tokatelloff N, Manning S, Lohmann K, Lunn DP, Hussey SB. 2012. Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myelencephalopathy in Western Canada. *J Vet Intern Med* 26: 384-392.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kirisawa R, Endo A, Iwai H, Kawakami Y. 1993. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 36: 57-67.
- Lawrence GL, Gilkerson J, Love DN, Sabine M, Whalley JM. 1994. Rapid, single-step differentiation of equid herpesviruses 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J Virol Methods* 47: 59-72.
- Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend HG. 2009. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 23: 450-461.
- Matumoto M, Ishizaki R, Shimizu T. 1965. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in various countries. *Arch Gesamte Virusforsch* 15: 609-624.

- Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N. 2006. Analysis of equine herpesvirus type 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus non-neuropathogenic disease outbreaks. *J Virol* 80: 4047-4060.
- Pusterla N, Hussey SB, Mapes S, Leutenegger CM, Madigan JE, Ferraro GL, Wilson D, Lunn DP. 2009a. Comparison of four methods to quantify Equid herpesvirus 1 load by real-time polymerase chain reaction in nasal secretions of experimentally and naturally infected horses. *J Vet Diagn Invest* 21: 836-840
- Sharma PC, Cullinane AA, Onions DE, Nicolson L. 1992. Diagnosis of equid herpesviruses -1 and -4 by polymerase chain reaction. *Equine Vet J* 24: 20-25.
- Slater J. 2007. Equine Herpesviruses. In: Sellon DC, Long MT(Ed.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA. pp.134-153.
- Slater JD, Lunn DP, Horohov DW, Antczak DF, Babiuk L, Breathnach C, Chang YW, Davis-Poynter N, Edington N, Ellis S, Foote C, Goehring L, Kohn CW, Kydd J, Matsumura T, Minke J, Morley P, Mumford J, Neubauer T, O'Callaghan D, Osterrieder K, Reed S, Smith K, Townsend H, van der Meulen K, Whalley M, Wilson WD. 2006. Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet Immunol Immuno Pathol* 111: 3-13.
- Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189: 304-316.
- van Maanen C. 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Q* 24: 58-78.
- 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: 1193-1196.
- Wilson WD. 1997. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13: 53-72.