

ORIGINAL

Detection of equine herpesvirus 1 and 4 and its association with latency-associated transcripts in naturally infected horses in Colombia

Detección de los herpesvirus equinos 1 y 4 y su relación con transcriptos asociados a la latencia en caballos infectados naturalmente en Colombia

Diana Vargas-Bermudez^{1*} M.Sc, Adriana Corredor F¹ M.Sc, Gloria Ramírez-Nieto¹ Ph.D, Víctor Vera A¹ Ph.D, Jairo Jaime C¹ Ph.D.

¹Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Grupo de Microbiología y epidemiología, Bogotá D.C. Colombia. *Correspondence: dsvargasb@unal.edu.co,

Received: June 2017; Accepted: January 2018.

ABSTRACT

Objective. Determine the presence of antibodies and viral genomes of EHV-1 and EHV-4, as well as to detect the presence of latency associated transcripts (LATs) in a selected population of Colombian horses. **Materials and methods.** Serum samples, submandibular lymph nodes and trigeminal ganglion were obtained from 50 horses and analyzed. Sera were evaluated for the presence of antibodies against EHV-1 and EHV-4 while tissues were initially evaluated for the presence of viral genome by nPCR. Finally, samples were used for the detection of LATs through RT-PCR. **Results.** In general, 6/50 samples showed antibodies to EHV-1 and 44/50 were positive for EHV-4. As for viral genome detection, 10/50 samples were positive for EHV-1 and 30/50 were positive for EHV-4; in addition, 22/35 horses positive for EHV DNA were positive for LATs. The use of these tests led to eight possible combinations of results. **Conclusions.** The evidence used shows that horses can have simple viral infection, co-infections with both viruses, latency due to the presence of LATs and the simultaneous presence of LATs and viral genome replication at a given time. It contributes to the understanding of the behavior of the disease in Colombia and calls attention to the importance of implementing complementary diagnoses to the serology for the control of these viruses.

Keywords: Antibodies; EHV-1; EHV-4; latency; PCR (*Sources: MeSH, DeCS*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar presencia de anticuerpos y genoma viral de EHV-1 y EHV-4, como también detectar la presencia de transcriptos asociados a latencia (LATs) en una población seleccionada de caballos colombianos. **Materiales y métodos.** Muestras de suero, nódulos linfáticos submandibulares y ganglio trigémino se obtuvieron de 50 caballos y fueron analizadas. Los sueros se evaluaron para la presencia de anticuerpos contra EHV-1 y EHV-4 mientras que los tejidos se evaluaron inicialmente para la presencia de genoma viral por nPCR. Finalmente, las muestras se emplearon para la detección de LATs a través de RT-PCR. **Resultados.** En general, 6/50 muestras mostraron anticuerpos para EHV-1 y 44/50 fueron positivos para EHV-4. En cuanto a la detección del genoma viral, 10/50 muestras

fueron positivas para EHV-1 y 30/50 fueron positivas para EHV-4; además, 22/35 caballos positivos para DNA de EHV fueron positivos para LATs. El empleo de estas pruebas llevó a ocho posibles combinaciones de resultados. **Conclusiones.** Se confirma la presencia de estos virus en la población equina colombiana. Las pruebas empleadas demuestran que los caballos pueden tener infección viral simple, co-infecciones con ambos virus, estado de latencia debido a la presencia de los LATs y presencia simultánea de LATs y de replicación de genoma viral en un momento dado. Se aporta al entendimiento del comportamiento de la enfermedad en Colombia y se llama la atención sobre la importancia de implementar diagnósticos complementarios a la serología para el control de estos virus.

Palabras clave: EHV-1; EHV-4; ELISA, latencia; PCR (*Fuentes: MeSH, DeCs*).

INTRODUCTION

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) are important pathogens that have a significant economic impact on horse populations worldwide. They are responsible for a variety of diseases, including respiratory disease, abortion, neonatal disease and myeloencephalitis (1). The two viruses have seroprevalence rates ranging from 9 to 28% for EHV-1 and 90 to 100% for EHV-4 (1,2).

Both viruses are members of the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae* and genus *Varicellovirus* (2). The viruses have double stranded DNA genomes containing 150,223 and 145,597 base pairs (bp) in length, respectively (1,3), and 79 and 80 open reading frames (ORFs), respectively (1). Infection by these alphaherpesviruses produces a respiratory disease characterized by fever, anorexia and nasal and ocular discharge, which, together with bacterial proliferation, may contribute to the production of rhinopneumonitis (1, 2). Specifically, EHV-1 replication occurs in epithelial cells of the upper respiratory tract and in local lymph nodes, resulting in leukocyte-associated viraemia (2). Such viraemia leads to viral replication in the endothelial cells of blood vessels and in the central nervous system and pregnant uterus, thus triggering abortions and paresis (2, 4). It has been proposed that EHV-1 has neuropathogenic and non-neuropathogenic strains differentiated by a single mutation in ORF30 encoding viral DNA polymerase (2, 5).

Although the pathogenesis of EHV-4 is still unclear, it is a cause of respiratory disease in horses (1, 2), leukocyte-associated viremia is rare and occasionally associated with abortion and neurological disorders (4, 6). One of the main characteristics of alphaherpesviruses is the development of latency in lymphoid tissues, circulating lymphocytes and trigeminal ganglia (TG) (2, 7). Latent infection implies that the viral genome is in a non-replicative, restricted transcription state wherein only Latency-Associated Transcripts (LATs) are produced (8).

INTRODUCCIÓN

Los herpesvirus equinos 1 (EHV-1) y 4 (EHV-4) son patógenos importantes que producen un impacto significativo sobre las poblaciones de caballos en todo el mundo. Ellos son responsables de una variedad de enfermedades donde se incluyen enfermedad respiratoria, abortos, enfermedad neonatal y mieloencefalitis (1). Los dos virus muestran unas tasas de seroprevalencia que oscilan desde 9 hasta 28% para el EHV-1 y del 90 al 100% para el EHV-4 (1,2).

Ambos virus son miembros de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus* (2). EHV-1 y EHV-4 tienen como genoma una cadena doble de DNA que contiene 150,223 y 145,597 pares de bases (bp) de longitud (1,3) y 79 y 80 marcos abiertos de lectura (ORFs) respectivamente (1). La infección por estos alphaherpesvirus produce una infección respiratoria caracterizada por fiebre, anorexia y descarga ocular y nasal, lo cual, con la proliferación de bacterias, puede contribuir a la producción de rinoneumonía (1,2). Específicamente, la replicación del EHV-1 ocurre en células epiteliales del tracto respiratorio superior y en los nódulos linfáticos locales, resultando en una viremia asociada a leucocitos (2). Esta viremia conduce a la replicación viral en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, en el sistema nervioso central y en el útero preñado, desencadenando así abortos y paresia (2,4). Se ha propuesto que el EHV-1 presenta cepas neuropatogénicas y no-neuropatogénicas que se diferencian solamente por un punto de mutación en el gen que codifica para la DNA polimerasa en el ORF30 (2,5).

Aunque la patogénesis del EHV-4 aun no es clara, es la causa de enfermedad respiratoria en caballos (1,2), la viremia asociada a leucocitos es rara y ocasionalmente se ha asociado con la presentación de aborto y desórdenes neurológicos (4,6). Una de las principales características de los alphaherpesvirus es el desarrollo de la latencia en el tejido linfóide, linfocitos circulantes y a nivel del ganglio trigémino (TG) (2,7). La infección latente implica que el genoma viral se encuentra en un estado no replicativo con transcripción restringida donde sólo se producen

EHV-1 and 4 are in episomal form in TG, or in lymphoid cells (9, 10). Both for EHV-1 and for EHV-4, specific LATs from genes 64 and 63 have been found in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and trigeminal ganglia, respectively (10).

EHV-1 and EHV-4 can be diagnosed directly through the detection of virus in clinical samples (nasal swabs, serum and buffy coat samples) by virus isolation in cell culture, conventional or real time PCR (11, 12) or indirectly through the detection of EHV-1 or EHV-4 antibodies in serum or cerebrospinal fluid (CSF) by viral neutralization, complement fixing or EHV-1/EHV-4 type specific ELISA based on recombinant antigens of glycoprotein G (gG), thus allowing differentiation between them (11,12).

However, these tests only indicate whether the horse has been exposed to the virus (12, 13). PCR assays are more sensitive and rapid, have replaced the time-consuming procedure of virus isolation (13, 14), however these tests are unable to differentiate between a replicating or non-replicating virus (14, 15). For this reason, diagnosis of latently infected horses is important because they represent virus reservoirs (16), as these tests are based on molecular detection of LATs and quantification by real time PCR at a DNA and mRNA level, in order to differentiate viral states (10, 14).

In Colombia, the first report of EHV-1 was in 1992, when the virus was isolated from samples of an aborted fetus whose dam had come from Argentina (17). In 2007 and 2008, (18, 19) a seroprevalence was reported in the regions of Antioquia and Meta, with co-infection with both viruses. The objective of this study was to evaluate the presence of EHV-1 and EHV-4 in a selected population of Colombian horses, through serology, detection of viral genomes in submandibular lymph node and trigeminal ganglion samples and detection of LATs in both tissues.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sample collection. The serum and tissue samples were taken from horses (n = 50) slaughtered in a commercial slaughterhouse. The equine abattoir is located in the department of Cundinamarca in the center of Colombia, where it receives horses from all over the country. Of the fifty horses, 24 were males and 26 were females, with an age distribution that varied between 5 to 25 years old estimated by photos of incisor dentition. Blood samples (10-15ml) from each slaughtered horse were taken and

unos transcritos denominados Transcritos Asociados a la Latencia (LATs) (8). Los EHV-1 y 4 se encuentran en forma episomal en el ganglio trigémino o en las células linfoides (9,10). Los LATs son específicos para EHV-1 y EHV-4 y son expresados respectivamente por los genes 64 y 63; se han encontrado en células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y en el ganglio trigémino (10).

Los EHV-1 y EHV-4 pueden ser diagnosticados directamente a través de la detección del virus mediante aislamiento viral en cultivos celulares, PCR convencional o en tiempo real (qPCR) a partir de muestras clínicas (hisopos nasales, suero y linfocitos provenientes de sangre completa) (11,12) o indirectamente a través de la detección de anticuerpos en suero o fluido cerebro espinal mediante las técnicas de sero-neutralización viral, fijación de complemento o un ELISA específico contra la glicoproteína g (gG) de EHV-1 y EHV-4, permitiendo la diferenciación entre ellos (11,12). Sin embargo, estas pruebas solamente detectan si un caballo ha estado expuesto al virus (12,13). La PCR como diagnóstico, es una prueba sensible y rápida y sobrelleva el problema del tiempo que consume el aislamiento viral (13,14). Sin embargo, las pruebas de PCR son incapaces de diferenciar entre los virus que están en fase replicativa y los que no (14,15). Por esta razón, la detección de los caballos con infección latente es muy importante, ya que estos se convierten en los reservorios del virus (16). Ese diagnóstico se hace por pruebas moleculares buscando los LATs a partir de mRNA y complementariamente cuantificando el virus por PCR en tiempo real a nivel de DNA con el fin de diferenciar los estados virales (10,14).

En Colombia, el primer reporte de EHV-1 se hizo en 1992, cuando el virus fue aislado de muestras de un feto abortado cuya madre provenía de Argentina (17). En 2007 y 2008 (18,19) se reportó seroprevalencia en las regiones de Antioquia y Meta con co-infección con los dos virus. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de EHV-1 y EHV-4 en una población seleccionada de caballos en Colombia, empleando serología, detección de genoma viral en muestras de nódulos linfáticos submandibulares y ganglio trigémino y la detección de LATs en ambos tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y recolección de muestras. Muestras de suero y tejidos fueron recolectadas de caballos (n= 50) sacrificados en una planta comercial. Esta planta se encuentra localizada en el departamento de Cundinamarca en el centro de Colombia, donde se reciben caballos de todo el país. De los cincuenta animales, 24

transported to the laboratory, where the samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min and sera were stored at -70°C . Submandibular lymph nodes (SLN) and trigeminal ganglia (TG) were recovered by horse head dissection, transported at 4°C to the laboratory and stored at -70°C . To avoid cross-contamination among tissues from different horses, disposable instruments were employed to take each sample. The status of vaccination of the horses studied for EHV-1 and 4 was unknown.

Antibodies detection for EHV-1 and EHV-4. Serum samples were tested for the presence of antibodies to EHV-1 and EHV-4 using the SVANOVIR EHV-1/EHV-4 Ab kit (Svanovir, Sweden), according to manufacturer's instructions. The results were recorded at 450nm using a (BioTek® Power Wave XS OD) ELISA reader. Samples were considered positive at >0.2 and negative at lower than 0.1.

Nested PCR (nPCR). Twenty-five milligrams of each tissue (TG and SLN) were excised and the DNA was extracted using the QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN®), in accordance to the manufacturer's instructions. The nPCR amplified a conserved region of the *gB* gene for both EHV-1 and EHV-4, primers reported by Borchers et al, 1993 (20). EHV-1 primers for the first PCR reaction were (P1 5'-TCTACCCCTACGACTCCTTC-3' and P2 5'-ACGCTGTCGATGTCGATAAACCTGAGAG-3') and for the second PCR reaction were (P3 5'-CTTTAGCGCTGATGTGGAAT-3' and P4 5'-AAGTAGCGCTTCTGATTGAGG-3'), which amplified a region of 1474 and 771pb, respectively (20). EHV-4 primers for the first PCR reaction were (P1 5'-TCTATTGAGTTTGCTATGCT-3' and P2 5'-TCCTGGTTGTTATTGGGTAT-3') and for the second PCR reaction were (P3 5'-TGTTTCCGCCACTCTTGACG-3' and P4 5'-ACTGCCTCTCCACCTTACC-3'), which amplified a region of 952 and 600pb, respectively (20). Reactions were performed in a total volume of 25 μl containing 0.25 μl of *Taq* polymerase (5 U/ μl) (Go *taq* flexi - Promega®), 5x *Taq* buffer (2.5 μl), 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP, 1 μl of each primer (20 μM) and 2 μl of extracted DNA. Positive and negative controls were included. The PCR reactions were performed on a Biorad® - DNA thermocycler using a protocol consisting, in a first round, of denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles including a denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 57°C or 60°C for 1 min for EHV-1 and EHV-4, respectively, and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. One microliter of the first amplification reaction was used for the nPCR. The second-round PCRs were performed as described above, with annealing steps at 56°C or 55°C for 1 min for EHV-1 and EHV-4, respectively.

eran machos y 26 hembras, distribuidos en una edad entre 5 y 26 años estimado por fotos de la dentición incisiva. Muestras de sangre (10-15ml) de cada caballo sacrificado fueron tomadas y transportadas al laboratorio, donde se centrifugaron a 2500rpm por 10 min y el suero fue almacenado a -70°C . Nódulos linfáticos submandibulares (SLN) y ganglio trigémino (TG) se recuperaron por disección de la cabeza de cada caballo, se transportaron a 4°C al laboratorio y se almacenaron a -70°C . Para evitar contaminación cruzada entre tejidos de diferentes caballos, se empleó instrumental desechable en la toma de cada muestra. El estatus de vacunación de los animales para EHV-1 y EHV-4 era desconocido.

Detección de anticuerpos para EHV1 y EHV-4. Las muestras de suero fueron evaluadas para determinar la presencia de anticuerpos para EHV-1 y EHV-4 empleando el kit SVANOVIR EHV-1/EHV-4 Ab kit (Svanovir, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se midieron a 450nm usando un lector de ELISA (BioTek® Power Wave XS OD). Las muestras se consideraron como positivas a un valor >0.2 y negativo a un valor menor a 0.1.

PCR anidado (nPCR). De cada tejido (TG and SLN) se tomaron 25mg que fueron cortados y el DNA fue extraído empleando el kit QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR anidada que amplifica una región conservada del gen *gB* para EHV-1 y para EHV-4, empleando los primers reportados por Borchers et al 1993 (20). Los primers para la reacción de PCR en el caso de EHV-1 fueron: (P1 5'-TCTACCCCTACGACTCCTTC-3' y P2 5'-ACGCTGTCGATGTCGATAAACCTGAGAG-3') y para la segunda reacción de nPCR fueron (P3 5'-CTTTAGCGCTGATGTGGAAT-3' y P4 5'-AAGTAGCGCTTCTGATTGAGG-3'), estos primers amplifican una secuencia de 1474 y 771pb (pares de bases), respectivamente (20). En el caso de EHV-4, los primers de la primera reacción fueron (P1 5'-TCTATTGAGTTTGCTATGCT-3' y P2 5'-TCCTGGTTGTTATTGGGTAT-3') y para la segunda nPCR fueron (P3 5'-TGTTTCCGCCACTCTTGACG-3' y P4 5'-ACTGCCTCTCCACCTTACC-3'), estos primers amplifican una secuencia de 952 y 600 pb, respectivamente (20). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 μl conteniendo 0.25 μl of *Taq* polimerasa (5 U/ μl) (Go *taq* flexi - Promega®), 5x *Taq* buffer (2.5 μl), 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP, 1 μl de cada primer (20 μM) y 2 μl de DNA extraído. Las reacciones de PCR se hicieron en el termociclador (Biorad® - DNA) usando un protocolo consistente en un primer ciclo de denaturación a 94°C por 5min, seguido por 40 ciclos que incluyen una denaturación de 94°C por 1 min, una

The positive controls used corresponded to a Colombian EHV-1 cell culture-isolate from 1992 (17) and an EHV-4 positive clinical sample. DEPC-treated water was used as a blank control.

LATs detection by nPCR. TG and SLN samples testing positive or negative for EHV-1 or/and EHV-4 DNA detection were subjected to gene-63 and gen-64 LAT amplification by another nested PCR, taking into account that the primers for genes 63 and 64 amplify sequences for EHV-4 and EHV-1, respectively (21, 22). For this purpose, RNA was extracted from tissues samples with the RNeasy® kit (QIAGEN), in accordance with the manufacturer's instructions. All RNA samples were treated with DNase to digest any contaminating viral DNA. Complementary DNA (cDNA) synthesis reaction was performed using random hexamer primers (Promega®) and M-MLV (Invitrogen®), according to the manufacturers' instructions. For the gen 63 nested PCR, the first reaction was performed with primers (63eF-5' GGGGCAAGGGCTCTAAACCT-3' and 63eR-5' CAGGAGACACCAGCAACGAC-3') and the second PCR reaction with primers (63iF 5'-CAAACCTCCCGCAGGTTGTATC-3' and 63iR 5'-ACTTTGGACAGCGAGGGTGAA-3'), in order to amplify a sequence of 532 and 253bp, respectively (10). For the Gen 64 nPCR, the primers for the first PCR were (64eF 5'-GGAGACCGCGTCCAGCACTA-3' and 64eR 5'-CTCCGAGGGAAGCCAGACCT-3') and for the second PCR reaction were (64iF 5'-GGACCCCCTGGGCGTTGAGG-3' and 64iR 5'-CCGCGGAGACTGCCCACTC-3'), which amplified a sequence of 1108 and 500 pb, respectively (10). The reactions were performed in a total volume of 25µl containing 0.25 µl of *Taq* polymerase (5 U/µl) (Go *taq* flexi - Promega®), 5x *Taq* buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 1 µl of each primer (20 µM) and 2µl of cDNA. PCR reactions were performed on a Biorad® - DNA thermocycler. The first-round PCR consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seg, annealing at 55°C and 64°C for 45 seg for Gen 63 and Gen 64, respectively, and extension at 72°C for 1min, with a final extension at 72°C for 5 min. One microliter of the first amplification reaction was used for the nPCR. The second-round PCR was performed as described above, with the annealing step at 58°C and 60°C for 45 seg for Gen 63 and Gen 64, respectively. As positive controls, RK-13 cells were infected with EHV-1 (isolated in 1992 -Colombia) and at 48 hours post infection, the cells were harvested, pelleted, and then the RNA was extracted. For EHV-4, a positive clinical sample (by PCR) was employed. DEPC-treated water was used as a negative control for the DNA extraction and PCRs. Controls were included in each PCR run, and the

hibridación a 57°C o 60°C para EHV-1 y EHV-4, respectivamente, y una extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 10 min. Un microlitro de la primera amplificación se empleó para la nPCR. La segunda PCR se realizó como se mencionó anteriormente, con etapas de hibridación a 56°C o 55°C por 1 min para EHV-1 y EHV-4, respectivamente. Los controles positivos empleados correspondieron a un cultivo celular infectado con el aislamiento de 1992 (17) y para EHV-4 a una muestra clínica positiva. Agua DEPC se empleó como control blanco.

Detección de LATs por nPCR. Las muestras de TG y SLN que fueron positivas o negativas para la detección del DNA de EHV-1 y/o EHV-4 se sometieron a otra PCR anidada donde se buscaba amplificar los LATs expresados por los genes 63 y 64 para EHV-4 and EHV-1 respectivamente (21, 22). Para este propósito, se extrajo el RNA de las muestras de los tejidos con el kit RNeasy® kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de RNA fueron tratadas con DNase para digerir cualquier contaminante de DNA viral. Se hizo síntesis de DNA complementario (cDNA) empleando primers hexámeros al azar (Promega®) y M-MLV (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR anidada del gen 63, inicialmente se emplearon los primers (63eF 5'-GGGGCAAGGGCTCTAAACCT-3' y 63eR 5'-CAGGAGACACCAGCAACGAC-3') y la segunda reacción de nPCR con los primers (63iF 5'-CAAACCTCCCGCAGGTTGTATC-3' y 63iR 5'-ACTTTGGACAGCGAGGGTGAA-3'), con esto se amplificaron secuencias de 532 y 253 pb, respectivamente (10). Para el gen 64, la primera PCR se hizo con los primers (64eF 5'-GGAGACCGCGTCCAGCACTA-3' y 64eR 5'-CTCCGAGGGAAGCCAGACCT-3') y para la segunda reacción de nPCR fueron (64iF 5'-GGACCCCCTGGGCGTTGAGG-3' y 64iR 5'-CCGCGGAGACTGCCCACTC-3'), estas amplifican una secuencia de 1108 y 500 pb, respectivamente (10). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl conteniendo 0.25 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl) (Go *taq* flexi - Promega®), 5x *Taq* buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 1 µl de cada primer (20 µM) y 2 µl of cDNA. Las reacciones de PCR fueron hechas en el termociclador Biorad® - DNA. La primera PCR consistió de una etapa de denaturación inicial a 95°C for 5 min, seguido por 40 ciclos compuestos por una denaturación a 94°C por 30 seg, hibridación a 55°C y 64°C por 45 seg para el gen 63 y para el gen 64, respectivamente, y una extensión final a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 5min. Un microlitro de la primera amplificación fue empleado para la nPCR. La segunda PCR fue

controls from the primary PCR was carried over to the nested step.

Ethics committee. The current research was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the Universidad Nacional de Colombia, Bogota. Equine slaughterhouse sacrifice protocols are under government legal authorization (Resolution 0222 of the Colombian Health Ministry).

Statistical analysis. Data were analyzed by Kruskal-Wallis. Probabilities $p < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using Statistics 8, software.

RESULTS

Serological reactivity. Serological assessment showed that 44/50 (88%) and 6/50 (12%) of horses were positive for EHV-4 and EHV-1 antibodies, respectively (Figure 1). It is noteworthy that all horses positive for EHV-1 antibodies were also positive for EHV-4. Among the seropositive horses, no difference was found between males and females for both viruses. Likewise, no age differences were observed in the presence of antibodies against EHV-1 and EHV-4 ($p > 0.05$).

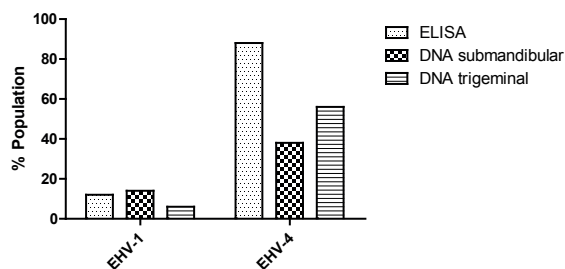


Figure 1. EHV-1 and EHV-4 serological reactivity by ELISA and viral DNA detection in submandibular and trigeminal tissues in the evaluated population

EHV-1 and EHV-4 in sub-mandibular lymph nodes and trigeminal ganglia. EHV-1 DNA was detected in 10/50 (20%) of horses (Table 1), and of the latter, horses were either positive in sub-mandibular lymph nodes (7/10) or in trigeminal ganglia (3/10). In the case of EHV-4 DNA, it was found in 30/50 of horses (60%), of which 17/30 (56%) were detected in both tissues (Table 1). EHV-1 and EHV-4 co-infection was detected in 5/50 horses (10%). Neither EHV-1 nor EHV-4 DNA detection revealed differences associated with age or sex.

realizada como se describió previamente, con una etapa de hibridación a 58°C y 60°C por 45 seg para el gen 63 y gen 64, respectivamente. Como controles positivos se emplearon células RK-13 que fueron infectadas con EHV-1 (aislado en 1992) a 48 horas pos-infección. Estas fueron centrifugadas y luego se les extrajo el RNA. Para EHV-4 se empleó una muestra clínica positiva (por PCR). Agua DEPC se empleó como control negativo para la extracción del DNA y para las PCRs. Los controles fueron incluidos en cada corrida de PCR, y los controles de la primera PCR se usaron para la PCR anidada.

Comité de ética. La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Los protocolos de sacrificio de los equinos en la planta de faenado están bajo la autorización legal del gobierno de Colombia (resolución 0222 del Ministerio de Salud).

Análisis Estadístico. Los datos fueron analizados por Kruskal-Wallis. Probabilidades $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas. Todos los análisis estadísticos se hicieron empleando el programa Statistics 8.

RESULTADOS

Reactividad serológica. La evaluación serológica mostró que 44/50 (88%) y 6/50 (12%) de los caballos fueron positivos para anticuerpos anti EHV-4 y EHV-1 respectivamente (Figura 1). Se debe destacar que los caballos positivos para anticuerpos anti EHV-1 fueron también positivos a anticuerpos anti EHV-4. Entre los caballos seropositivos, no se encontró diferencia entre machos y hembras. Del mismo modo, no se encontraron diferencias por edad en la presencia de anticuerpos contra EHV-1 y EHV-4 ($p > 0.05$).

EHV-1 y EHV-4 en nódulos linfáticos submandibulares y ganglio trigémino. DNA para EHV-1 fue detectado en 10/50 (20%) de los caballos (Tabla 1), y de estos últimos, se encontraron caballos positivos en nódulos linfáticos submandibulares (7/10) y en ganglio trigémino (3/10). En el caso de DNA para EHV-4, se encontró en 30/50 de los caballos (60%), de estos 17/30 (56%) fueron detectados en ambos tejidos (Tabla 1). La co-infección con EHV-1 y EHV-4 se detectó en 5/50 caballos (10%). La presencia de DNA para EHV-1 y EHV-4 no mostró asociación alguna con la edad o sexo.

Table 1. Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes

Sample	EHV-1 DNA	EHV-4 DNA
	Positive % (n/total)	
Submandibular lymph nodes	14 (7/50)	38 (19/50)
Trigeminal ganglia	6 (3/50)	56 (28/50)
Trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes	0 (0/50)	34 (17/50)
Total	20 (10/50)	60 (30/50)

Comparatively, in the case of EHV-4, 44 (88%) horses were positive by ELISA and 30 (60%) by viral DNA amplification. In the evaluated population, the presence of this virus was determined in 38% (19/50) when evaluating the submandibular lymph nodes and 56% (28/50) in the trigeminal ganglion (Figure 1). In contrast, for EHV-1, 6 (12%) horses were sero-positive and 10 (20%) amplified viral DNA. Regarding detection of the virus in the mandibular nodule, it was found in 7/50 (14%) of the horses, whereas for the trigeminal ganglion it was 3/50 (6%). Among horses that tested negative by ELISA, 88% (44/50) for EHV-1 and 12% (6/50) for EHV-4, 5/44 (11.3%) were found positive for EHV-1 DNA amplification.

Analysis of the results for both ELISA and PCR for EHV-1 shows that the most frequent combination found was negative (38 horses). Likewise, EHV-1 positive results for all tests or positive for viral DNA in both tissues and negative for ELISA were never observed (Table 2). In contrast, for EHV-4 the most frequent combination was positive for all tests, together with negative for viral DNA detection and positive for ELISA.

LATs detection. LATs of genes 63 and 64 were detected by RT-PCR in 22/50 (45%) of horses evaluated that horses were positive for virus detection by PCR. Gene-63 transcript was detected only from trigeminal ganglion in 17/28 (60%) of EHV-4 positive horses; whereas gene 64 transcript was amplified only from submandibular lymph node samples from 5/7 (71%) EHV-1 positive horses. However, transcripts for genes 63 and 64 were detected simultaneously only for one horse.

DISCUSSION

The aim of this research was to evaluate the occurrence of EHV-1 and EHV-4 in Colombia using serology and genome detection. Initially, our data confirmed that both viruses are

Comparativamente, en el caso del EHV-4, 44 (88%) de los caballos fueron positivos por ELISA y 30 (60%) por amplificación del DNA viral. En la población evaluada, la presencia de este virus se determinó en 38% (19/50) cuando se evaluaron los nódulos linfáticos submandibulares y de 56% (28/50) en el ganglio trigémino (Figura 1). En contraste, para EHV-1, 6 (12%) de los caballos fueron seropositivos y 10 (20%) amplificaron DNA viral. Respecto a la detección de virus en los nódulos mandibulares, se encontró en 7/50 (14%) de los caballos, mientras que para el ganglio trigémino fue de 3/50 (6%). Entre los caballos negativos por ELISA, 88% (44/50) fueron para EHV-1 y 12% (6/50) para EHV-4. De los negativos para EHV-1, 5/44 (11.3%) fueron positivos para la amplificación de DNA viral.

Análisis de los resultados en conjunto de ELISA y PCR para EHV-1 mostraron que la combinación más frecuentemente encontrada fue la negativa (38 caballos). Igualmente, resultados positivos para ambas pruebas o la combinación de positivo para la presencia de DNA viral en los dos tejidos y negativo para ELISA nunca fueron encontrados (Tabla 2). En contraste, para EHV-4, la combinación más frecuentemente encontrada fue la positiva para todas las pruebas, seguido por negativo para la detección de ADN viral y positivo para ELISA.

Detección de LATs. Los LATs expresados por los genes 63 y 64 se detectaron por RT-PCR en 22/50 (45%) de los caballos del estudio, de los cuales todos fueron positivos para la detección viral por nPCR. Transcritos del gen 63 fueron detectados solamente a partir de ganglio trigémino en 17/28 (60%) de los caballos positivos para EHV-4; mientras que transcritos del gen 64 solo se amplificaron a partir de nódulos linfáticos submandibulares de 5/7 (71%) de los caballos positivos para EHV-1. Sin embargo, transcritos para los genes 63 y 64 se detectaron simultáneamente solamente en un caballo.

DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la ocurrencia en Colombia de EHV-1 y EHV-4 empleando serología y detección de genoma viral. Inicialmente, los datos confirman la presencia de los dos virus en el país, como ya ha sido previamente reportado (18, 19), y en términos de prevalencia esta investigación está en acuerdo con estudios hechos en otros países en los últimos años (9), donde para EHV-1 es más baja (12 a 21%) que para EHV-4 (88 a 100%). Los resultados de nuestro estudio son similares

Table 2. The results of EHV-1 and 4 testing to ELISA, PCR to EHV-1 and EHV-4 and LATS. Abbreviations denote horses that tested positive (+) or negative (-) for EHV-1/EHV-4 DNA or Gen 63/64 LATS. Positive ELISA in red.

Horse ID	ELISA		EHV-1 PCR		EHV-4 PCR		LATS	
	EHV-1	EHV-4	SLN	TG	SLN	TG	Gene 63	Gene 64
1	0.511	0.394	+	-	-	+	-	+
2	0.029	0.696	-	-	+	+	+	-
3	0.021	1.245	-	-	+	+	+	-
4	0.052	0.281	-	-	+	+	+	-
5	0.05	0.562	-	-	+	+	+	-
6	0.096	0.941	-	-	+	+	+	-
7	0.256	0.632	+	-	+	+	+	+
8	0.094	0.826	-	+	+	+	-	-
9	0.025	0.355	-	-	+	-	-	-
10	0.507	0.244	+	-	-	-	-	+
11	0.096	0.898	-	-	-	-	-	-
12	0.098	0.621	-	-	-	-	-	-
13	0.034	0.326	-	-	-	+	-	-
14	-0.026	0.052	-	-	-	-	-	-
15	-0.017	0.003	+	-	-	-	-	+
16	0.039	0.637	-	-	+	+	+	-
17	0.41	0.321	-	-	-	+	-	-
18	0.864	0.413	-	-	-	-	-	-
19	0.023	1.161	-	-	-	-	-	-
20	0.1	0.309	-	-	+	+	-	-
21	0.021	0.276	-	-	+	+	-	-
22	-0.001	0.203	-	-	+	+	+	-
23	-0.002	0.256	-	+	-	-	-	-
24	0.020	-0.001	-	-	-	-	-	-
25	0.034	0.501	-	-	+	+	+	-
26	0.916	1.097	-	+	-	+	-	-
27	0.025	0.519	-	-	-	+	+	-
28	0.084	0.269	-	-	+	+	+	-
29	0.02	0.092	-	-	-	-	-	-
30	-0.002	0.311	-	-	-	+	+	-
31	-0.014	0.242	-	-	-	-	-	-
32	0.008	0.996	-	-	-	-	-	-
33	0.004	0.017	-	-	-	-	-	-
34	0.001	0.769	-	-	-	-	-	-
35	0.001	0.419	-	-	+	-	-	-
36	0.079	1.055	+	-	-	-	-	+
37	0.091	0.087	-	-	-	-	-	-
38	0.033	0.324	+	-	-	-	-	-
39	0.098	0.302	-	-	-	-	-	-
40	-0.008	0.457	-	-	+	+	+	-
41	0.100	1.811	-	-	+	+	-	-
42	0.008	0.211	+	-	-	+	+	-
43	0.010	1.009	-	-	-	-	-	-
44	0.013	0.3	-	-	-	+	-	-
45	0.013	0.399	-	-	-	+	+	-
46	0.033	0.245	-	-	+	+	-	-
47	0.018	0.549	-	-	-	+	+	-
48	0.061	0.877	-	-	+	+	-	-
49	0.011	1.082	-	-	-	+	+	-
50	0.018	0.489	-	-	-	-	-	-

present in the country, as previously reported (18, 19), and in terms of prevalence it is in agreement with studies from other countries in the latest years (9), where the prevalence of EHV-1 was lower (12 to 21%) than EHV-4 (88 to 100%). The results of our study echoed previous reports (18, 23) showing that virus distribution was unaffected by sex and age. In contrast to other studies (19), ours shows the presence of EHV-1 and EHV-4 viral genomes in sera-negative samples; this finding suggests that serological results do not indicate the stage of the disease because some horses with latent infection have failed to produce antibodies (24). Another possibility is that horses tested by ELISA might have been recently infected with EHV-1 and EHV-4 and have not yet mounted a detectable antibody response.

For the molecular detection of EHV-1 and EHV-4, the recommended samples are respiratory tract cells, serum, lymph nodes tissues and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (11, 25), where the infectious virus is replicating. For the detection of latent virus, trigeminal ganglia and PBMC are the recommended tissues in order to detect markers of latency (LATs) (26, 27, and 28). In this study, EHV-1 and EHV-4 viral DNA were detected from submandibular lymph nodes and trigeminal ganglia, being that the percentage of viral genome detection for EHV-1 in submandibular lymph nodes was higher compared to TG, as reported by Dunowska et al, 2015 (9). In the case of EHV-4, we found more viral DNA from TG, as was reported previously (18).

Consistent with previous studies (16, 27), who report latency of 40 and 45% respectively; our study found LATs in 45% of infected horses. However, there are discrepancies between the studies regarding the site of latency for EHV-1 and EHV-4 (9, 27); specifically, EHV-1 has been reported to establish greater latency in lymphoid tissue than in nervous tissue. In the current study, EHV-1 LATs were only found in submandibular lymph nodes, whereas EHV-4 LATs were found in trigeminal ganglia. Several studies have shown that the technique used for detection may influence the ability to identify horses in latency, particularly using conventional PCR (9). Allen et al 2008 (16), estimated the prevalence of EHV-1 latency using ultralow magnetic bead-based detection, sequence-capture, and nested PCR, finding about a 30% greater prevalence compared to conventional PCR. Based on this report, it

a reportes previos (18, 23) mostrando que la distribución viral no se encuentra afectada por la edad o el sexo de los animales. En contraste con otros estudios (19), en el presente se demuestra la presencia de genoma viral para EHV-1 y EHV-4 en muestras seronegativas. Este hallazgo sugiere que los resultados serológicos no son un indicativo del estado de la enfermedad ya que algunos caballos con infección latente no producen anticuerpos (24). Otra posibilidad es que los caballos evaluados por ELISA se hayan infectado recientemente con EHV-1 y EHV-4 y no han alcanzado a desarrollar una respuesta de anticuerpos detectable.

Para la detección molecular de EHV-1 y EHV-4, las muestras recomendadas son células del tracto respiratorio, suero, tejido de nódulos linfáticos y células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) (11, 25), donde los virus infecciosos pueden replicarse. Para la detección de virus latente, el ganglio trigémino y PBMC son los tejidos recomendados con el fin de detectar marcadores de latencia (LATs) (26, 27, 28). En este estudio, el DNA de EHV-1 y EHV-4 se detectó a partir de nódulos linfáticos submandibulares y ganglio trigémino, encontrándose que el porcentaje de detección del genoma viral para EHV-1 en nódulos linfáticos submandibulares fue mayor comparado con TG, como fue reportado por Dunowska et al, 2015 (9). En el caso de EHV-4, se encontró más DNA viral a partir de TG, como también ha sido reportado previamente (18).

De acuerdo con estudios previos (16, 27), quienes reportan una latencia de 40 y 45% para EHV-1 y EHV-4 respectivamente; nuestro estudio encontró LATs en 45% de los caballos infectados. Sin embargo, existen discrepancias entre los estudios sobre el sitio de latencia para EHV-1 y EHV-4 (9, 27); específicamente, EHV-1 ha sido reportado que establece mayor latencia en tejidos linfoides que en tejido nervioso. En este estudio, los LATs para EHV-1 se encontraron únicamente en nódulos linfáticos submandibulares, mientras que los LATs para EHV-4 se encontraron en ganglio trigémino. Varios estudios han mostrado que la técnica empleada para la detección puede influenciar la capacidad de detección de los caballos en latencia, particularmente cuando se emplea PCR convencional (9). Allen et al 2008 (16), estimó la prevalencia de la latencia para EHV-1 empleando detección a base de perlas magnéticas, secuencia de captura, y PCR anidada, encontrando cerca de un 30% más de prevalencia comparado con PCR convencional. Basados en este reporte, es probable que en nuestro estudio el número de caballos en fase de latencia esté subestimado.

is probable that in our study the number of horses in the latency phase is underestimated. It should be noted that herpesviruses produce latent infection, which reactivates under stress conditions (22, 28). In the case of the population evaluated in this study, it should be noted that it was subjected to severe stress generated by long travel distances, extreme temperature changes, lack of food and overcrowding; these factors could activate viral replication (29). These particular study factors could indicate that the detection of LATs in TG and SNL cells demonstrate a latent form of infection coincident with the reactivation of active infection. For this reason, it is impossible to demonstrate the absence of an active EHV-1 and EHV-4 infection based solely on the detection of LATs, making it necessary to simultaneously include other diagnostic tests, such as the detection of mRNA encoding one of the viral glycoproteins, particularly if stress events are coincident with sampling.

With the techniques used in the present study, eight possible combinations of results were found (i.e., horses testing positive to genome detection in both studied tissues, but negative to ELISA or vice versa). These combinations clearly showed how a single diagnostic test is not sufficient enough to establish the status of a farm or even determine if the horse is under acute or latent infection. In addition, we found that horses seropositive for both herpesviruses also harbored the two viral genomes; this co-infection data is in agreement with previous reports (24, 30). It is important to keep in mind that a seronegative horse is not indicative of viral absence, since it could have a latent infection. For this reason, it is important to add to serology the molecular detection of the viral genome and to demonstrate the presence or absence of LATs, which could help to establish a real status of the disease.

In conclusion there is still limited information concerning the presence and the prevalence of EHV-1 and EHV-4 in Colombia. However, the current study not only validated the endemic nature EHV-4, but also highlighted the circulation of EHV-1 with no evidence of prior immunization. Furthermore, although this study did not differentiate between active and latent EHV-1 and EHV-4 infection, the evidence of LATs and the presence on viral DNA in the same sample could be indicating a status of the disease.

Se debe notar que los herpesvirus producen infección latente, la que se reactiva bajo la acción de condiciones de estrés (23, 28). Para el caso de la población evaluada en este estudio, se debe señalar que fue sometida a un estrés severo generado por viajes de larga distancia, cambios extremos de temperatura, falta de alimentación y hacinamiento; estos factores pueden activar la replicación viral (29). Estos factores particulares del estudio podrían indicar que la detección de LATs en TG y en células de SNL demuestran una forma latente de infección coincidente con la reactivación de la infección activa. Por esta razón, es imposible demostrar la ausencia de una infección activa con EHV-1 y EHV-4 basados únicamente en la detección de LATs, haciendo necesario incluir simultáneamente otras pruebas de diagnóstico, tales como la detección de mRNA que codifica una de las glicoproteínas víricas, especialmente si los eventos de estrés coinciden con el muestreo.

Con las técnicas utilizadas en el presente estudio, se encontraron ocho posibles combinaciones de resultados (p ej. caballos positivos para la detección del genoma en ambos tejidos estudiados, pero negativos para ELISA o viceversa). Estas combinaciones demostraron claramente que una sola prueba diagnóstica no es suficiente para establecer el estado de una granja o incluso para determinar si el caballo está bajo infección aguda o latente. Además, se encontró que los caballos seropositivos para ambos herpesvirus también pueden albergar los dos genomas virales; estos datos de co-infección están de acuerdo con reportes previos (24,30). Es importante tener en cuenta que un caballo seronegativo no es indicativo de ausencia de contacto con el virus, ya que podría tener una infección latente. Por esta razón, es importante añadir a la serología la detección molecular del genoma viral y demostrar la presencia o ausencia de LATs, lo que podría ayudar a establecer un estado real de la enfermedad.

En conclusión todavía hay información limitada sobre la presencia y prevalencia de EHV-1 y EHV-4 en Colombia. Sin embargo, el presente estudio no sólo validó la naturaleza endémica de EHV-4, sino que demuestra la circulación de EHV-1 sin evidencia de inmunización previa. Además, aunque este estudio no diferenció entre la infección activa y latente para EHV-1 y EHV-4, la evidencia de los LATs y la presencia de ADN viral simultáneamente en la misma muestra podría estar indicando un estado particular de la enfermedad.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Universidad Nacional de Colombia, Dirección de Investigación de Bogotá (DIB) for financial support; the Equine Slaughterhouse Los Cristales for providing the horses samples, and Cesar Diaz MV, MSc from the Universidad de la Salle, Bogotá, for his collaboration in the dissection of the trigeminal ganglion samples.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, Dirección de Investigación de Bogotá (DIB) por el soporte financiero; a la planta de sacrificio equino Los Cristales por proveer las muestras de los caballos, y a Cesar Díaz MV, MSc de la Universidad de la Salle, Bogotá, por su colaboración en la disección de las muestras de ganglio trigémino.

REFERENCES

- Patel JR, Heldens J. Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Vet J.* 2005; 170(1):14-23.
- Ma G, Azab W, Osterrieder N. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) - Masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol.* 2013; 167(1-2):123-134.
- Telford E, Watson M, Perry J, Cullinane A, Davison A. The DNA sequence of equine Herpesvirus-4. *J Gen Virol.* 1998; 79(5):1197-1203.
- Osterrieder N, Van de Walle G. Pathogenic potential of equine alphaherpesvirus: The importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet Microbiol.* 2010; 143(1):21-28.
- Goodman L, Loregian A, Perkins G, Nugent J, Buckles E, Mercorelli B et al. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *Plos pathogens.* 2007; 3(11):1583-1592.
- Borchers K, Wolfinger U, Lawrenz B, Schellenbach A, Ludwing H. Equine Herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in situ PCR. *J Gen Virol.* 1997; 78(5):1109-1114.
- Baxi M, Efstathion S, Lawrence G, Whalley J, Slater J, Field H. The detection of latency associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J Gen Virol.* 1995; 76(12):3113-3118.
- Arthur J, Scarpini C, Connor V, Lachmann R, Tolkovsky A, Efstathiou S. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol.* 2001; 75(8):3885-3895.
- Dunowska M, Gopakumar G, Perrot M, Kendall A, Waropastrakul S, Hartley C, et al. Virological and serological investigation of Equid herpesvirus 1 infection in New Zealand. *Vet Microbiol.* 2015; 176(3):219-228.
- Borchers K, Wolfinger U, Ludwing H. Latency -associated transcripts of equine Herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. *J Gen Virol.* 1999; 80(8):2165-2171.
- Pusterla N, Wilson D, Madigan J, Ferraro G. Equine Herpesvirus 1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. *Vet J.* 2009; 180(3):279-289.
- Hartley C, Wilks C, Studdert M, Gilkerson J. Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am J Vet Res.* 2005; 66(5):921-928.
- Daillo I, Hewitson G, Wright L, Kelly M, Rodwell B, Corney B. Multiplex real time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet Microbiol.* 2007; 123(1):93-103.

14. Pusterla N, Wilson D, Mapes S, Finno C, Isbell D, Arthur R, Ferraro G. 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.* 2009; 179(2):230-239.
15. Lunn D, Davis N, Flaminio M, Horohov D, Osterrieder K, Pusterla N, et al. EHV-1 Consensus statement. *J Vet Intern Med.* 2009; 23(3):450-461.
16. Allen G, Bolin D, Bryant U, Carter C, Giles R, Harrison L et al. Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus 1 in the thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine Vet J.* 2008; 40(2):105-110.
17. Cano A, Galosi C, Ocampos G, Ramirez G, Vera V, Villamil L, Chaparro J. Equine herpesvirus 1: Characterisation of the first strain isolated in Colombia. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2008; 27(3):893-897.
18. Ruíz J, Góez Y, López A. Equine herpesvirus 1 and 4 DNA detection in peripheral blood mononuclear cells and trigeminal ganglion of equines: Infection, latency and approximation to neuropathogenesis of the strain. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008; 21(3):372-386.
19. Ruíz J, Góez Y, Urcuqui S, Góngora A, López A. Serologic evidence of equine herpesvirus 1 and 4 infection in two regions of Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; 21(2):251-258.
20. Borchers K, Slater J. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods.* 1993; 45:331-336.
21. Telford E, Watson M, McBride K, Davison A. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology.* 1992; 189(1):304-316.
22. Telford E, Watson M, Perry J, Cullinane A, Davison A. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J Gen Virol.* 1998; 79(5):1197-1203.
23. Rios P, Benito A, Rivera H. Rinoneumonitis Equina en caballos del valle de Lima. *Rev Investig Vet Peru.* 2002; 13(2):1609-9117.
24. Ataseven V, Dagalp S, Guzel M, Basaran Z, Tan M, Geraghty B. 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.* 2009; 86(2):339-344.
25. Fortier G, Erk E, Fortier C, Richard E, Potier D, Pronost S, et al. Herpesviruses in respiratory liquids of horses: Putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Vet Microbiol.* 2009; 139(1):34-41.
26. Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn D, Ashton L, Callan R, Hussey S et al. Equine herpesvirus -1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet Microbiol.* 2011; 149(1):40-47.
27. Chesters P, Allsop R, Purewal A, Edington N. Detection of latency associated transcripts of equid Herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol.* 1997; 71(5):3437-3443.
28. Slater J, Borchers K, Thackray AM, Field HJ. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol.* 1994; 75(8):2007-2016.
29. Carlson J, Traub J, Lunn D, Morley P, Kohler A, Kasper K et al. Equine viral respiratory pathogen surveillance at horse shows and sales. *J Equine Vet Sci.* 2013; 33(4):229-237.
30. Taouji S, Collobert C, Gicquel B, Saileau C, Brisseau N et al. Detection and isolation of equine herpesviruses 1 and 4 from horses in Normandy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002; 49(8):394-399.