



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos magistrantė

Rasa KIRKAITĖ

Baigiamasis magistro darbas

**Galvijų infekcinio rinotracheito (galvijų I tipo herpes viruso) analizė
imunologiniais metodais**

Darbo vadovė

Dr. Ingrida Jacevičienė

Vilnius 2019

**Galvijų infekcinio rinotracheito (galvijų I tipo herpes viruso) analizė
imunologiniais metodais**

Darbas atliktas Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Virusologinių
tyrimų skyriuje

Rasa KIRKAITĖ

/Parašas/

Darbo vadovė:

Dr. Ingrida JACEVIČIENĖ

/Parašas/

TURINYS

Santrumpos.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Galvijų I tipo herpes virusas.....	7
1.1.1. Istorinis kelias.....	8
1.1.2. Genomo struktūra.....	9
1.1.3. Viriono struktūra.....	11
1.1.4. Replikacinis ciklas šeimininko ląstelėje.....	11
1.1.5. Patogenezė.....	14
1.1.6. Imuninis atsakas ir imuninės sistemos apėjimo strategijos.....	16
1.2. Diagnozavimas.....	18
1.2.1. Serologiniai tyrimai – ELISA, SNT.....	20
1.2.2. Molekulinės diagnostikos tyrimai – PGR.....	22
1.3. Vakcinos.....	24
1.3.1. Žymėtos (angl. <i>marker</i>) vakcinos.....	24
1.3.2. Naujų vakcinų kūrimas, tyrimai.....	26
1.4. Kontrolė ir likvidavimas.....	26
1.4.1. Bandos lygio kontrolė.....	27
1.4.2. Nacionalinio lygio kontrolė.....	28
1.4.3. Tarptautinio lygio kontrolė.....	30
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	31
2.1. Medžiagos.....	31
2.2. Metodai.....	32
2.2.1. Imunofermentinė analizė.....	32
2.2.2. Duomenų analizė.....	39
3. REZULTATAI.....	40
3.1. Dviejų skirtingų gamintojų – X ir Y – komercinių imunofermentinės analizės rinkinių palyginimas.....	40
3.2. Aktualumas.....	43
3.3. Sergamumas.....	44
3.4. Pasiskirstymas pagal lytį.....	46
3.5. Pasiskirstymas pagal amžių.....	48
3.6. Pasiskirstymas pagal metų laikus.....	51
3.7. Pasiskirstymas pagal veislę.....	54
3.8. Pasiskirstymas pagal rajonus.....	59
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	65
IŠVADOS.....	70
Santrauka.....	71
Summary.....	72
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	73

Santrumpos

GHV-1 – galvijų I tipo herpes virusas.

GIRT – galvijų infekcinis rinotracheitas.

IPB – infekcinis pustulinis balanopostitas.

IPV – infekcinis pustulinis vulvovaginitas.

g – glikoproteinas.

Ig – imunoglobulinas.

IFA (angl. ELISA) – imunofermentinė analizė.

NMVRVI – Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas.

GP3 – galvijų paragripas 3.

DIVA – infekuotų gyvūnų atskyrimas nuo vakcinuotų (angl. *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*).

SNT – serumo neutralizacijos testas.

OIE – Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacija.

IFN – interferonas.

NK – natūralūs kileriai.

OT – optinis tankis.

ĮVADAS

Galvijų I tipo herpes virusas (GHV-1), infekcinio galvijų rinotracheito sukėlėjas, yra gerai ištirtas patogenas. Liga labai išplitusi JAV, Kanadoje, Pietų Afrikoje, Naujojoje Zelandijoje, daugelyje Europos šalių [1]. Šia liga galvijai serga ir Lietuvoje. Užsikrėtus gyvūnui, priklausomai nuo konkrečių infekcijos sąlygų, gali atsirasti įvairių simptomų, įskaitant kvėpavimo ir nervų sistemos pažeidimus. Be to, GHV-1 karvėms, telyčioms gali sukelti infekcinio pustulinio vulvovaginito (IPV) infekcijas, o jaučiams – pustulinio balanopostito (IPB) infekcijas, taip pat lemti padidėjusį abortų skaičių [2]. GHV-1 gali būti perduodamas įvairiais būdais, įskaitant per nosies išskyras (virusas išsiskiria jau pirmomis dienomis pasirodžius klinikiniams požymiams), spermą (virusas gali išsiskirti su sperma iki 6 mėnesių) ir aerosolinį perdavimą [3–5]. Tikimybė užsikrėsti GHV-1 yra padidėjusi aplinkoje, kurioje gausu pašarų. Mechanškai virusą gali pernešti jam nejautrūs gyvūnai – paukščiai, vabzdžiai. Inkubacinis laikotarpis – 2–12 d. (kartais iki 40 d.). Infekcijos šaltinis – ne tik sergantys gyvūnai, bet ir 2–4 savaitžių rekonvalescentai. GHV-1 gali sukelti problemingą situaciją dėl gebėjimo pereiti į latencijos fazę savo šeimininko kūne – tai reiškia, kad tariamai sveikas gyvūnas gali sirgti ir platinti virusą [1].

Nors GHV-1 infekcija paprastai nėra mirtina (mirtingumas nuo jos siekia 15–18 proc.), visus sergančius gyvūnus rekomenduojama skersti. Jei infekcija nesuvaldoma, ji gali paplisti visoje bandoje ir sukelti didelių ekonominių nuostolių, patiriamų dėl kritimų, abortų, išsivysčiusio karvių bergždumo, blogo prieauglio vystymosi, sumažėjusios kūno masės, blogos pieno gamybos (pieningumas krinta 50–60 proc.) ir gydymo išlaidų. GHV-1 infekcija taip pat yra vienas iš daugelio veiksnių, galinčių sukelti galvijų kvėpavimo takų ligas.

Nustatyta, kad ekonomiškai palankiausias būdas naikinti GHV-1 yra taikyti skiepijimo programą ir taip sustabdyti GHV-1 plitimą [6–8]. Lietuvos galvijų ūkiuose naudojamos žymėtos vakcinos nuo GHV-1, t. y. modifikuotos gyvo susilpninto viruso su gE delecija vakcinos. Šios vakcinos taip pat leidžia atskirti vakcinuotus galvijus nuo užsikrėtusių lauko virusu. Imunitetas susidaro praėjus 14–21 dienai nuo pradinės vakcinacijos programos ir išlieka 6 mėnesius (kaip ir persirgusiems), vėliau rekomenduojama kas 6 mėnesius skirti palaikomąją dozę.

Galvijų rinotracheito atveju kovos su liga programa daugiausia susideda iš serologinio galvijų tyrimo ir užsikrėtusių galvijų šalinimo (srityse, kur liga paplitusi nežymiai ar vidutiniškai) [9]. Todėl labai svarbu pasirinkti tinkamus tyrimo metodus bei priemones, taip pat stebėti ir analizuoti viruso paplitimo ypatybes.

Darbo tikslas:

Ištirti ir išanalizuoti galvijų infekcinio rinotracheito antikūnus kraujo/serumo ėminiuose naudojant dviejų skirtingų gamintojų imunofermentinės analizės rinkinius.

Uždaviniai:

1. Atlikti ir įvertinti specifinius galvijų I tipo herpes viruso padermės antikūnus vakcinuotų ir nevakcinuotų galvijų kraujo ėminiuose naudojant imunofermentinės analizės metodą.
2. Atlikti galvijų specifinių I tipo herpes viruso serologinių duomenų analizę pagal jų lytį, amžių, veislę, regioną, metų laikus.
3. Palyginti dviejų skirtingų gamintojų X ir Y komercinius imunofermentinės analizės rinkinius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Galvijų I tipo herpes virusas

GHV-1 priklauso *Alphaherpesviridae* pošeimio *Varicella* genčiai (1.1 lentelė) ir yra giminingas pseudopasiutligės virusui, arklių I tipo herpes virusui ir žmogaus III tipo herpes virusui (*varicella-zoster* virusui). GHV-1 turi tipišką *Alphaherpesviridae* struktūrą ir D tipo genomą, kuris apibūdintas skyriuose 1.1.2 ir 1.1.3. Jo pagrindiniai šeimininkai (užkrėstieji) yra galvijai, tačiau manoma, kad jis gali sukelti infekciją ir kitoms rūšims [10, 11]. Avių ir ožkų simptomai yra lengvi, būdingas aukštas GHV-1 išsiskyrimo lygis per kelias dienas pirminės infekcijos metu ir serologinis atsakas. Latentinė fazė pasireiškė po eksperimentinės infekcijos [10]. Per eksperimentą nustatyta, kad GHV-1 gali paveikti tauriuosius elnius ir šiaurės elnius, tačiau išskirto viruso titrai buvo labai maži, todėl nuspręsta, kad mažai tikėtina, jog galėtų sukelti tolesnį viruso plitimą [10, 11]. Nėra jokių pranešimų apie tai, kad GHV-1 galėtų sukelti infekciją žmogui. Kol kas nėra tvirtų įrodymų, kad žmogaus ląstelės gali palaikyti GHV-1 replikaciją. Tyrimai *in vitro* ląstelių kultūroje rodo, kad GHV-1 gali silpnai prisijungti prie žmogaus HveC (nektino-1) arba žmogaus polioviruso receptoriaus, nors viruso replikacija nėra pastebima [12, 13]. Naujausias tyrimas parodė, kad GHV-1 galima užkrėsti žmogaus neuroblastomos ląstelių liniją SH-SY5Y [14]. Taip pat atliekami tyrimai nustatyti GHV-1 poveikį žmogaus vėžinėms ląstelėms [15].

1.1 lentelė. GHV-1 klasifikacija [16].

Galvijų I tipo herpes virusas	
Pagal Baltimorės klasifikaciją	I grupė: dvigrandis DNR virusas
Aukštesnės skirstymo kategorijos	
Eilė	<i>Herpesvirales</i>
Šeima	<i>Herpesviridae</i>
Pošeimis	<i>Alphaherpesviridae</i>
Gentis	<i>Varicellovirus</i>

Remiantis restrikcijos endonukleazės analizės rezultatais, GHV-1 izoliatus galima suskirstyti į 3 potipius. GHV-1 tipo 1 izoliatai (GHV-1.1) dažniausiai yra susiję su kvėpavimo takų ligomis, todėl dar kartais vadinami GIRT (galvijų infekcinio rinotracheito) virusu, taip pat gali sukelti abortą ir sisteminę infekciją. Antroji virusų grupė vadinama GHV-1.2 – šią grupę galima suskirstyti į GHV-1.2a ir GHV-1.2b. GHV-1.2a paprastai yra susijusi su venerine infekcija ir karvėms sukelia infekcinio pustulinio vulvovaginito (IPV) infekcijas, o jaučiams – infekcinio pustulinio balanopostito (IPB) infekcijas, taip pat yra išskirtas iš abortų

atvejų. GHV-1.2b taip pat yra siejamas su genitalinėmis ligomis, bet nėra rastas aborto atvejais. Šie subtipų skirtumai nėra absoliutūs [5, 17–19]. Didžioji dalis protrūkių siejama su GHV-1.1, sukeliančiu kvėpavimo takų ligas [20]. Nors potipiai paprastai siejami su skirtingais infekcijos keliais, visi 3 potipiai gali sukelti ir kvėpavimo takų, ir lytinių organų infekcijas [21]. Istorškai galvijų V tipo herpes virusas (GHV-5) buvo iš pradžių išskirtas kaip potipis GHV-1.3 su neuropatogeninėmis ypatybėmis, tik vėliau buvo perklasifikuotas kaip GHV-5 [11].

1.1.1. Istorinis kelias

Pirmasis pranešimas apie ligą, kuri, kaip manoma, buvo susijusi su galvijų I tipo herpes virusu (GHV-1), pasirodė Vokietijoje XIX amžiuje. Jame virusas buvo apibūdintas kaip *Bläschenausschlag* arba sueities vezikulinė egzantema (angl. *coital vesicular exanthema* – CVE). 1928 m. buvo nustatyta, kad ši venerinė liga turi virusinę etiologiją, kai buvo įrodyta, kad ji gali būti perduodama filtruojama medžiaga (*agent*) [5, 20]. Vėliau, iki 1950 m., pagrindinis pripažintas GHV-1 infekcijos požymis išliko CVE, dažniau vadinamas karvių ir telyčių infekciniu pustuliniu vulvovaginitu (IPV) ir jaučių/bulių infekciniu pustuliniu balanopostitu (IPB) [20].

1950 m. rudenį JAV Kolorado valstijoje [22] ligai buvo būdingas didelis karščiavimas ir ūminis uždegimas, paveikęs viršutinius kvėpavimo takus iki pat bronchų. Pastebėta, kad šie simptomai būdingi tik brandaus amžiaus gyvūnams. 1954 m. pripažinta, kad ši liga būdinga ir veršeliams, jaunesniems nei 3 savaičių amžiaus, taip pat pasireiškė epizootine forma pieninėse bandose. Klinikiniai požymiai vėl buvo panašūs į atvejų, aprašytų indekso byloje [20, 22]. Smarkiai sumažėjo pieno, kai kuriems gyvūnams jo buvo mažiau 5–7 paras, atsirado pokyčių virškinimo trakte: gleivinės opos ketvirtame skrandžio skilvelyje, sunkus enteritas plonojoje žarnoje ir lengvas uždegimas storajoje žarnoje. Skirtingai nuo indikacinio atvejo, kai kuriais atvejais buvo pranešta apie simptomus, susijusius su skrandžio išopėjimu [20].

1954 m. buvo aprašyta nauja klinikinė būklė, paveikusi pienines bandas Los Andzele, Kalifornijoje [22]. Užfiksuoti būdingi simptomai buvo didelis karščiavimas (38,9–42,2 °C) ir staigus pieno kiekio sumažėjimas, daugeliu atvejų jo visiškai nelikdavo per 24–48 valandas. Paprastai pasireiškė per didelis seilėjimasis, nosies, šnervių gleivinės buvo padengtos išskyromis, pūlingomis gleivėmis. Šiai ligai buvo būdingas trumpas stiprus kosulys. Sergamumas bandose siekė 7,6 proc., o krisdavo 3 proc. užsikrėtusių galvijų. Dauguma užsikrėtusių gyvūnų pasveiko gana greitai, ūminė fazė paprastai praeidavo per mėnesį. Atliekant tyrimą, nustatyta, kad labiausiai pastebimas ir būdingiausias pažeidimas – sunkus hemoraginis tracheitas ir bronchitas. Taip pat pasireiškė sunkus plonųjų žarnų

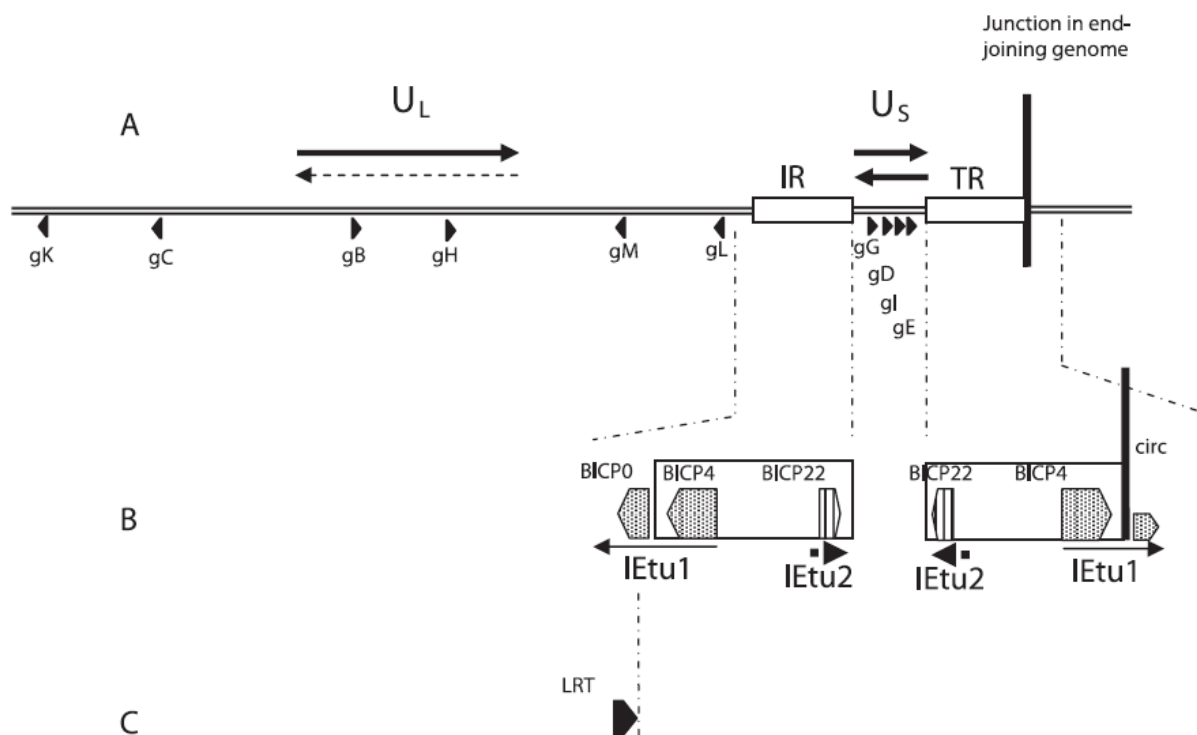
enteritas ir storosios žarnos gleivinės kolitas. Buvo manoma, kad etiologija yra virusinė, ir dabar ši ataskaita laikoma pirmuoju recenzuojamu galvijų infekcinio rinotracheito (GIRT) aprašymu [20]. 1955 m. buvo paskelbta ataskaita [20, 23], kurioje aprašoma kvėpavimo takų liga, kuria susirgo atvesti veršeliai ir pieninės karvės. Ji pavadinta infekciniu nekrozinu rinotracheitu. Šioje ataskaitoje pirmą kartą pavartota sąvoka „raudona nosis“, susiejant su šia liga ir atkreipiant dėmesį į žymų nosies gleivinės uždegimą bei ligos perdavimą su kvėpavimo takų išskyromis.

Pagal randamus duomenis, Lietuvoje tik 1993 m. pradėtas GHV-1 tyrimas, daugiausia dėmesio buvo skirta užkrėstų spermos donorų bandoms ir buliams naikinti. 1997 m. buvo pasiektas tikslas – nebeliko užkrėstos spermos serijų veislininkystės įmonėse. Iki 2010 m. pabaigos buvo vykdoma kontrolė, GHV-1 stebėjimas, pritaikomos žymėtos vakcinos. Buvo nustatytas didelis vakcinų efektyvumas, tiriamuose vakcinuotuose ūkiuose nebuvo aptikta naujų ligos atvejų [24].

1.1.2. Genomo struktūra

Kaip ir kiti herpes virusai, GHV-1 turi palyginti ilgą dvigubą DNR genomą. Nors supakuojamas linija, jis, kaip manoma, virsta žiediniu per infekcinį ciklą prieš genomo replikaciją [25]. Jis yra 135,300 bazinių porų ilgio, turi 72 proc. guanino/citozino kiekį ir 73 atvirus skaitymo rėmelius (ORF) [5]. Iš šių 73 ORF 33 buvo nustatyti kaip būtini viruso replikacijai [26]. Dauguma viruso genų turi homologinius analogus, bendrus visiems alfa herpes virusams, nors kai kurie jų yra išskirtiniai *Varicelovirusams*. Tik vienas iš šių genų (UL0.5) būdingas tik GHV-1 [5].

GHV-1 turi D klasės herpeso viruso genomą, o tai reiškia, kad jo genome yra du unikalūs regionai: vienas ilgas ir vienas trumpas (UL ir US). Šie regionai yra atskirti vidiniu pakartojimo regionu, kuris yra invertuota seka, randama terminaliniame pakartotiniame regione, US pabaigoje (1.1A pav.) [5, 11]. Abu šie unikalūs regionai gali būti invertuoti, o tai reiškia, kad iš tiesų yra 4 herpeso viruso genomo izomerinės formos, kurias galima rasti GHV-1 virione. Iš tiesų viena konkreti UL orientacija yra stipriai pageidautina, todėl aplinkoje paprastai randamos tik 2 izomerinės genomo formos (viena atitinka kiekvieną US inversiją). Šios invertuotos sekos gali būti susijusios su rekombinacija genomo replikacijos metu [5].



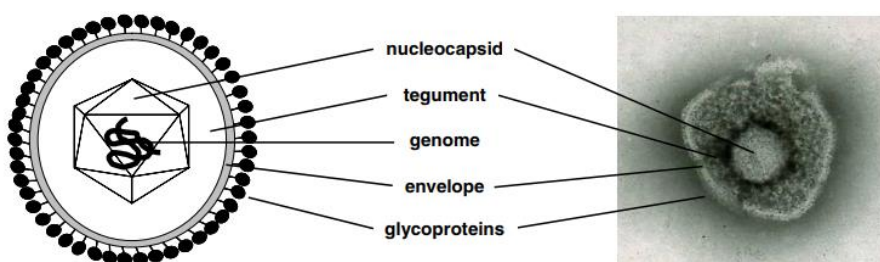
1.1 pav. (A) GHV-1 geno struktūra, įskaitant dvi unikalias sekas – ilgąją (U_L) ir trumpąją (U_S). Pastarąją papildo dvi pakartotinės ir apverstosios (invertuotosios) sekos (vidinis pakartojimas, IR (angl. *internal repeat*); terminalinis pakartojimas, TR (angl. *terminal repeat*). DNR replikacija generuoja dviejų pagrindinių izomerų ekvimolinius kiekius, kurie skiriasi pagal santykinę U_S ir U_L segmentų orientaciją (horizontalios paprastosios rodyklės); pastarasis yra daugiausia pastebimas vienoje orientacijoje. Tačiau mažas geno kiekis su apverstu L segmentu yra pastebimas GHV-1 virionuose (horizontaliai brūkšniuota rodyklė). 10 genų, koduojančių GHV-1 glikoproteinus, vieta žymima juodomis rodyklių galvomis. Vertikali juoda juosta nurodo sandūrą, pastebimą po geno cirkularizacijos. (B) Scheminis vaizdavimas dviejų tiesioginių ankstyvųjų transkripcijos vienetų (IETu-1 ir IETu-2), kurių promotoriai yra lokalizuoti IR ir TR. IETu-1 promotoriaus, esančio IR, aktyvinimas veda prie BICP4 ir BICP0 genų transkripcijos, o TR, esančio IETu-1, promotoriaus aktyvavimas veda prie BICP4 ir cirkularizacijos genų transkripcijos. IETu-2 promotoriaus aktyvacija veda prie BICP22 geno transkripcijos. (C) Lokalizacija GHV-1 regiono, kuris yra aktyviai transkribuojamas latencijos metu, atsirandant su latencija susijusiam transkriptui (LRT) [5].

Dauguma GHV-1 genų turi dublikatų HSV-1 (*herpes simplex virusas*), todėl jie buvo pavadinti pagal homologus. Tačiau buvo nustatyti ir nauji genai, įskaitant UL0.5, UL0.7, UL3.5, circ ir US 1.67, kurie neturi homologų HSV-1. Mažiausiai 10 genų koduoja glikoproteinus, kurie yra dalis viriono voko ir todėl daugiausia susiję su pradine sąveika su šeimininko ląstelėmis, taip pat su šeimininko imuniniu atsaku. Yra keletas fermentų, svarbių geno replikacijai, įskaitant ribonukleotidų reduktazę, timidino kinazę, dUTPazę ir DNR polimerazę. Kiti baltymai yra susiję su viriono surinkimu, struktūra ir apvalkalo baltymais. Paskutinė genų grupė yra reguliavimo genai, kurie kontroliuoja tiek lytinę, tiek latentinę replikaciją [5, 11, 27]. Tam tikruose tyrimuose buvo sutelktas dėmesys į tai, ar genai būtini, ar nebūtini replikacijai ląstelių kultūroje [26]. GHV-1 genų tyrimas nustatė 33 esminius ir 36 nebūtinius genus [26].

Virusinės replikacijos lytinė fazė apima daugelį reguliavimo genų per laikiną genų ekspresijos pakopinį procesą [28, 29]. Jis pradamas aktyvuojant tiesioginius ankstyvuosius genus, pirmoji iš laikinai kontroliuojamų genų ekspresijos fazių, kuri yra daugiausia siejama su genų reguliavimu, o vėliau – ankstyvojo ir vėlyvojo geno ekspresijos fazės [5, 26]. Be genų ekspresijos, standartinės kaskados lytinėje viruso fazėje buvo aptikta mikroRNR, koduojama ir išreiškiama GHV-1 infekcijos metu. Neseniai atliktas tyrimas parodė, kad iš 10 mikroRNR, koduotų GHV-1 genomo, keturios iš jų yra randamos pakartotiniuose regionuose, ir todėl bendras skaičius gali būti laikomas 14 [30]. Kituose herpeso virusuose jie buvo nustatyti kaip galimai svarbūs pereinant tarp lytinės ir latentinės replikacijos [31].

1.1.3. Viriono struktūra

GHV-1 turi įprastą herpeso viruso viriono struktūrą: viruso dvigubos grandies DNR genomą dengia ikosaedrinė baltymo kapsidė. Kapsidė yra suvyniota į baltymų kompleksą, vadinamą voka-apvalkalą, kurio sudėtyje yra apie 20 virusinių baltymų [1, 32, 33]. Vokas-apvalkalas sujungia kapsidę su išoriniu ląstelių apvalkalu, kuriame yra viruso membranų baltymai ir glikoproteinai, būtini sėkmingam ląstelės membranos įsiskverbimui, įskaitant gD, gB, gH ir gL glikoproteinus [5, 34].



1.2 pav. Alfa herpes viruso struktūra¹⁰.

DNR genomą yra maždaug 140 kilobazių porų. Nukleokapsidę sudaro 162 kapsomerai: 150 heksamerų ir 12 pentamerų. Kapsomerai yra daugiakampiai; kiekvienas kapsomeras yra maždaug 12 nm ilgio, 11,5 nm pločio, su ašine 3,5 nm skylė. DNR yra apvyniota aplink pluoštinę šaukštą primenančią šerdį, kurios pluoštai yra pritvirtinti prie vidinės supančios kapsidės pusės [34–36]. Virionas yra pleomorfinis, jo skersmuo varijuoja nuo 120 iki 200 nm. Manoma, kad virionas turi apie 70 baltymų [34, 35].

1.1.4. Replikacinis ciklas šeiminko ląstelėje

GHV-1 virionas skverbiasi į ląstelių membraną 3 etapais. Pirmasis etapas, kai viriono apvalkalo glikoproteinai gB ir gC sąveikauja su tam tikromis ląstelių struktūromis (tokiomis, kaip heparano sulfato, esančio daugelio ląstelių paviršiuje), sukurdami nedidelę trauką tarp viruso ir ląstelės šeiminko [37–41]. Antrasis etapas, kai glikoproteinas gD stabiliai prisijungia prie ląstelės membranos baltymo nectin-1 (imunoglobulino baltymo), kol kas

nustatyta, kad tik šis receptorius padeda patekti GHV-1 [12, 42]. Tai lemia trečiąjį etapą, per kurį viriono apvalkalas suauga su ląstelės membrana. Šis labai svarbus procesas reikalauja bent jau keturių GHV-1 glikoproteinų dalyvavimo: gD [43, 44], gB [45] ir heterodimero, suformuoto gH ir gL [46]. Visi šie procesai suteikia galimybę kapsidei ir apvalkalui patekti į citoplazmą [5].

Kai virusas įeina į ląstelę šeimininkę, GHV-1 viruso dalelės turi būti transportuojamos, naudojant dineino motorinį kompleksą, susietą su mikrovamzdeliais, branduolio porų link, kad būtų galimas viruso DNR išlaisvinimas, išskyrimas. Šis įcentrinis citoplazminis transportavimas kartu su mikrovamzdeliais buvo parodytas HSV-1 (I tipo *herpes simplex* viruse) infekuotose ląstelėse ir yra greičiausiai išsaugotas alfa herpes virusuose [47]. Tačiau viruso baltymas(-ai), kuris(-ie) tarpininkauja šiame transportavimo procese, yra vis dar nežinomas(-i), bet tikimasi, kad tai bus virusinio apvalkalo baltymai arba pačios kapsidės paviršiaus komponentas(-ai) [48, 49].

Kol viruso dalelė yra transportuojama branduolio link, apvalkalo baltymai, apgaubiantys kapsidę, išsiskiria į infekuotos ląstelės citozolį. Ten jie, manoma, atlieka svarbų vaidmenį ankstyvoje viruso infekcijos fazėje, nes jie pirmieji susiduria ir sąveikauja su viduląsteline aplinka. VP8 yra gausiausias GHV-1 apvalkalo baltymas [50, 51]. Jis tuoj pat po infekcijos lokalizuojasi branduolyje dėl branduolio lokalizacijos signalo [52], tačiau tikslus VP8 vaidmuo viruso infekcijoje yra neaiškus. Nors daugelis šių apvalkalo baltymų yra vis dar prastai ištirti, kai kurie jų sutrikdo šeimininko gynybą arba ardo šeimininko resursus [53]. UL41 koduojamas apvalkalo baltymas yra žinomas kaip viriono šeimininko išjungimo (angl. *virion host shutoff* – VHS) GHV-1 baltymas. Išsaugotas ir kituose alfa herpes virusuose, jis sukelia greitą ląstelės šeimininkės baltymų sintezės išjungimą, sustabdymą [53, 54]. Kitas svarbus apvalkalo baltymas yra VP16 (viriono baltymas 16), žinomas kaip GHV-1 α -TIF (alfa genų transindukcinis faktorius (angl. *transinducing factor of alpha genes*). Jis yra atsakingas už GHV-1 geno ekspresijos iniciaciją (sukelia ankstyvųjų GHV-1 genų ekspresiją [5]), tai atlieka transaktyvuodamas GHV-1 tiesioginius ankstyvuosius (angl. *immediate early* – IE) genus (alfa genai). GHV-1 genų ekspresija yra laikinai reguliuojama infekcijos metu. Genų ekspresijos kaskada apima trijų genų ekspresijos kinetiką, iš eilės: IE, ankstyvoji (E) ir vėlyvoji (L) RNR [28]. Jie koduoja baltymus, daugiausia susijusius su viruso ciklo reguliacija, viruso DNR replikacija ir naujų virionų morfogeneze.

Kartu su geno ekspresijos iniciacija, manoma, GHV-1 genomai cirkuliarizuojasi, kai patenka į branduolį (pažeidžia branduolio membraną) [25, 55]. Šis konceptas (genomų jungimasis galais, žiedų formavimasis) paremtas ląstelių, užkrėstų kitais giminingais alfa herpes virusais (HSV-1 [5, 55], pseudopasiutligės virusu [56]), stebėjimais. IE geno

transkripcija yra inicijuojama VP16 kompleksu ir ląstelių baltymais; kompleksas prisijungia prie TAATGAGCT motyvo, esančio GHV-1 dviejų IE transkripcijos vienetų (IEtu-1 ir IEtu-2) promotorinėse sekose (1.1 pav.) [5, 57–60]. IEtu-1 koduoja BICP0, BICP4 [5, 61]. Žiedinis transkriptas atsiranda iš IEtu-1 promotoriaus aktyvacijos per cirkuliarizuoto genomo sandūrą ir yra išreikštas per visą viruso ciklą [5, 25, 59]. BICP0 nėra esminis, bet vaidina svarbų vaidmenį atsirandant infekcijai, nes aktyvuoja visus virusinius promoterius ir yra išskiriamas dideliu kiekiu per visą infekciją [54, 62]. IEtu-2 koduoja BICP22. Nors tikslūs galvijų IE baltymų veikimo mechanizmai iki galo nėra iširti, trys pagrindiniai IE baltymai – BICP0, BICP4 ir BICP22 – aktyvuoja E genų ekspresiją ir virusinės DNR replikaciją [61, 63, 64].

Spėjama, kad egzistuoja dvi replikacijos pradžios [65]. Nuo jų prasideda pirmasis teta replikacijos ciklas, kuriam kaip šablonas tarnauja žiedinis genomas [66]. Nežinomu mechanizmu teta dvikryptės replikacijos pakopa persijungia į riedančio rato tipo replikacijos režimą, kad būtų galima gauti konkatemerinę (angl. *concatemeric*) DNR, t. y. susidariusio žiedinio viruso genomo replikacija vyksta per riedančio rato mechanizmą, kuris generuoja daugybę naujai susintetintų DNR genomų, sujungtų vienas su kitu išdėstymu galva-uodega [5, 67]. Ši ilga DNR dalis yra suskaidoma į atskiras viruso genomo kopijas, kurios įkeliamos į naujai formuojamas viriono kapsides, nepaliekant branduolio [5].

Pirmoji vėlyvųjų genų ekspresijos banga (ankstyvieji vėlyvieji genai) pradedama DNR replikacijos metu, viruso genomo replikacijos pradžioje [5]. Antroji banga (tikrieji vėlyvieji genai) visiškai priklauso nuo DNR sintezės, šie genai koduoja kapsidę formuojančius struktūrinius baltymus [5]. Naujų palikuonių virusų sintezei yra reikalingi L genų koduojami struktūriniai komponentai. Herpeso viruso viriono surinkimas yra sudėtingas procesas. Iš pradžių kapsidės apvalkalo baltymai susirenka pastolių tarpininkavimo modeliu, kad suformuotų tarpinę dalelę branduolyje. Per brendimą vidiniai baltymų pastoliai yra suskaldomi ir išstumiami iš kapsidės vidaus, kai DNR genomas supakuojamas. Iš tiesų didelės molekulinės masės konkatemerai (angl. *concatemers*) yra suskaldomi į vieneto ilgio genomus sudėtingo mechanizmo būdu, kuris yra glaudžiai susietas su DNR įterpimu į iš anksto suformuotą kapsidės struktūrą. Daug virusų baltymų yra įtraukiami į šį skėlimo-pakavimo procesą [5, 67, 68].

Kaip viriono kapsidė išeina iš branduolio ir įgyja jo baltymus ir išorinį voką – diskutuotina. Pagal dabartinį požiūrį į tai, kaip alfa herpes virusai išeina ir brandinasi, pateikiamas trijų pakopų modelis [69–72]. Pagrindinė teorija teigia, kad subrendusi kapsidė, kurioje yra DNR, įgyja pirminį voką, kai ji išsipumpuoja iš vidinės branduolio membranos į perinuklearinę erdvę. Tuomet naujas pirminis vokas susilieja su išorine branduolio membrana tam, kad nuoga kapsidė būtų išleidžiama į citoplazmą. US3 koduojamas virusinės kinazės

aktyvumas yra reikalingas apsisiautimui pašalinti, kadangi GHV-1 US3 delecijos mutantai kaupiasi perinuklearinėje erdvėje. Patekusi į citoplazmą, nuoga kapsidė galutinai įgyja savo subrendusį apvalkalą ir antrinį voką, tikėtina, kad pumpuruojant į „trans“ Goldžio aparatą [69, 72]. Šis viriono brandinimo ir išėjimo modelis mėginamas paneigti dviem alternatyviais būdais. Pirmasis alternatyvus būdas apima pirminį voką vidinėje branduolio membranoje, po to transportavimą per endoplazminį tinklą ir Goldžio aparato sekrecijos kelią [73, 74]. Antrasis alternatyvus išėjimo būdas įtraukia branduolio porų išsiplėtimą, dėl kurių tiesiogiai kapsidės patenka į citoplazmą. Nuogos kapsidės įgyja voką, pumpuruodamos bet kurią ląstelės membraną [73, 74]. GHV-1 replikacinis ciklas vis dar reikalauja tolesnių tyrimų, kurie patvirtintų ar paneigtų iškeltas teorijas arba atrastų vis dar nežinomus mechanizmus.

1.1.5. Patogenezė

Galvijai labai dažnai laikomi itin perpildytomis, antisanitarinėmis sąlygomis, todėl GHV-1 gali lengvai plisti bandoje. Dažniausias GHV-1 infekcijos kelias yra tiesioginis apsikaitimas nosies išskyromis tarp infekuotų ir neinfekuotų individų; kiti horizontalaus perdavimo būdai apima lytinių organų kontaktą, infekuotos spermos perdavimą ir mažo atstumo aerozolinį perdavimą [3–5]. Virusas taip pat gali būti perduotas vertikaliai iš motinos veršeliui nėštumo metu [5]. Virusas nedelsdamas užkrečia naujojo šeimininko epitelio ląsteles kontaktinėje srityje, čia greitai prasideda viruso standartinis lytinis replikacijos ciklas. Jis atitinka nuoseklią virusų genų ekspresiją ir apima naujų virusų palikuonių gamybą ir ląstelių mirtį. GHV-1 citopatiniam efektui (CPE) būdingas ląstelės išburkimas ir vidubranduolinių intarpų pagausėjimas. Ląstelių mirtis prasideda ir dėl nekrozės, ir dėl apoptozės procesų, vykstančių GHV-1 replikacijos ciklo metu. Po dalyvavimo tiesioginiame CPE, GHV-1 taip pat gali sumažinti kvėpavimo takų epitelio atsinaujinimą, slopindamas naujų epitelio ląstelių migraciją į sužeistas vietas [5, 35].

GHV-1 infekcija būdinguose patekimo vartuose lemia masinę virusų gamybą. Nauji virusų palikuoniai yra išskiriami nosies gleivėse, esant dideliame ekskrecijos titrui, o tai lemia greitą infekcijos plitimą galvijų bandoje [5]. Nauji viruso palikuoniai taip pat plinta į užkrėstą gyvūną, naudojant vietinę sklaidą, atsiranda sisteminis viruso išplitimas viuremija ir galiausiai neuroinvasija [5, 27]. Du skirtingi būdai leidžia plisti naujoms GHV-1 kartoms užkrėstoje gleivinėje. Pirmia, virusai, išleisti į išorinę terpę, yra visiškai apgaubtos dalelės, galinčios sąveikauti su imlių ląstelių receptoriais. Antra, virusinės dalelės gali tiesiogiai plisti iš užkrėstų ląstelių į kaimynines neužkrėstas ląsteles (tiesioginis plitimas iš ląstelės į ląstelę) [5, 35].

Po išplitimo tame pačiame audinyje virusas gali keliauti užkrėsto šeimininko krauju, šis mechanizmas kol kas menkai suvokiamas, ir atliktų eksperimentų rezultatai

interpretuojami atsargiai [29, 75–79]. Viremija suteikia virusui prieigą prie daugelio šeiminių audinių ir organų – tai lemia didelę simptomų įvairovę [5], klinikinius padarinius, pavyzdžiui, abortus [80, 81] ar mirtiną sisteminę infekciją labai mažiems jaunikliams [5]. Be to, papildomai prie sisteminio išplitimo virusas taip pat gali kontaktuoti su nervų galūnėmis nosies gleivinės paviršiuje, per kurias infekcija plinta į centrinę nervų sistemą, t. y. jis yra transportuojamas tolyn aksonų mikrovamzdeliais, kad pasiektų neurono kūną nervų ganglijoje. GHV-1 paprastai užkrečia trišakio nervo galus, per kuriuos jis sukuria latentinę infekciją gangliniuose neuronuose [5]. GHV-1 buvo išskirtas iš galvijų, turinčių centrinės nervų sistemos sutrikimų [5, 82–84]. Taip pat buvo pastebėta, kad kai kuriais atvejais jie yra atsakingi už ūmaus meningoencefalito pasireiškimą suaugusiems galvijams [5, 82, 83]. Manoma, kad tikriausiai šie atsitiktiniai atvejai atspindi individualų šeiminių jautrumą CNS infekcijai, o ne GHV-1 kamieno modifikacijas, dėl kurių padidėjo neuroinvazija ir (arba) neurovirulencija, priešingai negu neuropatogeniškam GHV-5 kamienui [84, 85].

Po GHV-1 pirminės infekcijos galvijams tampa latentiniu nešėju. Kaip jau buvo užsiminta, GHV-1 sukuria visą gyvenimą trunkančią latentinę infekciją periferinės nervų sistemos sensoriniuose neuronuose po replikacijos gleivinės epitelyje. Nors pagrindinė latentinė vieta – ganglioniniai neuronai, yra įrodymų, kad latencija ir reaktyvacija pasitaiko ryklės tonzilių germaliniuose centruose (angl. *germinal centers of pharyngeal tonsils*) [86]. Latentiškai užsikrėtusiuose neuronuose tik GHV-1 regionas, kuriame yra išreikšiamas su latencija susijęs transkriptas (LRT) (1.1 pav.), slopina lytinį viruso ciklą ir indukuoja užkrėstų ląstelių antiapoptozinę būklę [87]. Šis pastebėjimas siūlo, kad DNR sekos su latencija susijusiam promotoriuje yra teigiamai reguliuojamos neuroninių ląstelių tipo veiksmų [5]. Su latencija susiję genai yra reikalingi GHV-1 latencijos-reaktyvacijos ciklui. LR genas apsaugo neuronus nuo ląstelių mirties latencijos įtvirtinimo metu. Ląstelių mirties slopinimas taip pat būtinas, kad palaikytų latenciją, išsaugant gyvus latentiškai užsikrėtusius neuronus. Šiuo metu nėra aiškaus mechanizmo, paaiškinančio LR geno vaidmenį reaktyvuojant ir (arba) išskiriant GHV-1. Pagal HSV (*herpes simplex* viruso) latentiškumo ir reaktyvacijos stebėjimus, manoma, kad imuninė sistema atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant GHV-1 latencijos-reaktyvacijos ciklą [88, 89]. Reaktyvacija gali įvykti po natūralaus stimulo [90, 91] ar gydymo kortikosteroidais [5, 92], baigiantis pasikartojančiu viruso perdavimu neinfekuotiems gyvūnams, paprastai be klinikinių ženklų. Po reaktyvavimosi trišakio gangliono neuronuose GHV-1 inicijuoja naują replikacijos ciklą [5]. Taigi net ir po to, kai gyvūnui nepastebimi infekcijos simptomai, latentinė infekcija gali būti pakartotinai suaktyvinta vėliau gyvenime, ir tuo metu gyvūnas vėl pradeda skleisti virusą [1].

1.1.6. Imuninis atsakas ir imuninės sistemos apėjimo strategijos

Dėl sparčios infekcijos eigos, kurią sukelia virusas, šeimininko imuninis atsakas turi veikti greitai; viruso antigeno ekspresija ląstelių paviršiuje pasireiškia per 2–4 valandas nuo jo patekimo. Tai yra pirminės infekcijos taškas, kai šeimininkas pradeda skatinti imuniteto atsaką. Virusų replikacija iš pradžių sukelia nespecifinį arba įgimtą imuninį atsaką, įskaitant infekuotų ląstelių komplemento aktyvaciją ir interferono- α bei interferono- β sekreciją. Buvo įrodyta, kad konkrečiai šis α ir β IFN aktyvumas slopina herpes viruso timidino kinazės aktyvumą [93]. Makrofagai, neutrofilai ir natūralių žudikų (NK) ląstelės (didelių granuliuotų limfocitų pavidalu) yra sutelkti ir aktyvuojami infekcijos vietoje, užkrėstame epitelyje vykdomas virusais užkrėstų ląstelių naikinimas po citokinų aktyvinimo. Tyrimai parodė, kad pagrindiniai NK ląstelių taikiniai yra viruso gB ir gD [94]. Šios ląstelės sukelia ankstyvą citokinų, tokių kaip IL-1 ir IL-6, bangą [5, 95]. IL-1 ir IL-6 stimuliuoja parenchimines ląsteles ir limfocitus gaminti GM-CSF, kuris savo ruožtu skatina makrofagus gaminti tokias molekules, kaip TNF- α [96].

Po šio pirmojo įgimtų mechanizmų atsako seka specifinis imuninis atsakas, kurį lemia antigeno atpažinimas, paprastai sutampantis su atsigavimu nuo klinikinių požymių. Antigeno pateikimas vyksta tiek MHC I ir MHC II klasių keliais. Ląstelių veikiamas atsakas yra gyvybiškai svarbus, kad būtų galima sustabdyti virusą, plintantį būdu ląstelė-ląstelė [97]. Šį etapą daugiausia skatina ir kontroliuoja Th1 specifinių citokinų gamyba – tai CD4 Th1 ląstelės, kurios aktyvuoja tiesioginį CD8+ T ląstelių citotoksiškumą, ir to padarinys – specifinių vėlyvų citokinų, įskaitant IL-2, IL-12 ir IFN- γ , produkcija. Šiuo atsaku CD8+ arba citotoksinės T ląstelės atlieka svarbiausią vaidmenį naikinant užkrėstas ląsteles ir išskiriant citokinus [5, 95]. *In vitro* bandymai su galvijų ląstelėmis parodė, kad gC ir gD yra pagrindiniai citotoksinių T ląstelių antigenai taikiniai, nors buvo įrodyta, kad naudojamas *in vitro* metodas turėjo įtakos rezultatams [98]. Ne MHC ribotas citotoksiškumas per anksčiau aprašytus monocitus ir makrofagus laikomas gausesniu ląstelių medijuojamu atsaku, bet reikalauja, kad T-limfocitų pagamintas IFN- γ padėtų aktyvuoti makrofagus [5, 95]. CD4+ arba pagalbiniai T limfocitai taip pat migruoja į pažeidimų vietą ir išskiria antrą arba vėlyvą bangą citokinų, tokių kaip IFN- γ [95, 99].

Adaptivus imuninis atsakas yra aktyviausias nuo 5 iki 10 dienų po infekcijos ir atlieka svarbų vaidmenį įveikiant infekciją ir bet kokių ligos klinikinių požymių remisiją. Tai apima Th2 atsaką, labiausiai atitinkantį vėlyvas infekcijos fazes ir reguliuojamas skirtingų vėlyvų citokinų, įskaitant IL-4, IL-5 ir IL-6. Skatinama gamyba IgM, IgG ir IgA antikūnų, kurie neutralizuoja bet kokį išorinį virusą, kas, kaip manoma, yra svarbu siekiant išvengti reaktyvacijos ir latentinio viruso plitimo (angl. *shedding*) [5, 27, 95, 99]. Antikūnų atsakas

laikomas svarbesniu siekiant užkirsti kelią infekcijai, o ne pagyti nuo esamos infekcijos. Tai ypač veiksminga, kai nosies takuose yra randamas didelis antikūnų kiekis tuo metu vykstant reaktyvacijai, dėl to nedelsiant neutralizuojamas virusas ir sutrukdomas tolesnis plitimas arba klinikinių požymių vystymasis [5, 95]. Per tyrimą, nagrinėjantį antikūnų izotipus pradinės infekcijos ir reaktyvacijos metu, nustatyta, kad IgM buvo pirmiausia aptinkamas praėjus 9 dienoms po infekavimo, po to IgA – nuo 12-os dienos ir IgG – nuo 13-os dienos. IgA buvo aptinkamas tik 3 savaites serumuose, tačiau išliko gleivinės išskyrose ir žymiai padidėjo nosies bei akių titruose po reinfekcijos, taip pat greitai pasireiškė serume. Tai paskatino pasiūlymus, kad IgA galėtų būti jautrus reinfekcijų indikatorius [5, 100, 101]. Nustatyta, kad intranazalinė imunizacija yra veiksmingas būdas stimuliuoti gleivinės IgA atsaką [102].

Galvijai geba sukelti veiksmingą imuninį atsaką po pirminės infekcijos su GHV-1, leidžiantį daugeliu atvejų atsigausti nuo ligos ir sulaikyti viruso išskyrimą, bet niekada negali pašalinti infekcijos, todėl visos pirminės GHV-1 infekcijos sukelia visą gyvenimą trunkančią latentinę infekciją. Yra spėjama, kad šios imuninio slėpimosi, apėjimo (angl. *evasion*) strategijos galėtų atlikti svarbų vaidmenį GHV-1, kad būtų sukurta patvari, nuolatinė infekcija [5]. Dėl jau minėto ekstensyvaus šeimininko imuninio atsako virusas išsivystė kelis imuninio atsako išvengimo būdus (1.2 lentelė). Pavyzdžiui, gG jungiasi prie chemokinių, kad užkirstų kelią jų veikimui, I tipo IFN ekspresija sumažinama reguliuojant BICP0 geno produktu – slopinant transkripciją [5, 103]. Šis įgimtų antivirusinių signalų slopinimas yra sukliamas IRF3 (IFN reguliacijos faktoriaus 3) degradacijos, baltymo, dalyvaujančio reguliaciniame komplekse, užtikrinančiame I tipo IFN transkripciją [5, 104]. Apsaugotas invazijos faktorius yra išsaugotas kituose susijusiuose alfa herpes virusuose, o glikoproteinas C sąveikauja su trečiuoju komplemento komponentu (C3), kad sumažintų komplemento aktyvaciją [5, 105]. Ūminės ligos fazės metu GHV-1 užkrečia ir sukelia epitelinių ląstelių apoptozę, kad būtų užtikrintas veiksmingas viruso išsiskyrimas, bet vėliau, latentinės fazės metu, su šia faze susijęs genas slopina apoptozę latentiskai užkrėstose ląstelėse. GHV-1 infekcija gali sukelti CD4+ T limfocitų apoptozę periferiniame kraujyje ir limfmazgiuose, kurie yra svarbūs specifiniam imuniniam atsakui [106, 107]. UL49.5 baltymas veikia mažindamas virusu užkrėstų ląstelių MHC I ekspresiją, blokuodamas transporterį, susijusį su antigeno apdoravimu [5, 108]. Tai reiškia, kad šios ląstelės nėra atpažįstamos ir pašalinamos citotoksinių T limfocitų (CD8+) [5]. *In vitro* buvo pastebėta, kad virusas sumažina leukocitų proliferaciją, slopindamas mitogeną, kuris paprastai stimuliuoja ląstelių dalijimąsi [107]. Šie veiksmai leidžia išgyventi virusui, taip pat sukelia imuninę slopinimo būseną, kuri padaro organizmą (šeimininką) pažeidžiamą antrinės bakterinės infekcijos.

1.2 lentelė. Imuninio atsako komponentų ir imuninės sistemos apėjimo (angl. *evasion*) strategijos GHV-1 infekcijos metu aprašymas [5, 117]. *ctcs: plitimas iš ląstelės į ląstelę.

Imuninio atsako komponentai		GHV-1 imuniteto išvengimo strategijos
Tirpūs įgimto imuniteto veiksniai, mediatoriai	I tipo IFN	Sumažinimas, slopinantis I tipo IFN reguliavimas (angl. <i>down-regulation</i>), atliekamas BICP0 [103, 104]
	Chemokinai	gG aktyvumas chemokino jungimuisi (angl. <i>binding</i>) [¹¹⁰]
	Alternatyvaus komplemento kelias	gC sąveika su galvijo C3b [105]
Įgimto imuniteto ląstelės	Monocitai-makrofagai	PBMC apoptozė [¹¹¹⁻¹¹³]
	Polimorfonuklearinės ląstelės	Alveolinių makrofagų ir PMN veiklos trikdymas, blokavimas [113, 114]
	Dideli granuliuoti limfocitai	
Antigeno pateikimas	MHC I klasės kelias	UL49.5 slopina TAP [54, 108] MHC I klasės pateikimo sumažinimas UL41 (vhs) [53]
	MHC II klasės kelias	MHC II klasės pateikimo sumažinimas UL41 (vhs) [53]
Adaptyvi imuninė sistema	Padėjėjai T limfocitai (CD4+)	CD4+ infekcija ir apoptozė [106]
	Citotoksiški T limfocitai (CD8+), B ląstelės	MHC I klasės sumažinimas (angl. <i>down-regulation</i>) sutrikdo CD8+ aktyvinimą [108]
Adaptyvūs humoraliniai veiksniai	Antikūnai	Tiesioginis ctcs* medijuojamas gB, gD, gH/gL, gE/gI leidžia GHV-1 plitimą, esant Ak neutralizavimui [¹¹⁶]
	Klasikinis komplemento kelias	gC sąveika su galvijo C3b [105]
Infekuotų ląstelių apoptozė		Su latencija susijęs genas inhibuoja apoptozę latentiškai infekuotose ląstelėse [¹¹⁷]

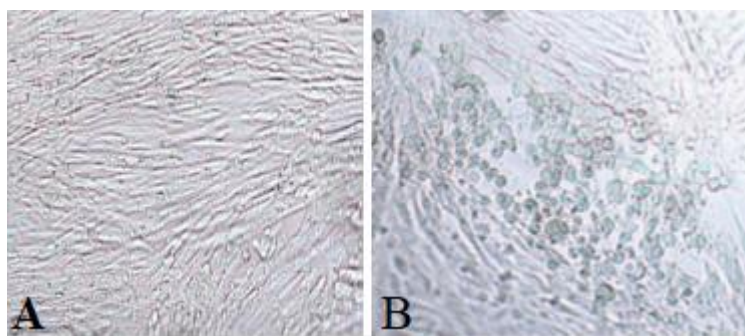
1.2. Diagnozavimas

GHV-1 sukeltų ligų diagnozė gali būti įmanoma pagal klinikinius požymius, esant kai kuriems protrūkiams, bet dažnai reikalingas laboratorinių tyrimų patvirtinimas. Gali būti reikalinga GHV-1 sukeltos respiracinės ligos diferencinė diagnozė nuo kitų galimų sukėlėjų, ypač galvijų kvėpavimo takų sincitinio viruso (GRSV), paragripo 3 tipo viruso (GPR3, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia* rūšių, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* ir *Trueperella pyogenes* [118]). Virusas yra didžiausios koncentracijos ir gali būti lengvai aptinkamas esant ankstyviems karščiavimo ir serozinių išskyrų atsiradimo požymiams. Tačiau vien tik viruso aptikimu negalima remtis kaip įtikinamu įrodymu, kad liga atsirado dėl GHV-1. Kadangi virusas gali atsinaujinti streso ar ligos metu, taip pat svarbu, kad kraujas būtų renkamas antikūnams nustatyti ūmios ligos metu ir vėliau – po 2–4 savaitių [118, 119]. Galutinė ligos diagnozė dėl GHV-1 tiksliausiai įrodoma, jei yra atitinkami klinikiniai požymiai, viruso aptikimas bei GHV-1 serokonversija yra įrodomi per patikimą laiko tarpą [118, 119].

GHV-1 gali būti lengvai išskiriamas pirminėse ląstelių kultūrose arba antrinėse galvijų inkstų, plaučių, séklidžių, trachėjos ir tokių žinomų ląstelių linijose, kaip, pavyzdžiui, Madin-Darby galvijų inkstų (MDBK) ląstelėse. Vis dėlto pirminė ląstelių kultūra yra jautresnė [35]. Virusas gali būti išskirtas iš nosies, konjunktyvinių, lyties organų tepinėlių,

abortinio vaisiaus placentos dalių, vaisiaus kepenų, plaučių, blužnies, inkstų, limfmazgių, kvėpavimo takų gleivinės, tonzilių ir plaučių [35]. Neapdorota arba sušaldyta sperma su konservantais taip pat gali būti renkama norint išskirti virusą [35, 118].

Gyvūnai, tikrinami GIRT protrūkio metu, dažniausiai yra labiausiai paveikti ir turintys akivaizdžių nosies gleivinės ir akių išskyrų dėl antrinės bakterinės infekcijos. Tačiau tokie gyvūnai nėra tinkamiausi norint aptikti virusą. Kitų bandos gyvūnų ištyrimas turėtų atskleisti ankstyvos ligos stadijos atvejus. Jie turės serozinių nosies ir akies išskyrų, karščiuos ir bus užsikrėtę 3–5 dienomis anksčiau [118]. Būsimam diagnostiniam tyrimui reikia surinkti tiek nosies, tiek akies sekretų [118]. Bronchoalveoliniai lavažai yra mažiau tinkami norint nustatyti GHV-1, negu aptikti žemesnių kvėpavimo takų virusus, tokius kaip galvijų kvėpavimo takų sincitinį virusą (GRSV) ir galvijų paragripo 3 tipo virusą (GPR3). IPV/IPB diagnozei makšties ir prepuliaciniai tepinėliai turėtų būti renkami iš ankstyvųjų atvejų [118]. Virusas aptinkamas per 3 dienas nuo inokuliacijos pagal būdingus citopatinius poveikius, charakterizuojamus pagal į vynuoges panašių suapvalintų ląstelių klasterizavimąsi (1.3 pav.) [35, 119, 120].



1.3 pav. GHV-1 infekcija ląstelių kultūroje: A – neužkrėstos ląstelės, B – GHV-1 užkrėstos ląstelės [11, 120].

Greičiau atliekamas testas, žinomas kaip imunofluorescencinių antikūnų tyrimas (IFAT). Jis apima viruso antigeno dažymą tepinėliuose arba citospinų kvėpavimo mėginių ląstelėse. Tai gali būti atliekama tiesiogiai naudojant monospecifinį antiserumą, konjuguotą su fluorescenciniais dažais, arba netiesiogiai su antriniu antirūšiniu antikūnu, kuris yra konjuguotas su fluorochromu. Nors viruso išskyrimas yra jautresnis ir konkretnesnis nei fluorescencinių antikūnų technika, tai yra daugiau laiko reikalaujantis metodas [119].

Histopatologija taip pat gali būti naudojama diagnostikai ten, kur pasireiškė abortai ir mirtys. Tiek neonatalinei sisteminei infekcijai, tiek ir abortams yra būdinga daugiažidininė kepenų nekrozė. Virusas iš negyvų gyvūnų audinių gali būti aptiktas ir jo vieta audiniuose gali būti parodyta pažymint imunohistochemiškai – naudojant GHV-1 specifinį monokloninį antikūną [81]. Realus laiko PGR pateiktas kaip veiksmingiausias būdas patvirtinti GHV-1 esant galvijų abortams, netgi kai kuriuose autolizuotuose embrionuose/vaisiuose [80]. Tačiau

histopatologijos, taip pat ir viruso izoliavimo naudingumas gali būti apribotas autolizės, ypač abortų medžiagoje [81].

1.2.1. Serologiniai tyrimai – ELISA, SNT

GHV-1 antikūno aptikimas serume ar piene yra svarbi GIRT diagnostikos ir kontrolės priemonė. Norint patvirtinti įtariamą ligą, ši priemonė naudojama ir parodyti infekcijos nebuvimą ar buvimą, remiantis kontrolės programomis ir vėlesniu stebėjimu. Vakcinacija, ypač su ne-markerinėmis GHV-1 vakcinomis, gali apsunkinti serologinių tyrimų interpretavimą. Tiriamų gyvūnų skiepijimo istorija turėtų būti pažymėta kartu su mėginiais laboratorijai pateikiamoje formoje [35, 118].

Kai kur patariama įtariamoms ligoms atvejais sumaišyti kelių paveiktai grupei priklausančių gyvūnų serumo mėginių ir ištirti vienu bandymu. Jei nėra skiepijimo, serokonversija pereina iš neigiamos į teigiamą arba infekciją parodo bent jau 4 kartus padidėjęs antikūnų titras. Serumas iš karvių aborto metu ir po 2–4 savaičių gali pateikti įrodymų, patvirtinančių naujausią/dabartinę GHV-1 infekciją, nors dažniausiai serokonversija bus įvykusi kelias savaites anksčiau. Dėl to sumaišyta (angl. *paired*) serologija yra ribotos vertės, bet nebuvimas antikūnų abiejuose serumuose atmeta GHV-1 kaip priežastį [118, 119]. Vieno serumo mėginiai yra geriausias būdas nustatyti, ar atskiras gyvūnas buvo užkrėstas ir ar dabar yra latentinis viruso nešėjas. Latentiniu būdu užkrėsto buliaus įvedimas į jautrias bandas gali turėti katastrofiškų padarinių. Nors retai, bet gali egzistuoti SNLC (seroneigiami latentiniai nešėjai) buliai; griežtas testavimo režimas gali sumažinti jų įvedimo į jautrias didelės vertės gyvūnų bandas riziką.

Serologiniai tyrimai, tokie kaip antikūnų detektavimo ELISA ir serumo neutralizavimo testai (SNT), naudojami seroteigiamiems gyvūnams identifikuoti, naudojant specifinius GHV-1 antigenus, kurie yra atpažįstami specifinių serologinių antikūnų serume. Tačiau šiais metodais yra sunku atskirti tolimus ir neseniai užsikrėtusius infekcija atvejus. Juos kartais galima atskirti, jei yra tiriami mėginiai, paimti skirtingu laiku, tuomet didėjantis GHV-1 antikūnų titras bus nesenos GHV-1 infekcijos požymis [35]. Serologija ne visada patikima, nes kai kurie jauni veršeliai gali užsikrėsti, kol vis dar turi cirkuliuojančių motininių antikūnų ir dėl to nesusikuria aktyvus humoralinis atsakas, dėl to gali būti nepastebėti ligos atvejai serologiniuose tyrimuose [5, 35, 118].

Antikūnams nustatyti kai kuriose laboratorijose naudojama ELISA su serumo neutralizavimo (SN) tyrimais. SN tyrimai leidžia pastebėti imuninį atsaką į visą virusą, o ne į specifinius baltymus. Tai neleidžia atskirti subtipų, bet suteikia gerą pradinės patikros parinktį ir gali būti naudojama ELISA bandymų rezultatams patvirtinti [121]. Šie testai yra ypatingi – daug mokslinių tyrimų buvo sutelkta siekiant padidinti jų jautrumą, kad pavyktų aptikti

latentinius viruso nešėjus su vos aptinkamais antikūnais. Atsižvelgiant į komerciškai prieinamų ELISA tyrimų įvairovę, labai svarbu žinoti testų skirtumus, būdus, kaip pateikti rezultatai, ir taikomas ribines vertes. ELISA tyrimai yra netiesioginiai (i-ELISA) arba blokuojamieji (konkurencingi) (c-ELISA), kai kurie yra tinkami nustatyti antikūnus piene [118, 119]. Yra keletas ELISA rinkinių, kurie yra komerciškai prieinami, jie naudoja ir blokuojamąjį, ir netiesioginį mechanizmus, antigenų taikiniai dažnai yra glikoproteinai, tokie kaip gB, gE ir gC [122]. gB naudojimas kaip taikinio antigeno yra standartinis ELISA tyrimas, kuris, pastebėta, yra jautresnis nei gE ELISA ir netiesioginė ELISA [123]. gE ELISA naudojamas identifikuoti virusą tarp skiepytų ir nevakcinuotų gyvūnų likvidavimo programose [124]. gC ELISA gali būti naudojamas subtipams atskirti [125].

Netiesioginė ELISA (IFA)

Netiesioginė ELISA, arba i-ELISA, naudoja GHV-1 antigenu padengtus šulinėlius plastikinėje plokštelėje. Bandomasis ėminys pridedamas, ir bet kurie pateikti GHV-1 antikūnai jungiasi prie antigeno. Sujungti antikūnai nustatomi naudojant fermentu pažymėtą anti-galvijų imunoglobuliną. Spalvos ryškėjimas įdėjus substrato/chromogeno tirpalo suteikia pusiau kiekybinį GHV-1 antikūnų kiekio įvertinimą tiriamame mėginyje. Rezultatai gali būti išreikšti skirtingais būdais, bet paprastai kuo didesnis pataisytas optinis tankis (angl. *corrected optical density* – COD), tuo daugiau antikūnų yra mėginyje. Vertės atkarpa gali skirtis dėl fono neigiamuose mėginiuose.

Blokuojamoji ELISA (IFA)

Blokuojamosios ELISA, arba c-ELISA, tyrimai taip pat naudoja GHV-1 antigenu padengtus šulinėlius plastikinėje plokštelėje. Supilamas bandinio mišinys ir fermentu pažymėti anti-GHV-1 antikūnai. GHV-1 antikūnai bandomajame mėginyje blokuoja prisijungimą fermentu pažymėtų antikūnų prie padengto antigeno. Spalvos ryškėjimas, pridėjus substrato/chromogeno tirpalo, yra sumažinamas pusiau kiekybiškai (angl. *semiquantitatively*), priklausomai nuo GHV-1 antikūno kiekio mėginyje. Mėginio ELISA rezultatas gali būti išreiškiamas kaip mėginio COD ir neigiamos reikšmės serumo santykis, ir, pavyzdžiui, ribinė vertė gali būti didesnė kaip 0,5 neigiamo mėginio ir žemiau 0,5 teigiamo rezultato. Be to, blokavimo procentas gali būti apskaičiuojamas kiekvienam pavyzdžiui, o ribinių verčių pavyzdys gali būti iki 50 proc. neigiamų rezultatų ir per 50 proc. teigiamų. c-ELISA tyrimai naudojami sąsajai su markerinėmis vakcinomis. Naudojant konkrečiais fermentais pažymėtus monokloninius antikūnus, atpažįstančius gB arba gE, markeriu vakcinuoti gyvūnai, paveikti (angl. *exposed*) GHV-1 lauko kamienu, gali būti atskirti nuo tų, kurie nebuvo paveikti.

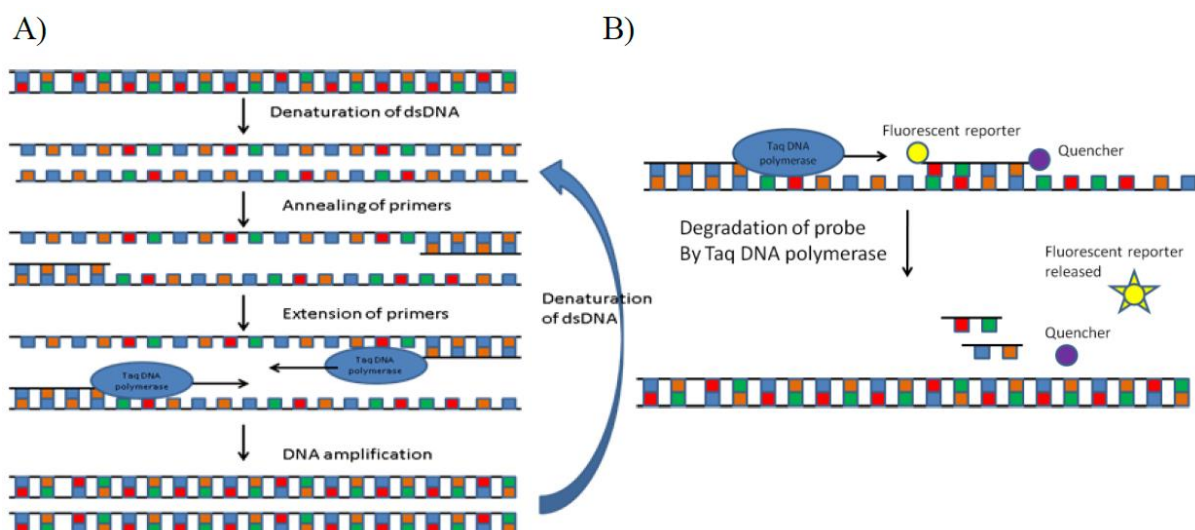
1.2.2. Molekulinės diagnostikos tyrimai – PGR

Neseniai molekuliniai metodai buvo pripažinti kaip tinkami virusams aptikti – jie užtikrina greitą, jautrų ir tikslų atpažinimą įvairių tipų mėginiuose. Jie taip pat leidžia aptikti latentiskai užkrėstas ląsteles audinių mėginiuose, o tai negali būti pasiekta viruso išskyrimu histopatologija/imunohistochemija. Standartiškai PGR gali aptikti virusą audiniuose po DNR ekstrakcijos ir jos pridėjimo prie PGR analizės. Šiluma naudojama DNR denatūruoti, pradmenys jungiasi prie specifinių viruso regionų DNR ir Taq DNR polimerazė pratęsia, pailgina pradmenis, kad gautų dar vieną šio regiono, srities, kopiją (1.4A pav.). Šis procesas pakartojamas terminio ciklavimo, kad sustiprintų specifinį virusinės DNR regioną, suteikiant galimybę aptikti ir iš mažų viruso titrų [119, 126–128]. Taip pat yra multipleksiniai PGR, kur keletas skirtingų pradmenų rinkinių, atpažįstančių skirtingas sekas, yra naudojami vienu metu kartu su apribojimo tipavimo tyrimu, kuris leidžia atskirti skirtingus galvijų herpes virusus [126, 129, 130]. Vis dėlto DNR padauginimas (angl. *amplifying*) diagnozės tikslais gali sukelti su tuo susijusių problemų. Yra būtina po PGR gauto produkto manipuliacija, kad būtų galima išanalizuoti rezultatus vizualiai agarozės gelyje, naudojant elektroforezę. Tai suteikia daug galimybių virusinei DNR užteršti kitus mėginius [131]. Šios problemos paaiškina sveikintiną atsaką į perspektyvą, naudojant realaus laiko PGR, kuriame tyrimai atliekami viename uždarame mėgintuvėlyje.

Realaus laiko PGR stebi pasirinkto DNR regiono amplifikaciją per reakciją uždaroje sistemoje. Kad papildytų specifinius pradmenis, fluorescenciškai žymėtas zondas taip pat yra suprojektuotas prisijungti prie pasirinktos sekos [132]. Toliau trumpai pristatomos 5 naudojamos medžiagos, kurias analizuoja ir aprašo įvairūs autoriai. DNR surišantys fluoroforai, tokie kaip SYBR žalia, fluorescencinis dažiklis, jungiantis DNR, taip pat gali būti naudojamas vietoj zondo, bet tai nėra specifiška sekai (taikiniui), todėl jis bus susietas su visomis dvigubomis DNR, gautomis per reakciją, o tai gali sukelti klaidingai teigiamus rezultatus dėl pradmens/dimero derinių, todėl jis yra mažiau tinkamas įrankis diagnostikai. Hybzondai yra linijiniai oligozondai, kuriuose yra donorinio fluoroforo priešsroviniame zonde 3' gale ir akceptorinio fluoroforo, esančio pasroviniame zonde 5' gale. Hibridizacijos metu šie fluoroforai sąveikauja, kad sukurtų FRET (fluorescencijos rezonanso energijos perdavimo) signalą. 5' nukleazės oligozondai, tokie kaip TaqMan zondai, naudoja fluoroforo reporterį, o slopiklis-gesiklis (angl. *quencher*) lieka šalia zondo, fluorescencija nepasireiškia, bet po to specifinis jungimasis prie sekos (taikinio) sužadina Taq polimerazės 5'-3'endonukleazės aktyvumą, kuris degraduoja zondą, taip leidžiant atskirti fluoroforo reporterį ir slopintuvą, dėl to įvyksta fluorescencija, patvirtinanti detekciją ir kiekybiškai įvertinamą norimą seką (1.4B pav.). „Plaukų segtukų“ oligozondai turi slopintuvą ir fluoroforą terminaliniuose galuose ir

lieka arti vienas kito tol, kol hibridizuojasi su seka (taikiniu), kai „plaukų segtukų“ struktūra perkeliama į atvirą konfigūraciją, kad būtų išlaisvintas FRET signalas. Panašiai, kaip ir „plaukų segtukai“, oligonukleotidai yra savaimė fluorescuojantys amplikonai, kuriuose yra „skorpiono“ ir „saulėtekio“ pradmenų, integruojamų į PGR produktus [131]. Dėl tobulinamų technologijų, kurios leidžia sumažinti ciklo laiką, realaus laiko PGR taip pat gali sumažinti diagnozei reikalingą laiką [131]. Naudojant realaus laiko PGR, taip pat galima tiksliai nustatyti mėginių virusinės apkrovos kiekį, kuris yra naudingas stebėjimui, klinikiniam tikslams ir tyrinėjimams [133]. Realaus laiko PGR turi tokius trūkumus: neįmanoma nustatyti pagausinto DNR fragmento dydžio, neatidarant sistemos, taip pat kyla kai kurių dabartinių multipleksinių galimybių apribojimų dėl prieinamo, galimo kanalų skaičiaus aptikimo [131]. Neseniai pateiktas GHV-1 aptikimo protokolas, naudojant realaus laiko PGR, buvo sukurtas sutelkiant dėmesį į tikslinės sekos nustatymą gB iš GHV-1 bulių spermoje [134, 135]. Šis metodas greitai tampa pirmenybiniu metodu diagnozei, jei tik yra galimybių.

Daugelyje laboratorijų virusų išskyrimas ląstelių kultūroje ir fluorescuojantys antikūnų tyrimai buvo pakeisti greita, labai jautria, pusiau kiekybine PGR. Realaus laiko PGR tyrimai yra naudingi nustatant nedidelius viruso kiekius galvijų spermoje ar kituose diagnostiniuose mėginiuose [134]. Greitas vienos pakopos/žingsnio realaus laiko multipleksas PGR buvo sukurtas, kad aptiktų GHV-1, GRSV ir GPR3 mėginiuose iš galvijų kvėpavimo takų ligos atveju [136]. Tokios multipleksinės molekulinės diagnostikos sparčiai vystosi dėl paklausos žmogaus patogenams nustatyti; komerciškai prieinama sistema dabar gali tikrinti iki 14 kvėpavimo takų virusų viename klinikiniam mėginyje [118].



1.4 pav. A) Standartinis PGR procesas. B) Realaus laiko PGR pratęsimo etapas, naudojant 5'-nukleozę TaqMan zondą [11].

1.3. Vakcinos

GHV-1 vakcinos yra labai tinkamos klinikinės ligos profilaktikai ir mažinant virusų plitimą, tačiau jos nepadedą išvengti lauko virusų sukeltos ribotos infekcijos. Gyvos vakcinos, administruojamos intranazaliai arba į raumenis, dažniausiai naudojamos siekiant apsaugoti riziką turinčius galvijus. Intranazalinės vakcinos buvo atliekamos protrūkių metu. Veršelius galima skiepyti nuo 3 iki 4 savaičių amžiaus (dar veikiant motininės kilmės antikūnams), bet turėtų būti pakartotinai skiepijami nuo 10 iki 12 savaičių. Galvijai, vyresni nei 3 mėnesių, yra apsaugoti vienkartinė doze, bet reikia kas 6 mėnesius stiprinamosios vakcinos apsaugai išlaikyti [118, 137, 138]. Daugumą vakcinų yra leidžiama naudoti veršingoms karvėms. GHV-1 vakcinos padermės dažnai derinamos su kitais galvijų patogenų vakcinos virusais, siekiant suteikti platesnę apsaugą nuo pagrindinių galvijų kvėpavimo takų ligų priežasčių, tačiau kai kurios tokios kombinuotos vakcinos negalimos naudoti veršingoms karvėms skiepyti (pvz., „Imuresp RP“ (Zoetis UK) visas virusas + GP3 (galvijų paragripo 3 virusas) [118, 137, 138].

Pagrindinės GHV-1 vakcinų kategorijos būtų modifikuotos gyvos, inaktyvuotos, subvieneto, DNR ir vektoriumi paremtos vakcinos. Daugelio tipų vakcinos yra prieinamos ir plačiai naudojamos kontroliuojant GIRT protrūkius [139].

Vakcinos, kuriose yra gyvų virusų, sukelia latentinę infekciją ir gali paskatinti reaktyvuoto vakcinos viruso plitimą (angl. *viral shedding*), kai skiriama intranazaliniu būdu [140, 141]. Taip pat yra pranešimų apie sukeltus abortus vaikingiems gyvūnams, paskyrus modifikuotas gyvas vakcinas [142, 143]. Inaktyvuotos vakcinos susideda iš adjuvanto, skirto inicijuoti imuninį atsaką, kombinuoto kartu su dideliu kiekiu inaktyvuoto viruso arba viruso dalimis, pvz., glikoproteinais [11, 144, 145]. Naujausi tyrimai rodo, kad inaktyvuotų vakcinų veiksmingumas panašus, kaip ir modifikuotos gyvos vakcinos, bet gali būti, kad yra saugesnės neštumo metu [144, 146].

1.3.1. Žymėtos (angl. *marker*) vakcinos

Žymėtos, arba DIVA, vakcinos buvo sukurtos siekiant atskirti laukinio tipo infekciją ir vakcinaciją, naudojant gE delecijos mutantinę viruso versiją vakcinoje (1.3 lent.). Antikūnai, esantys kaip vakcinacijos produktas, neatpažįsta gE, todėl skiepyti gyvūnai specifiniame gE ELISA tyrime suteiks neigiamus rezultatus, o kitose analizėse, pvz., gB arba visu (angl. *whole*) virusu pagrįstų ELISA testų arba SNT, lieka teigiami [147, 148]. Šios vakcinos daugiausia buvo naudojamos keliose Europos šalyse kaip dalis sėkmingos išnaikinimo schemos. Šios ištrinto gE vakcinos suteikia pranašumą, kad pakartotinis išsiskyrimas sumažėja, jei virusas yra vėl suaktyvintas po latencijos [3].

1.3 lentelė. Galvijų I tipo herpes viruso (GHV-1) antikūnų būsenos tyrimų rezultatų apžvalga [118].

Gyvūno būklė	Įprastinė vakcina		Žymėta vakcina	
	gB ar viso viruso ELISA	gE ELISA	gB ar viso viruso ELISA	gE ELISA
Nevakcinuotas ir nepaveiktas GHV-1	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
Nevakcinuotas/vakcinuotas ir paveiktas GHV-1	Teigiamas	Teigiamas	Teigiamas	Teigiamas
Vakcinuotas ir nepaveiktas GHV-1	Teigiamas	Teigiamas	Teigiamas	Neigiamas

Tačiau jos buvo kritikuojamos dėl daugelio priežasčių: vakcinos sumažina viruso replikaciją ir transliaciją, bet jos netrukdo infekcijai, todėl serologinis paplitimas dažnai išlieka didelis tose srityse, kuriose buvo bandyta naudojant vakcinaciją atlikti likvidaciją/išnaikinimą [149]. Kadangi vakcinos yra gyvos, jos buvo kritikuojamos kaip prieštaraujančios išnaikinimo tikslui [150]. Imuninis atsakas į gE po natūralios infekcijos yra silpnesnis nei daugiau imunodominuojančių glikoproteinų, tokių kaip gB. gE c-ELISA jautrumas yra mažesnis nei 72–93 proc., palyginti su SN bandymais arba gB c-ELISA [151]. Anksčiausia anti-gE antikūno detekcija gE ELISA tyrimu yra uždelsta – kartais po 3 savaičių po gB atsako [152]. Mažesnis gE c-ELISA jautrumas yra trūkumas atliekant atskirų gyvūnų tyrimus, bet pakankamas jautrumas bandos lygiu pasiekiamas, kai ištiriama daug serumo ar pieno mėginių. Vis dėlto dabartiniai metodai šiuo metu yra pernelyg nejautrūs, kad būtų galima praktiškai taikyti talpyklų pieno tyrimams. Buvo įrodyta, kad pieno koncentravimo procedūra leidžia geriau nustatyti GIRT gE-teigiamo pieno mėginiuose [153]. Naujausias netiesioginės gE ELISA panaudojimo tyrimas gali būti, kad ne tik patvirtina ELISA tinkamumą, bet ir paskatina plėtojimą netiesioginės gE ELISA, skirtų GHV-1 infekcijos stebėjimui bandose, skiepytose žymėtomis vakcinomis [154].

Panaikinto gE vakcinos yra gautos iš mažo virulentiškumo tėvinių kamienų. gE nebuvimas veda prie tolesnio susilpninimo sumažinant viruso gebėjimą plisti iš ląstelės į ląstelę. Tačiau, nepaisant jų saugaus naudojimo jau daugelį metų, kyla pagrįstas susirūpinimas, kad pašalinto gE vakcinos gali rekombinuotis su laukinio tipo virusu koinfekcijos metu. Toks rekombinavimas buvo pademonstruotas eksperimentiškai [5]. Generavimas gE-neigiamų virulentinių GHV-1 padermių yra potenciali grėsmė likvidavimo schemoms bei programoms. Siekiant sumažinti šią grėsmę, buvo pagaminta dvigubos delecijos vakcina, kurioje gE ir timidino kinazės genai buvo pašalinti. Timidino kinazės delecija yra susijusi su virusinio neurotropizmo sumažinimu ir latencijos lemiamų sunkumų sumažinimu, kuris pasiektas vakcina [155]. Nors rekombinacijos rizika tarp latentinio lauko tipo ir gE delecijos virusų laikoma maža esant lauko sąlygoms, manoma, kad dvigubos delecijos vakcinos yra saugesnis pasirinkimas, nes sumažina vakcinos viruso plitimo riziką ir rekombinacijos įvykius [151].

1.3.2. Naujų vakcinų kūrimas, tyrimai

Tyrimai rodo, kad naujagimiams, dažniausiai labiausiai pažeidžiamiems infekcijų, modifikuotos gyvos ir nužudytos vakcinės ne itin veiksmingos dėl imuninės sistemos nebrandumo ir interferencijos motinos antikūnais. Nauji metodai naudoja DNR vakcinas imunitetui sukelti kaip vieną iš šios problemos sprendimo būdų. Šios naujos vakcinės, aprašytos kaip antigeną koduojančios bakterinės plazmidės, yra išbandomos siekiant išspręsti naujagimių GHV-1 protrūkių problemą [150]. Šios plazmidinės DNR vakcinės turi sekas, koduojančias 3 pagrindinius imunodominantinius GHV-1 glikoproteinus – gC [156], gB [157] ar gD [158–160]. Taip pat siekiama sumažinti intramuskulinį vakcinų tiekimą dėl žalos audiniams, dėl kurios atmetama mėsa, todėl intranazaliniai metodai yra labiau pageidaujami, kai tik yra įmanoma atlikti [150]. Kaip tik šie konstruktai išskėlė galimo skiepijimo be adatos naudojimo galimybę [150, 161]. Nė viena iš dabartinių vakcinės strategijų nėra konkrečiai skirta sisteminiam viruso plitimui sustabdyti, nes yra per mažai žinoma apie sisteminio išplitimo mechanizmus. Vakcinuojant nuo artimai susijusio EHV-1 viruso, atlikti tyrimai infekcijos imuninio atsako metu parodė, kad veiksminga vakcina, užkertanti kelią sisteminiam plitimui, pareikalautų aukšto virusą neutralizuojančio antikūnų titro, kombinuoto su padidėjusiu citotoksiniu imuniniu atsaku, aktyvacijos [162, 163].

Vis dar atliekami tyrimai ir kuriamos naujos kartos vakcinės. Ideali vakcinė turėtų būti saugios ir be veiksmingumo problemų. Kelios vakcinės buvo išbandytos – jas daugiausia sudaro glikoproteinai B, C arba D, išreikšti skirtingose sistemose, tokiose kaip transfekuotos ląstelių kultūros [164], rekombinantiniai bakulovirusai [165], rekombinantiniai adenovirusai [166–169] ar rekombinantinis tabako mozaikos virusas [170]. gD paremtos vakcinės yra veiksmingiausios mažinant klinikines ligas ir išskiriant virusus, kai jos yra suformuotos su veiksmingais adjuvantais. Pavyzdžiui, chitozanoi [171] ir CpG oligodeoksinukleotidas [161, 172], taip pat yra naujų adjuvantų, kurie žymiai sustiprina apsauginį imuninį atsaką, kaip rodo padidėjęs neutralizuojantis antikūnų titras, sumažėjęs klinikinių ligų atvejų skaičius bei sumažėjęs virusų plitimas po išskyrimo (angl. *shedding*). Iki šiol yra sukurta daug eksperimentinių vakcinų. GHV-1 vakcinų temą plačiai apžvelgė S. van Drunen Littel-van den Hurkas [150].

1.4. Kontrolė ir likvidavimas

GHV-1 kontrolė ir galutinis likvidavimas yra pagrįsti užkrėstų gyvūnų aptikimu ir pašalinimu infekuotų gyvūnų, naudojant arba nenaudojant žymėtų vakcinų. Kaip alternatyva gali būti imtasi pakartotinio užkrėstų bandų skiepijimo, siekiant padidinti apsaugą, sumažinti ligos poveikį ir latentinės infekcijos riziką, kad virusas vėl nepasklistų. Kontrolė dažniausiai

yra vakcinacija, kad būtų išvengta pradinės infekcijos. Naikinimo schemos buvo sėkmingos keliose Europos šalyse, kur buvo taikoma vakcinacija ar seropozityvių gyvūnų skerdimas, atrenkant regionuose, kuriuose yra mažas seropozityvumas [11, 149]. Išnaikinimo schemos naudojant DIVA strategiją gali būti taikomos bandos, regiono ar nacionaliniu lygiu, bet reikalauja ilgalaikio planavimo, visapusiško GHV-1 biologijos supratimo ir įsipareigojimo valdyti praktikas, kurios sumažina viruso plitimą. Jei nėra nacionalinės politikos ar darnaus pramonės tikslo, kontrolės metodas turi būti pasirinktas bandos lygiu [118].

1.4.1. Bandos lygio kontrolė

Kiekvienoje GIRT kontrolės strategijoje yra 4 etapai: bandos sveikatos planavimas, įskaitant biologinio saugumo patikrą; infekcijos masto nustatymas; ligos ir jos plitimo kontrolė; reguliarus stebėjimas, kad liga išliktų kontroliuojama.

Bandos sveikatos planavimas

Svarbu suvokti GHV-1 keliamos vietinės rizikos įtaką [173]. Atsižvelgiant į plačiai paplitusią viruso prigimtį, infekcijos rizika visuomet reikalauja budrumo, ypač perkant galvijus. Dėl ligos sunkumo kintamumo sunku įvertinti ekonominį poveikį. Tačiau vakcinacijos nauda tikėtina, nes padeda sumažinti daugelio ligų protrūkių sukeltus nuostolius. Didelės rizikos galvijai, pvz., telyčios, patekę į endemiškai užkrėstą bandą, turėtų būti skiepijami. Aukštos vertės ištekliai, skirti eksportuoti, arba buliai, skirti ES patvirtintiems dirbtinio apvaisinimo centrams, negali būti skiepijami; galvijai, kuriuose aptinkama GHV-1 antikūnų (įskaitant vakcininius), yra neleidžiami į GHV-1 neturinčias šalis ir dirbtinio apvaisinimo centrus [118]. Bandos sveikatos planavimas turėtų remtis aiškiais biologinio saugumo taisyklėmis ir loginės kontrolės programomis su vakcinomis arba be jų [174].

Infekcijos masto nustatymas

Infekcijos apimtį nagrinėjimas apima GHV-1 antikūnų tyrimus kraujyje arba piene. Tiriamieji bandymai gali apimti talpyklų pieno (BTM) testus arba individualius kraujo ar pieno tyrimus suaugusiųjų bandoje. Endemiškai užkrėstose pieninėse bandose reguliariai esant aukštam BTM antikūnų lygiui, gali būti naudinga ištirti pieną iš pirmos laktacijos telyčių, kad būtų galima stebėti jaunų gyvulių infekcijos lygį. Tačiau išsamus tyrimas atliekamas tiriant visus gyvūnus, kurie yra ne jaunesni nei 12 mėn., ir visus jaunesnius gyvūnus, kurie buvo auginti ne bandoje [118].

Ligos ir jos plitimo kontroliavimas

Bandoms, kurios, kaip nustatyta, yra be infekcijos, reikalingas akylas biologinis saugumas, kad ir išliktų be infekcijos, o dėl žymėtos vakcinacijos turėtų būti apsvartyta, jei

banda yra didelės rizikos vietovėje. Užkrėstos bandos gali būti likviduojamos dėl infekcijos ne naudojant vakciną, o pašalinant seroteigiamus gyvūnus ir kuriant jaunų, neužkrėstų galvijų seroneigiamas veislines bandas [175–178]. Savininkai, turintys keletą seroteigiamų gyvūnų bandose, gali apsvarstyti šių gyvūnų pašalinimą, kad būtų pasiekta infekcijos likvidacija (angl. *freedom from infection*). Tačiau, kai infekcija yra plačiai paplitusi, kontrolės pagrindas – vakcinų naudojimas. Žymėtos vakcinos yra pageidautinos, nes jų stimuliuojamas antikūnas gali būti atskiriamas nuo GHV-1 antikūno, kuris seka natūralią infekciją. Palaiptiesiems gali būti padaryta pažanga, kai užsikrėtę gyvūnai palieka bandą. Akreditacija be infekcinio statuso (angl. *freedom*) pasiekama po dviejų aiškių bandų tyrimų nuo 1 iki 12 mėnesių.

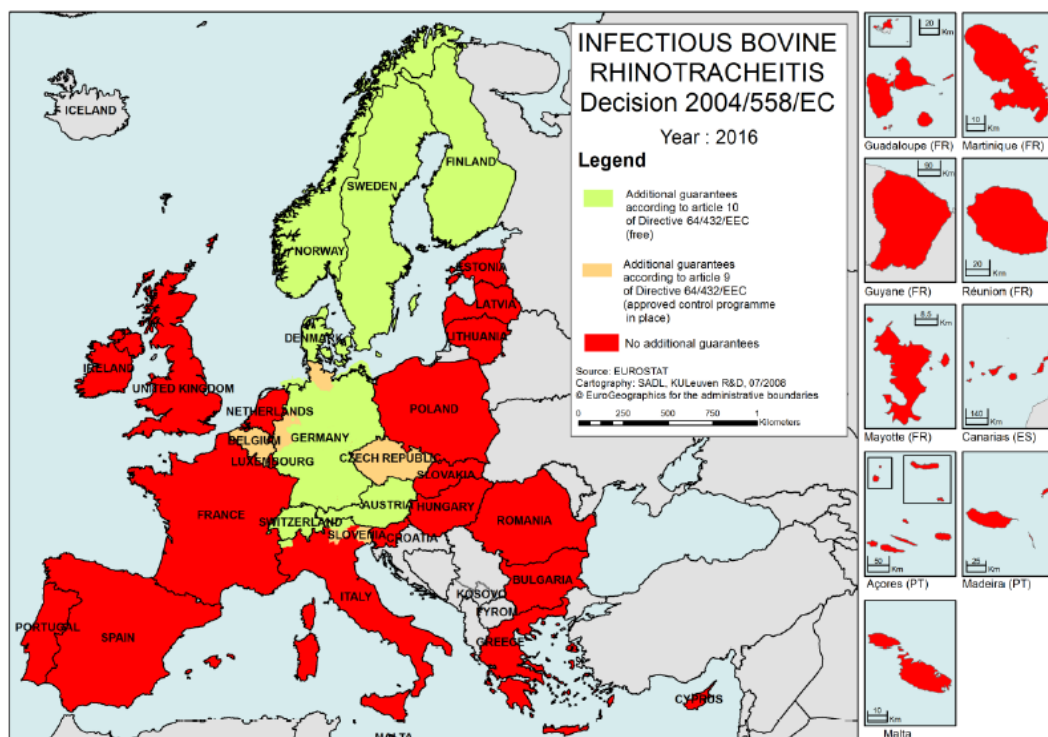
Reguliarus stebėjimas

Patartinas kasmetinis stebėjimas. Kai kuriuose šaltiniuose minima, kad tai turėtų apimti statistiškai pagrįsto mėginio tyrimą iš kiekvienos galvijų, vyresnių nei 12 mėn., grupės, taip pat veislinius bulius ir įvežamus gyvūnus. Pieno bandose reguliariai (pvz., kas ketvirtį) stebėti BTM dėl GHV-1 antikūnų. Antikūnų stebėjimo metodas yra plačiai naudojamas kasmet stebint nemelžiamų galvijų bandas [118].

1.4.2. Nacionalinio lygio kontrolė

ES pripažino GIRT kaip ligą, kurią reikia reglamentuoti prekyboje tarp narių valstybių, ir tai paskatino šalis priimti GIRT likvidavimo schemas. Austrija, Danija, Suomija, Norvegija, Švedija, Šveicarija ir Bolcano regionas Italijoje išnaikino GHV-1. Jų santykinai žemas serologinio paplitimo lygis leido jiems pasirinkti testavimo ir pašalinimo strategiją be vakcinų.

Kitos Europos šalys ėmėsi nacionalinių arba tarptautinių regioninės kontrolės programų, kuriose naudojamos žymėtos vakcinos. Pagal ES direktyvą 64/432/EEB, valstybės narės arba regionai, kuriuose nėra GIRT (10 straipsnio (II priedas 2014 m.) šalys) arba kurie turi privalomą GIRT ligos likvidavimo programą (9 straipsnio (I priedas 2014 m.) šalys), turi teisę gauti papildomas garantijas, kai galvijai parduodami į šias valstybes ar regionus (1.5 pav.) [179, 180].



1.5 pav. 2016 metų Europos žemėlapis, vaizduojantis šalis ir regionus šalyse, išnaikinusiose infekcinę galvijų rinotracheitą (žalia spalva) (10 straipsnio šalys) ir įgyvendinusiose Europos Sąjungoje pripažintas kontrolės programas (geltona spalva) (9 straipsnio šalys). Šalys, kuriose nėra pripažintų kontrolės programų, pažymėtos raudonai [181].

Norint prekiauti su 9 straipsnio šalimis, galvijai turi:

- Būti gabenami iš ūkio, kuris per paskutinius 12 mėnesių nebuvo paveiktas GIRT;
- Būti laikomi 30 dienų izoliatoriuje iki gabenimo ir neturi būti nustatyta GIRT požymių;
- Ne anksčiau, kaip praėjus 21 dienai po jų atgabenimo į karantiną, turi būti atlikti serologiniai testai, kurių rezultatai turi būti neigiami: jei vakcinuoti, turi nebūti GVH-1 gE antikūnų, o jei nevakcinuoti, iš viso turi nebūti GHV-1 antikūnų.

Norint prekiauti su 10 straipsnio šalimis, galioja tie patys reikalavimai, tiktai galvijai turi būti nevakcinuoti nuo GIRT – vakcinuoti yra neįvežami.

Vokietijoje GHV-1 infekcijos kontrolė pagal įstatymus buvo vykdoma nuo 1997 m. Iki 2008 m. 85 proc. visų pieninių ir židinių karvių bandų buvo laikomos nepaveiktomis, be laukinės rūšies GHV-1 infekcijos, o 2016 m. 11 iš 16 federalinių vienetų buvo likviduoti dėl ligos. Čekijos Respublika turėjo oficialią GIRT likvidavimo programą nuo 2005 metų. 2012 m. Belgija tapo naujausia ES valstybe, kuri įvedė nacionalinę privalomąją programą, ji turėjo savanorišką programą ir naudojo tik žymėtas vakcinas nuo 1997 metų. Kitos Europos šalys turi savanoriškos kontrolės programas [151].

1.4.3. Tarptautinio lygio kontrolė

Išsamūs tarptautinės GIRT/IPV kontrolės standartai yra pateikti Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacijos (OIE) sudarytame Sausumos gyvūnų sveikatos kodekse [182]. Pirmuosiuose skyriuose (4.5–4.9) aprašomas spermos surinkimas ir perdirbimas bei rinkimas ir apdorojimas *in vivo* gautų embrionų, taip pat embrionų/oocitų, kurie yra mikromanipuliuoti arba pagaminti *in vitro*. Buliai, teikiantys spermą tarptautinei prekybai arba eksportuojamų embrionų gamybai, turėtų būti kilę iš GIRT/IPV neturinčios bandos ar dirbtinio apvaisinimo centro. Jei taip nėra, buliai donorai turėtų būti laikomi izoliatoriuje spermos surinkimo metu ir 30 dienų po to, taip pat ištirti dėl GIRT/IPV kraujo mėginiuose, paimtuose ne anksčiau, kaip po 21 dienos po spermos surinkimo; privaloma, kad gauti rezultatai būtų neigiami. Jei serologinė buliaus būklė yra nežinoma arba jei bulius yra serologiškai teigiamas, kiekvieno spermos rinkinio alikvotinė dalis turi būti ištirta išskiriant virusą arba PGR. GIRT/IPV perdavimo rizika perduodant *in vivo* gautus embrionus yra laikoma nereikšminga, esant sąlygai, kad embrionai yra tinkamai tvarkomi nuo surinkimo iki perdavimo, griežtai laikantis „Tarptautinės embrionų perkėlimo draugijos vadovo“. Embrionai turi būti ne mažiau kaip 10 kartų išplaunami buferiniame druskos tirpale praskiedžiant mažiausiai 100 kartų tarp kiekvieno plovimo ir papildomais plovikliais, kurių sudėtyje yra 0,25 proc. tripsino. Tik embrionai su nepažeista *zona pellucida* (permatoma zona) ir be pašalinių medžiagų yra tinkami perduoti.

OIE GIRT/IPV kodekso 11.8.2 skyriuje apibrėžiamos sąlygos, kurias turi atitikti, kad šalis ar zona būtų laikomos neužkrėstos viruso (angl. *qualify as free*) ir kad išlaikytų šį statusą [183]. Kad atitiktų viruso likvidavimo statusą:

- Pranešimas apie ligą arba įtarimą dėl ligos yra privalomas;
- Nė vienas gyvūnas nebuvo skiepytas nuo GIRT/IPV mažiausiai 3 metus;
- Bent 99,8 proc. bandų yra be GIRT/IPV.

Kad šalis ar regionas išlaikytų statusą:

- Serologinė patikra turėtų būti atliekama kasmet – atsitiktiniuose mėginiuose galvijų populiacijos pakankamos suteikti 99 proc. lygio konfidencialumą GIRT/IPV detektavimui, jei jo pateikiamas paplitimas viršija 0,2 proc. bandų;
- Visi importuoti galvijai turėtų būti patvirtinti kaip neturintys GIRT/IPV;
- Visos importuotos galvijų spermos ir embrionai/kiaušialąstės turėtų būti patvirtinti kaip surinkti, apdoroti ir saugomi atitinkamai pagal minėtus OIE kodekso skyrius [182].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimo vieta. Tyrimai buvo atliekami 2017–2018 metais Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Virusologinių tyrimų skyriuje. Tyrimas atliktas laikantis Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų, patvirtintų Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 (Žin., 2012, Nr. 130-6595).

Tyrimo objektas. Tyrimo laikotarpiu IFA metodu dėl GHV-1 gB buvo ištirta 2115 galvijų kraujo serumo mėginių ir 888 – dėl GHV-1 gE. Naudoti iš visos Lietuvos įvairių ūkių ir pavienių gyventojų į virusologinių tyrimų laboratoriją atsiųsti mėginiai diagnostiniams tyrimams atlikti.

Skirtingų gamintojų rinkinių, skirtų imunofermentinei analizei atlikti ir GHV-1 aptikti, palyginimas atliktas tarp QIAGEN ir IDEXX įmonių, kurios toliau šiame darbe aprašant ir analizuojant rezultatus vadinamos X ir Y įmonėmis. Tam, kad būtų galima palyginti GIRT gE rinkinius, panaudoti 295 mėginiai (teigiamų – 58, neigiamų – 239), o GIRT gB diagnostikai skirtiems rinkiniams palyginti ištirti 172 mėginiai (teigiamų – 13, neigiamų – 159).

2.1. Medžiagos

Tyrimui atlikti naudoti reagentų rinkiniai ir cheminės medžiagos surašytos 2.1. lentelėje. Naudota įranga ir nustatyti parametrai pateikiami 2.2. lentelėje.

2.1 lentelė. Naudoti reagentų rinkiniai ir cheminės medžiagos.

Medžiagos, rinkiniai	Gamintojas
IDEXX IBR gB X3 Ab test – GIRT herpes-1 gB antikūnų nustatymo rinkinys	IDEXX, Nyderlandai
IDEXX IBR gE Ab test – GIRT herpes-1 gE antikūnų nustatymo rinkinys	IDEXX, Nyderlandai
Cattletype BHV1 gB Ab – GIRT herpes-1 gB antikūnų nustatymo rinkinys	QIAGEN, Vokietija
Cattletype BHV1 gE Ab – GIRT herpes-1 gE antikūnų nustatymo rinkinys	QIAGEN, Vokietija
Virkon S – dezinfekcinis tirpalas (1 proc.)	DUPONT, Jungtinė Karalystė

2.2 lentelė. Naudota įranga ir nustatyti parametrai.

Irenginys (darbe naudojami parametrai)	Gamintojas
Spektrofotometras ELx808 (automatinis mikroplokštelių analizatorius). Nustatyti parametrai: 450 nm (GIRT gB tyrimams), 650 nm (GIRT gE tyrimams)	BIOTEK, Jungtinės Amerikos Valstijos
Centrifuga 5702. Naudoti parametrai: 1000–4400 aps. / min.	EPPENDORF, Vokietija
INNOVENS™ termostatas. Naudoti parametrai: +37°C ±3°C (GIRT gE tyrimui), +18°C - +26°C (GIRT gB ir gE tyrimams)	JOUAN S. A., Prancūzija

2.2. Metodai

2.2.1. Imunofermentinė analizė

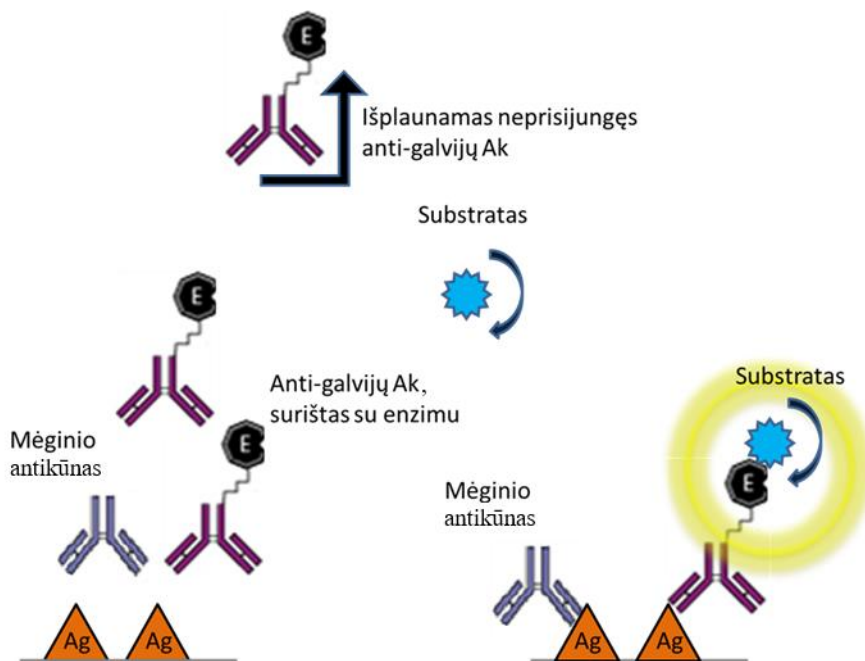
Veikimo principas.

Antikūnų prieš galvijų 1 tipo herpes viruso glikoproteiną B (GHV-1 gB Ak) tyrimas leidžia iš galvijų paimto serumo, plazmos ir pieno mėginių nustatyti galvijus, užsikrėtusius GHV-1 arba vakcinuotus glikoproteino B vakcina.

Galvijų tipo GHV-1 gE Ak yra jautrus tyrimas, skirtas antikūnų prieš galvijų herpes viruso 1 glikoproteiną E (gE) nustatymui serume, plazmoje ir pieno mėginiuose. Standartiniai serologiniai metodai negali išskirti natūraliai infekuotų ir vakcinuotų gyvūnų, išskyrus GIRT vakcinas, kurios neturi gE virusinio baltymo, ir tai leidžia serologiškai atskirti natūraliai infekuotus gyvūnus nuo vakcinuotųjų. Galvijų tipo GHV-1 gE Ak specifiskai detektuoja antikūnus prieš gE ir nereaguoja su antikūnais iš vakcinų be gE antigenų. Todėl šis metodas identifikuoja gyvūnus, kurie buvo infekuoti GHV-1 lauko kamienais ar vakcinuoti vakcinomis su gE antigenu.

Galvijų tipo GHV-1 gB (arba gE) Ak nustatymui taikoma blokuojamoji imunofermentinė analizė (2.1. pav.). Bandyto mikroplokštelių šulinėliai padengti inaktyvuotu GHV-1 viruso antigenu. Testuojamo mėginio GHV-1 specifiniai antikūnai (įskaitant gE antikūnus) pirmo inkubavimo metu (mėginiai yra atskiedžiami ir inkubuojami šulinėliuose) jungiasi prie imobilizuoto GHV-1 antigeno, t. y. bet kokie specifiniai BHV-1 antikūnai, esantys serume, sudaro GHV-1 antikūnų imuno-kompleksą ir lieka susijungę šulinėliuose. Nesusijungusi medžiaga / junginiai pašalinami skalavimo būdu. Po plovimo anti-galvijų antikūnų imunoglobulinas, surištas su enzimu, įpilamas į plokštelės duobutes inkubacijai. Šis konjugatas prisijungia prie imuninio komplekso. Po plovimo į plokštelės duobutes įpiltas specifinis anti-GHV-1-gE arba gB (priklausomai nuo tyrimo – gE ar gB) monokloninių antikūnų konjugatas (žymėtas krienų peroksidaze) yra inkubuojamas šulinėliuose. Jei mėginyje nėra gE (arba gB, priklausomai nuo atliekamo tyrimo) antikūnų,

konjuguoti gE (arba gB) antikūnai jungiasi su gE (arba gB) antigenu. Ir atvirkščiai, jei mėginyje yra gE (arba gB) antikūnų, konjuguotų gE (arba gB) monokloninių antikūnų jungimasis su gE (arba gB) antigenu yra blokuojamas dėl anksčiau prie antigeninio determinanto prisijungusių testuojamame mėginyje esančių specifinių GHV-1 antikūnų. Nesusijungęs anti-gB-krienu peroksidazės (arba anti-gE-HRP) konjugatas išplaunamas. Po plovimo pradedama spalvinė reakcija: įpilama substrato tirpalo TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidino), kuris sudaro mėlyną junginį ir vėliau, po blokavimo („sustabdymo“) tampa geltonas. Spalvos intensyvumas priklauso nuo antikūnų koncentracijos tiriamame serumo mėginyje (kuo mažesnis intensyvumas, tuo didesnė BHV-1 antikūnų koncentracija mėginyje; kuo didesnis spalvos intensyvumas, tuo mažesnė mėginio Ak koncentracija, tuo daugiau iš rinkinio prisijungusių su fermentu surištų antikūnų. Optinis tankis (OT) matuojamas spektrofotometru (450 nm gB, 650 nm gE). Blokavimo vertė (inhibavimo procentas) apskaičiuojama pagal optinio tankio vertes, gaunamas su bandinio (testo mėginio) ir neigiamos kontrolės, kurioje nėra GHV-1 specifinių antikūnų. Neigiamas lygis nustatomas naudojant neigiamą kontrolinį serumą, kuris nesukelia reakcijos ir turi būti įpilamas į kiekvieną plokštelę. Teigiamas lygis yra nustatomas naudojant teigiamą kontrolinį serumą, kuris sukelia reakciją, ir turi būti įpilamas į kiekvieną mikroplokštelę.



2.1 pav. Blokuojamos imunofermentinės analizės (IFA (angl. ELISA) schema.

GIRT serologinės diagnostikos (gE arba gB) taikant IFA metodika.

Mėginiai. Kraujo mėginiai imami iš venos, pilami į vakuuinius mėgintuvėlius be antikoagulianto, kad susidarytų kraujo serumas. Iš 5 ml kraujo apytiksliai gaunama apie 1–2 ml kraujo serumo. Tiriamieji serumai iki tyrimo pradžios turi būti laikomi šaldiklyje -20°C – 30°C temperatūroje. Jei mėginyje susidaro krešulys, serumas sunkiai pasiekiamas ar susimaišęs, – jis atsargiai atskiriamas nuo kraujo naudojant pipetę, nupilant arba centrifuguojant ir perpilamas į sterilius mėgintuvėlius.

Pasiruošimas. Prieš pradėdant tyrimą reagentai laikomi kambario temperatūroje (18 – 25°C). Prieš naudojimą TMB substratą būtina laikyti tamsioje vietoje, kad jis nebūtų veikiamas intensyvios dirbtinės ar saulės šviesos). Jei plovimo tirpale (10x) matoma nusistovėjusių druskos kristalų, juos galima ištirpinti švelniai maišant ir šildant. Paruošiamas plovimo tirpalas: koncentruotas (10x) plovimo tirpalas atskiedžiamas distiliuotu / dejonizuotu vandeniu santykiu 1:10. Jei vanduo nepakankamai švarus, tai gali turėti įtakos rezultatams, todėl patartina naudoti dvigubai distiliuotą vandenį. Atskiedus plovimo tirpalas sumaišomas. Pavyzdžiui: vienai plokštei (96 šulinėliams) reikalinga paruošti 500 ml plovimo tirpalo (1x), t. y. 50 ml plovimo tirpalo (10x) ir 450 ml distiliuoto vandens. Atskiestas tirpalas gali būti naudojamas dar neišnykus kristalams, tačiau tik tokiu atveju, jei buteliukas (100 ml) bus sunaudotas iš karto. Kristalai atsiranda $+5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) temperatūroje. Paruoštas plovimo tirpalas gali būti laikomas vieną savaitę $+5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) temperatūroje. Tyrimui skirtus mėginius galima naudoti šviežius arba prieš tai buvusius užšaldytus.

GIRT gE tyrimų (X ir Y įmonių rinkinių) procedūra:

1. Kraujo serumo mėginių išpilstymas:
 - 1.1. Serumo mėginiai ir kontrolės skiedžiamos santykiu 1:2 su jau paruoštu naudoti mėginių skiedikliu. Serumų išpilstymas (2.3 lent.):
 - 1.1.1. 50 μl paruošto naudoti mėginių skiediklio išpilstoma į kiekvieną šulinėlį.
 - 1.1.2. Į A1 ir B1 šulinelius išpilstoma po 50 μl neigiamos kontrolės (neatskiestos) ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).
 - 1.1.3. Į C1 ir D1 šulinėlius išpilstoma po 50 μl teigiamos kontrolės (neatskiestos) ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).
 - 1.1.4. 50 μl kiekvieno tiriamo mėginio (neatskiesto) įpilama į kiekvieną likusį šulinėlį ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).

Kontrolės su skiedikliu mėginius galima sumaišyti naudojant purtyklę, supurtant baseinų turinį švelniai kratant plokštelę arba pipetavimo metu pakartotinai įtraukiant ir vėl išleidžiant į šulinėlį jo turinį (mėginys arba kontrolė ir skiediklis).

2.3 lentelė. Mėginių ir kontrolių išdėstymas. N – neigiama kontrolė, T – teigiama kontrolė, 1 – mėginys Nr. 1, 2 – mėginys Nr. 2 ir t. t.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N											
B	N											
C	T											
D	T											
E	1											
F	2											
G	3											
H											

2. Inkubavimas. Skiesti serumo mėginiai ir skiestos kontrolės inkubuojamos per naktį (18–24val. (X rinkinio 16–22val.) kambario temperatūroje (+18°C–+26°C) uždengetoje (dangteliu, aliuminio folija ar lipnia juosta) mikroplokštelėje.

3. Plovimas:

3.1. Plokštelės turinys rankiniu ar automatinio būdu iškratomas.

3.2. Kiekvienas šulinėlis išplaunamas 5 kartus pripildant po 300 µl paruošto plovimo tirpalo (1x) ir pašalinant tirpalą iš šulinėlių po kiekvieno plovimo – iškratant plokštelę.

3.3. Atlikus paskutinį plovimą, plokštelė nusausinama sugeriamu popieriumi.

Čia svarbus atsargumas ir atidumas – būtina stengtis sumažinti bet kokią šulinėlių turinio patekimą iš vieno į kitą riziką, pasižiūrėti ir įsitikinti, kad gerai išplauta ir nėra jokių pašalinių darinių, kurie turėtų įtakos rezultatams. Jei reikia, plovimą pakartoti.

4. Į kiekvieną baseiną išpilstoma po 100 µl paruošto naudoti Anti-BHV-1-gE HRP konjugato. Paliekama inkubuotis 30 minučių kambario temperatūroje (18–25°C).

5. Plovimas:

5.1. Rankiniu arba automatinio būdu iškratomas plokštelės turinys.

5.2. Kiekvienas šulinėlis išplaunamas 5 kartus pripildant po 300 µl paruošto plovimo tirpalo (1x) ir pašalinant tirpalą iš šulinėlių po kiekvieno plovimo – iškratant plokštelę.

5.3. Atlikus paskutinį plovimą, plokštelė nusausinama sugeriamu popieriumi.

6. Į kiekvieną šulinėlį išpilstoma po 100 µl TMB substrato tirpalo.

7. Paliekama inkubuotis 15 minučių (atliekant X rinkiniu – 10 minučių) kambario temperatūroje, tamsoje. Laikas pradedamas skaičiuoti nuo pirmo substrato tirpalo pripildyto TMB šulinėlio.

8. Į kiekvieną šulinėlį išpilstoma po 100 µl „STOP“ tirpalo. Tirpalas išpilstomas tokia pačia seka, kaip ir TMB substrato tirpalas.
9. Identifikavimas. Optinis tankis mikroplokštelės šulinėliuose nuskaitomas naudojant mikroplokštelių skaitytuvą (spektrofotometrą) ir matuojant 650 nm ilgio banga. Tai reikia atlikti per 20 minučių po reakcijos sustabdymo. Spektrofotometru pirmiausia išmatuojamas tuščias plokštelės baseinas (oras). Išmatavus OT nustatomas mėginio rezultatas (teigiamas arba neigiamas).

Rezultatų pateikimas. Y rinkinio gE rezultatai yra vertintini, kai neigiamos kontrolės vidurkis atėmus teigiamos kontrolės vidurkį yra didesnis arba lygus 0,3. X rinkinio gE patikimi rezultatai, kai neigiamos kontrolės OT₄₅₀ reikšmė yra $\geq 0,500$. Teigiamos kontrolės konkurencijos procentas yra didesnis nei ≥ 75 proc.

Y rinkinio gE rezultatų apskaičiavimas. Reikia apskaičiuoti kiekvieno mėginio S / N (mėginys padalintas iš neigiamos kontrolės vidurkio (NCx) dydį:

$$S / N = \frac{\text{Mėginio OT}_{650} \text{ reikšmė}}{NCx}$$

Y rinkinio gE rezultatų apskaičiavimas. Apskaičiuojamas kiekvieno mėginio blokavimo (B) procentas, parodantis antikūnų buvimą:

$$B \% = \frac{\text{Neigiamos kontrolės OT}_{450} \text{ reikšmės vidurkis} - \text{Mėginio OT}_{450} \text{ reikšmė}}{\text{Neigiamos kontrolės OT}_{450} \text{ reikšmės vidurkis}} \times 100$$

Kraujo serumo mėginių rezultatų interpretacija (Y rinkinio gE): serumo mėginiai, kurių S / N yra $\leq 0,60$, yra laikomi teigiamais GHV-1 gE antigeno antikūnams. Serumo mėginiai, kurių S / N yra $> 0,70$, laikomi neigiamais GHV-1 gE antigeno antikūnams. X rinkinio gE rezultatų interpretavimas: mėginiai, kurių blokavimo vertės < 40 proc., yra neigiamos – specifinių antikūnų prieš GHV-1 gE negalima nustatyti arba jų nebuvo. Mėginiai su ≥ 40 proc. ir < 50 proc. blokuojančiomis vertėmis kelia įtarimų, todėl rekomenduojama gyvūnus, kurių rezultatai rodo riziką, patikrinti pakartotinai. Mėginiai, kurių blokavimo vertės yra ≥ 50 proc., yra teigiami – nustatyta specifinių antikūnų prieš GHV-1 gE.

GIRT gB tyrimų (X ir Y įmonių rinkinių) procedūra:

1. Kraujo serumo mėginių išpilstymas:
 - 1.1. Serumo mėginiai ir kontrolės skiedžiamos santykiu 1:2 su paruoštu koncentruotu (10x) plovimo tirpalu (atliekant Y rinkiniu su jau paruoštu naudoti mėginių skiedikliu). Serumų išpilstymas (2.3 lent.):

- 1.1.1. 50 µl paruošto koncentruoto (10x) plovimo tirpalo (atliekant Y rinkiniu – jau paruošto naudoti mėginių skiediklio) išpilstoma į kiekvieną šulinėlį.
- 1.1.2. Po 50 µl neigiamos kontrolės (neatskiestos) išpilstoma į A1 ir B1 šulinelius ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).
- 1.1.3. Po 50 µl teigiamos kontrolės (neatskiestos) išpilstoma į C1 ir D1 šulinelius ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).
- 1.1.4. 50 µl kiekvieno tiriamo mėginio (neatskiesto) supilama į kiekvieną likusį šulinėlį ir sumaišoma su prieš tai įpiltu skiedikliu (2.3 lent.).

Sumaišyti mėginius, kontroles su skiedikliu galima naudojant purtyklę, švelniai kratant plokštelę arba pipetavimo metu pakartotinai įtraukiant ir vėl išleidžiant į šulinėlį jo turinį (mėginys arba kontrolė ir skiediklis).

2. Inkubavimas. Skiesti serumo mėginiai ir skiestos kontrolės inkubuojami 2 valandas (± 5 min.) 37°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) temperatūroje, uždengtoje (dangteliu, aliuminio folija ar lipnia juosta) mikroplokštelėje.

3. Plovimas:

3.1. Plokštelės turinys iškratomas rankiniu arba automatiniu būdu.

3.2. Kiekvienas šulinėlis išplaunamas 5 kartus pripildant po 300 µl paruošto plovimo tirpalo (1x) ir pašalinant tirpalą iš šulinėlių po kiekvieno plovimo – iškratant plokštelę.

Jei paruošiama daug plokštelių, tokiu atveju galima palikti jas neilgiau kaip valandai pilnas plovimo tirpalo ir tai neturės įtakos testo rezultatams.

3.3. Atlikus paskutinį plovimą, plokštelė nusausinama sugeriamu popieriumi.

Čia svarbus atsargumas ir atidumas – būtina stengtis sumažinti bet kokią šulinėlių turinio patekimo iš vieno į kitą riziką, pasižiūrėti ir įsitikinti, kad gerai išplauta ir nėra jokių pašalinių darinių, kurie turėtų įtakos rezultatams. Jei reikia, plovimą pakartoti.

4. Į kiekvieną baseiną išpilstoma po 100 µl paruošto naudoti konjugato. Paliekama inkubuotis 1 valandą (± 5 min.) kambario temperatūroje ($18\text{--}25^{\circ}\text{C}$) uždengtoje plokštelėje.

5. Plovimas:

5.1. Plokštelės turinys iškratomas rankiniu arba automatiniu būdu.

5.2. Kiekvienas šulinėlis išplaunamas 5 kartus pripildant po 300 µl paruošto plovimo tirpalo (1x) ir pašalinant tirpalą iš šulinėlių po kiekvieno plovimo – iškratant plokštelę. Paskutinis plovimas itin svarbus siekiant atlikti testą gerai.

5.3. Atlikus paskutinį plovimą, plokštelė nusausinama sugeriamu popieriumi.

6. Į kiekvieną šulinėlį išpilstoma po 100 µl TMB substrato tirpalo.

7. Paliekama inkubuotis 10 minučių kambario temperatūroje, tamsoje. Laikas pradedamas skaičiuoti nuo pirmo substrato tirpalu pripildyto TMB šulinėlio.
8. Į kiekvieną šulinėlį išpilstoma po 100 µl „STOP“ tirpalo. Veiksmas atliekamas ta pačia seka, kaip ir TMB substrato tirpalo.
9. Identifikavimas. Optinis tankis mikroplokštelės šulinėliuose nuskaitomas naudojant mikroplokštelių skaitytuvą (spektrofotometrą) ir matuojant 450 nm ilgio banga. Tai atliekama per 20 minučių po reakcijos sustabdymo. Spektrofotometru pirmiausia reikia išmatuoti tuščią plokštelės baseiną (orą). Išmatavus OT nustatomas mėginio rezultatas (teigiamas arba neigiamas).

Rezultatų pateikimas. Y rinkinio gB rezultatai yra patikimi, kai neigiamos kontrolės minimali OT₄₅₀ reikšmė yra 0,500 (≥ 0,60 X rinkinio gB). Teigiamos kontrolės konkurencijos procentas yra didesnis nei 80 proc. (≥ 75 proc. X rinkinio gB).

Rezultatų apskaičiavimas. Kiekvieno mėginio blokavimo (B) procento, parodančio antikūnų buvimą, apskaičiavimas:

$$B \% = \frac{\text{Neigiamos kontrolės OT}_{450} \text{ reikšmės vidurkis} - \text{Mėginio OT}_{450} \text{ reikšmė}}{\text{Neigiamos kontrolės OT}_{450} \text{ reikšmės vidurkis}} \times 100$$

Kraujo serumo mėginių rezultatų interpretacija (Y rinkinio gB): serumo mėginiai, kurių B proc. yra < 45 proc. (X rinkinio gB ta pati reikšmė), laikomi paimti iš galvijų, kurie neturi GHV-1 viruso antikūnų, – neigiamas. Serumo mėginiai, kurių B % yra ≥ 45 proc. ir < 55 proc. (X rinkinio gB ta pati reikšmė), laikomi įtariamais. Įtariamieji mėginiai turi būti ištirti dar kartą. Jei ir pakartotinio tyrimo rezultatas įtariamasis, serumai laikomi abejotinais. Tokiu atveju geriausia dar kartą paimti gyvulio mėginių pavyzdžių ir juos ištirti iš naujo (vakcinos gali sukelti žymią serologinę reakciją. Kolostraliniai (motininiai) antikūnai aptinkami iki 6 mėnesių amžiaus veršeliuose). Serumo mėginiai, kurių B % yra > 55 proc. (X rinkinio gB ta pati reikšmė), laikomi paimtais iš galvijų, kurie turi GHV-1 viruso antikūnų, – teigiami.

Metodo, rinkinio patvirtinimas. Y ir X rinkinių, skirtų GIRT gE aptikti, metodas patvirtinamas atkuriamumu, kai atlikti dviejų mėginių matavimai dviejose plokštelėse dviejų žmonių kartojant mėginį po keturiolika kartų parodė vienodas OT reikšmes. Pakartojamumas: atlikti dviejų mėginių matavimai vienoje plokštelėje – vienas žmogus kartojo mėginį keturiolika kartų. Lyginant šiuos rezultatus su aukščiau pateiktais atkuriamumo rezultatais, galima daryti išvadą, kad jie beveik identiški.

Y ir X rinkinių, skirtų GIRT gB aptikti, metodas patvirtinamas atkuriamumu, kai atlikti vieno mėginio matavimai dviejose plokštelėse dviejų žmonių kartojant mėginį po

keturis kartus parodė vienodas OT reikšmes. Pakartojamumas: atlikti vieno mėginio matavimai – vienoje plokštelėje vienas žmogus kartojo mėginį keturis kartus. Lyginant šiuos rezultatus su aukščiau pateiktais atkuriamumo rezultatais, galima spręsti, kad jie beveik identiški.

2.2.2. Duomenų analizė

Žemėlapiams sudaryti naudota QGIS 2.18.20 (atviro kodo geografinė informacinė sistema (GIS). Lietuvos Respublikos teritorijos M 1:1 000 000 georeferencinių erdviųjų duomenų rinkinys pagal tarptautinio projekto „EuroGlobalMap“ reikalavimus – EGM_1000LT, užsakytas iš geoportal.lt.

Duomenų statistinė analizė atlikta naudojant „R3.5.3“ ir „Excel 2010“ programas. Pirmiausiai buvo apskaičiuoti kintamųjų procentiniai dažniai. Tikrinant statistinių išvadų reikšmingumą vertintas Chi kvadranto kriterijus (χ^2). Buvo tikrinama, ar proporcijos reikšmingai skiriasi. Sprendimui priimti naudota p-reikšmė ir pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$. Tuomet, jei $p < \alpha$, hipotezė H_0 atmetama. Jei $p \geq \alpha$, hipotezė H_0 neatmetama.

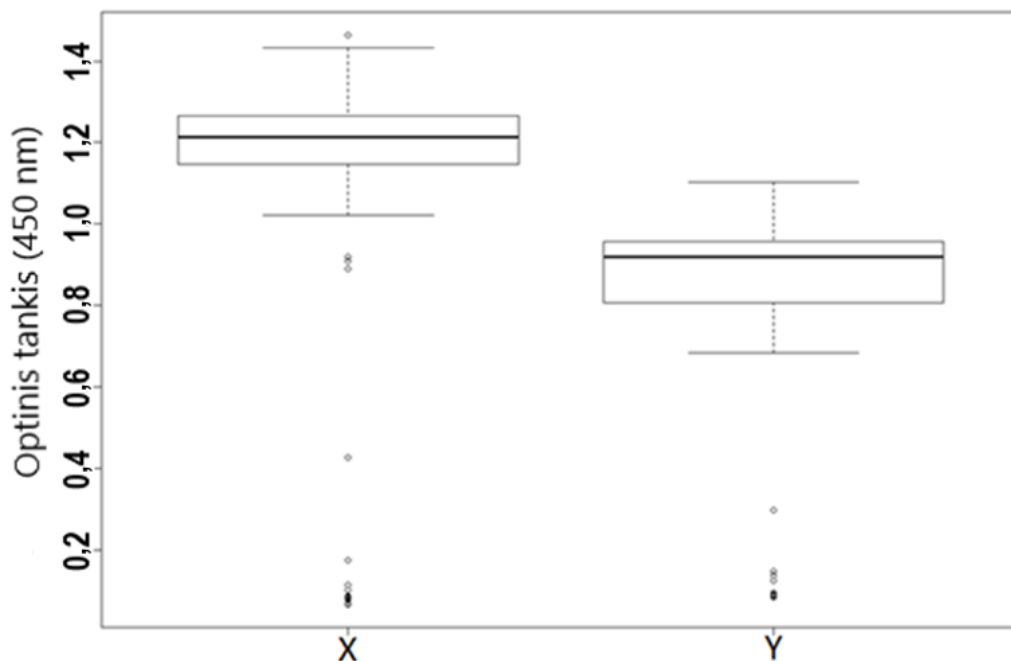
Norint palyginti, ar dviejų skirtingų gamintojų rinkiniais gautų rezultatų vidurkiai vienodi, pirmiausiai patikrinta, ar duomenys yra pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį. Tam naudotas Šapiro-Vilk (angl. „Shapiro–Wilk“) testas. Visais atvejais buvo gauta, kad duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį (gautos p reikšmės $< 0,0001$, $W=0,53962-0,96998$), todėl naudotas neparametrinis priklausomų imčių Vilkoksono (angl. „Wilcoxon“) testas ir lyginta, ar skirstiniai vienodi, ar skiriasi.

3. REZULTATAI

3.1. Dviejų skirtingų gamintojų – X ir Y – komercinių imunofermentinės analizės rinkinių palyginimas

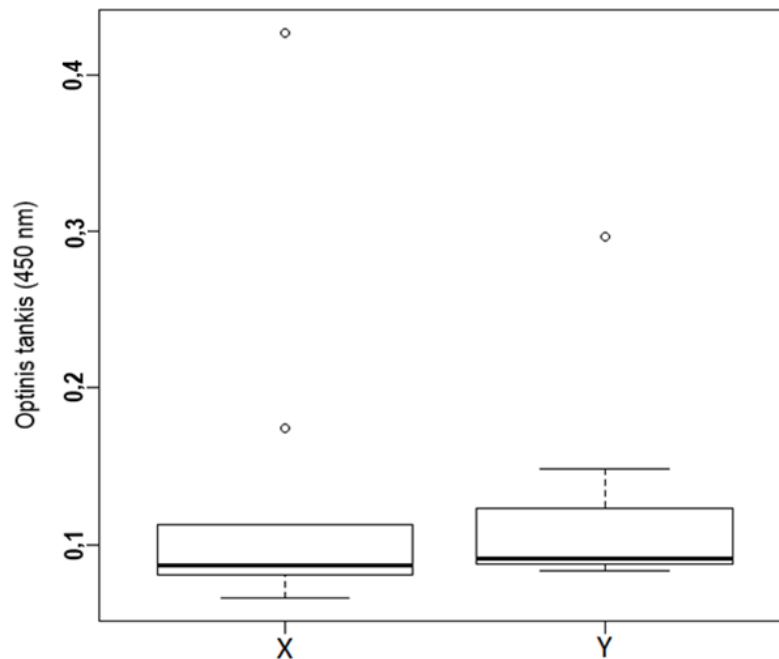
Viena iš šio tyrimo užduočių – palyginti dviejų skirtingų gamintojų – X ir Y – komercinius imunofermentinės analizės rinkinius, skirtus antikūnams prieš galvijų infekcinio rinotracheito glikoproteino B arba, priklausomai nuo lyginamų rinkinių, gE aptikti. Šis rinkinių lyginimas yra paremtas jų jautrumu (nustatytu optiniu tankiu), kuris suteikia galimybę aptikti atitinkamus antikūnus. Gauti skirtingų gamintojų rinkinių – tiek skirtų GIRT gB, tiek gE – testų rezultatų vidurkiai buvo lyginami naudojant neparametrinį priklausomų imčių Wilcoxon testą (kadangi duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį).

Atlikus bendrą GIRT gB testo mėginių ($n = 172$, teigiamų – 13, neigiamų – 159) optinių tankių palyginimą, gauta, kad $V = 14803$, $p < 0,0001$, kas reiškia, kad šių dviejų skirtingų testų skirstiniai skiriasi statistiškai reikšmingai. Stačiakampėje diagramoje (angl. *boxplot*) (3.1 pav.) matyti, kad X testu gautos reikšmės yra didesnės.



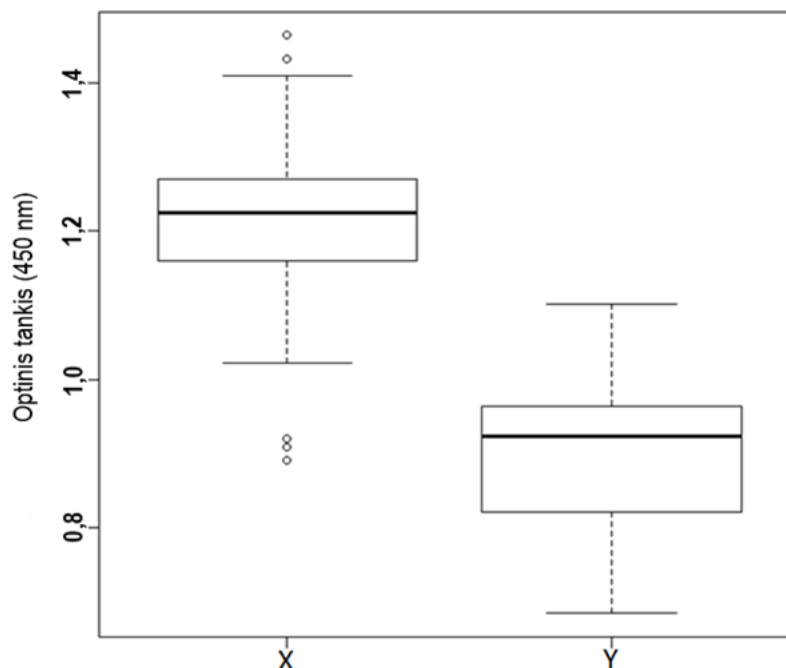
3.1 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gB testo mėginių ($n = 172$) stačiakampė diagrama.

Analizuojant gB teigiamų mėginių ($n = 13$) optinius tankius, gauta, kad $V = 56$, $p = 0,4973$. Tai rodo, kad šių dviejų skirtingų testų skirstiniai yra vienodi. 3.2 pav. matyti, jog gautos abiejų testų reikšmės statistiškai reikšmingai nesiskiria.



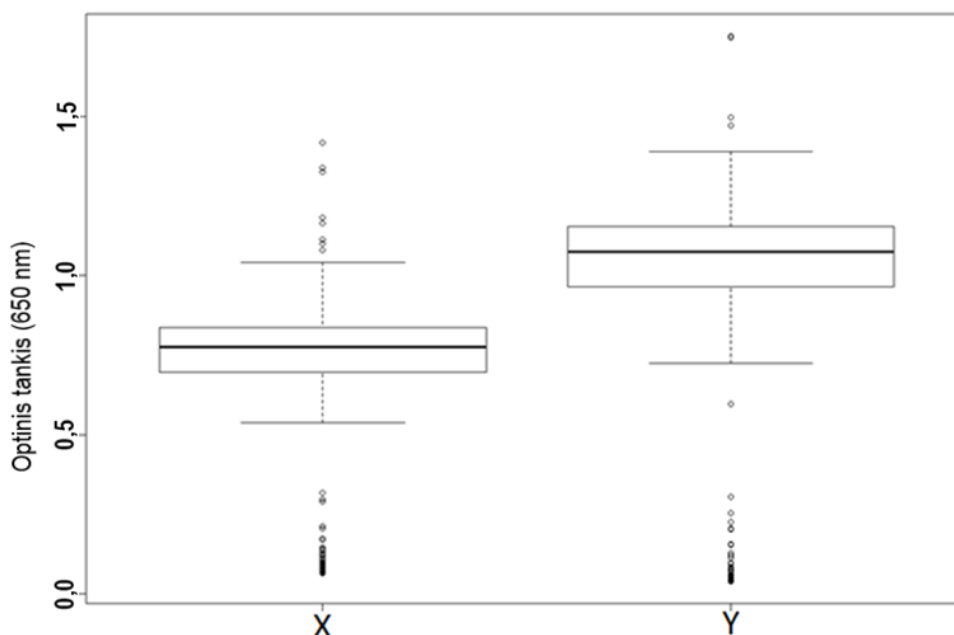
3.2 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gB testo teigiamų mėginių ($n = 13$) stačiakampė diagrama.

Analizuojant gB neigiamų mėginių optinius tankius, iširta, jog $V = 12712$, $p < 0,0001$ – šių dviejų skirtingų testų skirstiniai skiriasi statistiškai reikšmingai. 3.3 pav. pavaizduota, kad X testu gautos reikšmės didesnės.



3.3 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gB testo neigiamų mėginių ($n = 159$) stačiakampė diagrama.

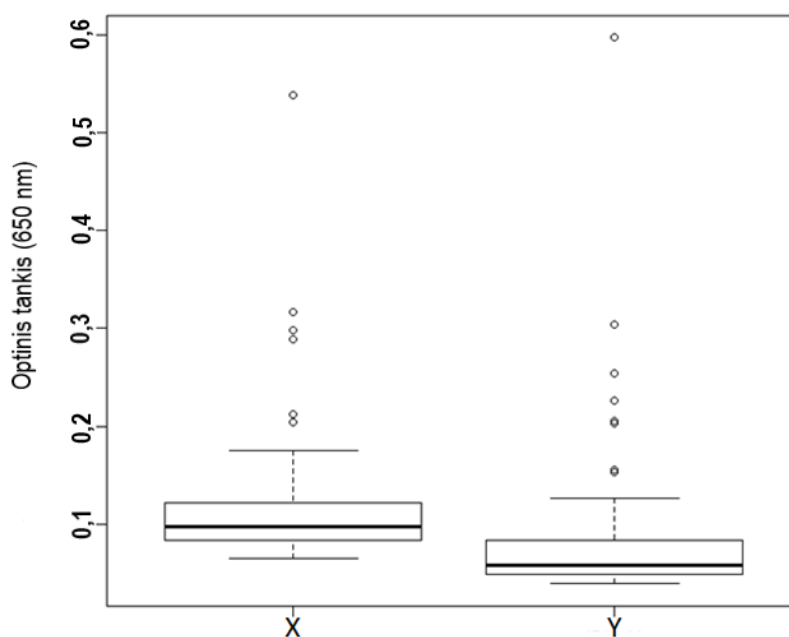
Atlikus bendrą GIRT gE testo mėginių ($n = 295$, teigiamų – 58, neigiamų – 239) palyginimą, gauti rezultatai – $V = 2715,5$, $p < 0,0001$, – reiškiantys, kad šių dviejų skirtingų testų skirstiniai skiriasi statistiškai reikšmingai. Grafike (3.4 pav.) pavaizduota, jog X testu gautos reikšmės yra mažesnės.



3.4 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gE testo mėginių ($n = 295$) stačiakampė diagrama.

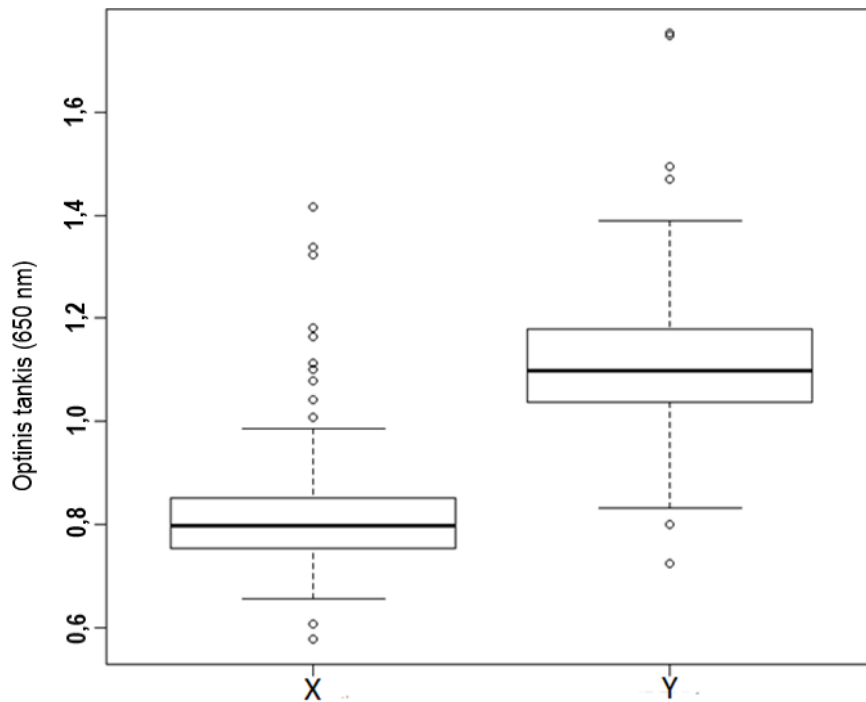
Toliau analizuojant gE teigiamų mėginių optinius tankius, gauta V reikšmė, kuri lygi 1255,5, ir p reikšmė – 0,0001931, – tai reikšmingai statistiškai besiskiriantys testų skirstiniai.

3.5 pav. grafike matyti, kad X testu gautos reikšmės yra didesnės negu Y testu.



3.5 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gE testo teigiamų mėginių ($n = 58$) stačiakampė diagrama.

Analizuojant gE neigiamų mėginių optinius tankius, gauti rezultatai ($V = 544,5$, $p < 0,0001$) reiškiantys, kad šių dviejų skirtingų testų skirstiniai skiriasi statistiškai reikšmingai. Stačiakampėje diagramoje (3.6 pav.) matoma, kad X testu gautos reikšmės mažesnės.



3.6 pav. X ir Y rinkiniais tirtu GIRT gE testo neigiamų mėginių ($n = 239$) stačiakampė diagrama.

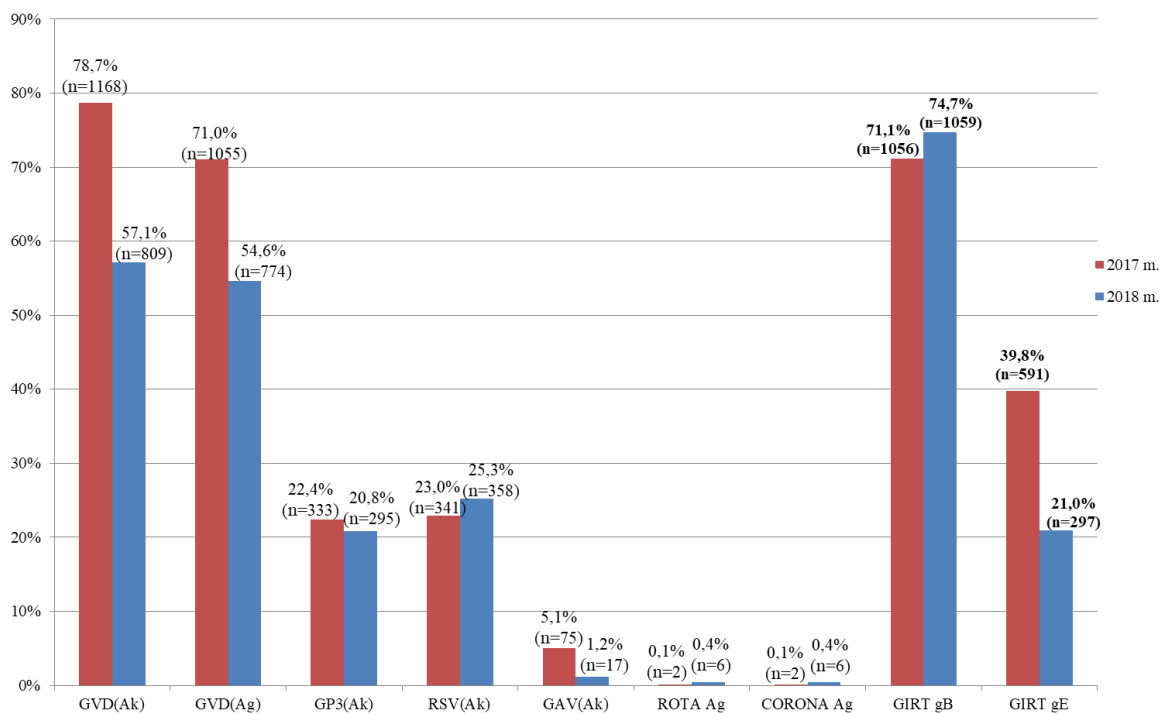
3.2. Aktualumas

2017 m. ištirti 1485 galvijai (3.7 pav.). Siekiant pagrįsti šio darbo aktualumą, atlikta gautų rezultatų statistinė analizė. Atlikus proporcijų lygybės testą nustatyta, kad GIRT gB ir GVD (Ag) proporcijos yra lygios ($p = 1$) ir tiriamos dažniau negu GIRT gE ($p < 0,0001$, t. y. $p < 0,05$), o GVD (Ak) ištiriama daugiau negu GIRT gB ($p < 0,0001$) ir gE ($p < 0,0001$). Tarp visų kitų atliekamų tyrimų dominuoja GIRT gB bei gE ($p < 0,0001$).

2018 metais ištirta 1417 galvijų (3.7 pav.). Atlikus analizę nustatyta, kad GIRT gB tyrimas buvo atliekamas dažniau negu visi kiti tyrimai ($p < 0,0001$). GVD (Ag), GVD (Ak) ir GIRT gB buvo ištirta daugiau negu GIRT gE ($p < 0,0001$). GIRT gE ir GP3 (Ak) ($p = 0,9631$), RSV (Ak) ($p = 0,07503$) proporcijos lygios, tarp kitų tyrimų gE ištiriama daugiau ($p < 0,0001$).

Palyginus 2017 m. ir 2018 m. atliktų tyrimų pasiskirstymą paaiškėjo, kad GIRT gB tyrimų dažnis 2018 m. padidėjo ($p = 0,03129$), bet 2017 m. GIRT gE buvo ištiriama daugiau ($p < 0,0001$) negu 2018 m.

Atlikus analizę paaiškėjo, kad tiek 2017 m., tiek 2018 m. tyrimų, susijusių su galvijų pirmo tipo herpes virusu, atlikimo dažnis, palyginus su kitais atliekamais galvijų virusinių susirgimų tyrimais, didelis. Be to, per metus laiko padidėjo GIRT gB tyrimų užsakymų skaičius bendrų atliekamų tyrimų atžvilgiu, iš ko galima spręsti, kad Lietuvoje šie GIRT gB tyrimai paklausūs.

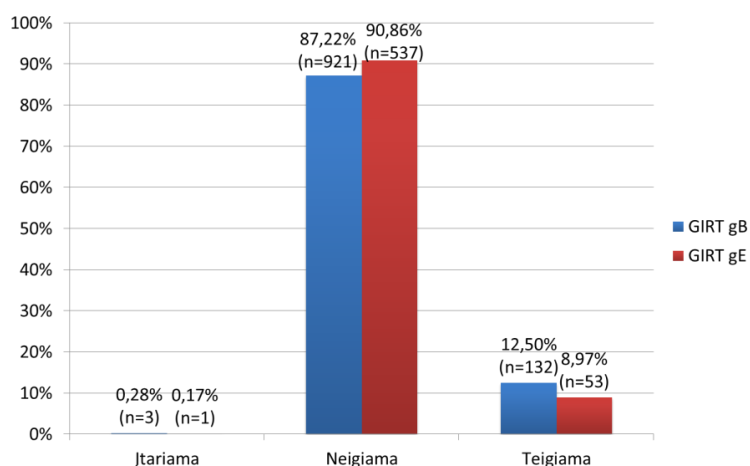


3.7 pav. Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Virusologinių tyrimų skyriuje atliktų galvijų virusinių susirgimų tyrimų procentinis pasiskirstymas. 2017 metais iš viso ištirti 1485 galvijai, 2018 metais – 1417 galvijų.

3.3. Sergamumas

Išanalizavus per 2017 m. atliktų galvijų IRT gB antikūnų tyrimų duomenis paaiškėjo, kad iš 1056 ištirtų galvijų – 87 proc. ($n = 921$) buvo seroneigiami, o seroteigiami sudarė beveik 13 proc. ($n = 132$). Tik 0,28 proc. ($n = 3$) ištirtų mėginių laikyti įtariamais, t. y. apskaičiuota serumo mėginio (su blokavimu) reikšmė didesnė arba lygi 45 proc., bet mažesnė nei 55 proc. 2017 m. GIRT gB seroneigiamų galvijų aptikta daugiau negu seroteigiamų ($p < 0,0001$ ($p < 0,05$)). Tyrimų rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.

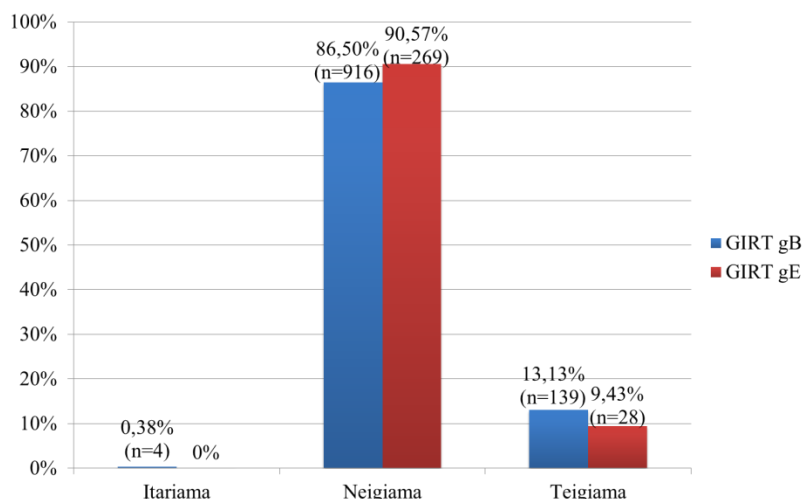
Išanalizavus per 2017 m. atliktų GIRT gE antikūnų tyrimų duomenis paaiškėjo, kad iš 591 ištirtų galvijų beveik 91 proc. ($n = 537$) buvo seroneigiami, o seroteigiami sudarė apie 9 proc. ($n = 53$). Tik vienas ($n = 1$, (0,17 proc.)) mėginys laikytas įtariamu. 2017 m. GIRT gE seroneigiamų buvo aptikta daugiau negu seroteigiamų galvijų ($p < 0,0001$). Tyrimų rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.



3.8 pav. 2017 m. galvijų IRT gB (iš viso ištirta 1056) ir gE (iš viso ištirta 591) antikūnų serologinių tyrimų rezultatų pasiskirstymas.

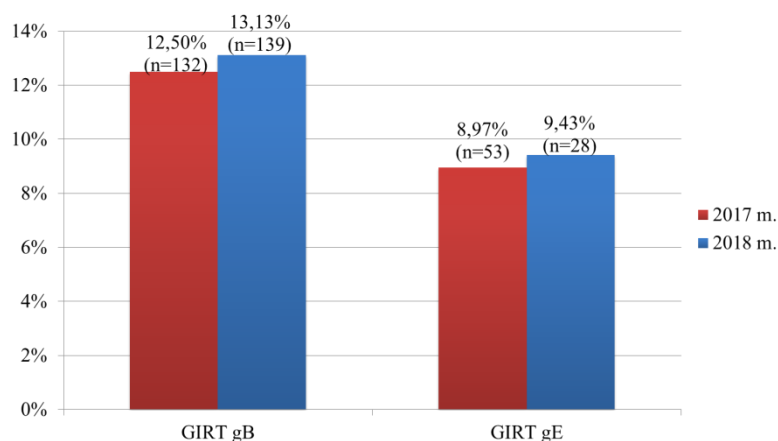
Išanalizavus per 2018 m. atliktų galvijų IRT gB antikūnų tyrimų duomenis (3.9 pav.) paaiškėjo, kad iš 1059 ištirtų galvijų – 86,50 proc. (n = 916) buvo seroneigiami, o seroteigiami sudarė 13,13 proc. (n = 139). Vos 0,38 proc. (n = 4) iš ištirtų mėginių buvo laikomi įtariamais. GIRT gB seroneigiamų buvo ištiriama daugiau negu seroteigiamų ($p < 0,0001$).

Išanalizavus per 2018 m. atliktų GIRT gE antikūnų tyrimų duomenis (3.9 pav.) paaiškėjo, kad iš 297 ištirtų galvijų, beveik 91 proc. (90,57 proc.) (n = 269) buvo seroneigiami, o seroteigiami sudarė apie 9,43 proc. (n = 28). Įtariamųjų mėginių nerasta. GIRT gE, kaip ir gB, dažniau ištirta seroneigiamų negu seroteigiamų ($p < 0,0001$).



3.9 pav. 2018 m. galvijų IRT gB (iš viso ištirti 1059) ir gE (iš viso ištirti 297) antikūnų serologinių tyrimų rezultatų pasiskirstymas.

Palyginus 2017 m. ir 2018 m. duomenis, iškelta hipotezė, kad seroteigiamų rezultatų tarp gB antikūnų proporcijos yra vienodos, buvo patvirtinta: $p = 0,7149$ ($p > 0,05$). Nustatyta, kad ir seroteigiamų gE dažnis vienodas: $p = 0,9196$ ($p > 0,05$). Remiantis tirti atvežtais mėginiais, sergamumo dažnis per metus nepakito. Tyrimų rezultatai pateikti 3.10 paveiksle.

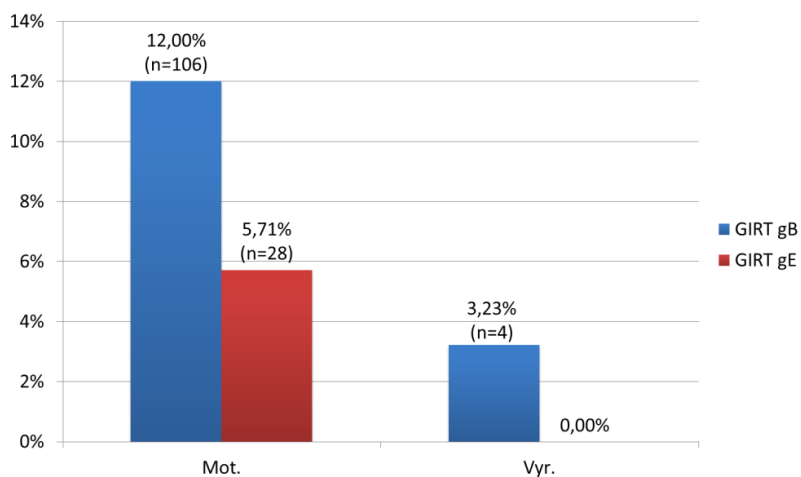


3.10 pav. GIRT gB ir gE seroteigiamų rezultatų procentinis dažnis 2017 m. – gB (iš viso ištirti 1056) ir gE (iš viso ištirtas 591) – bei 2018m. – gB (iš viso ištirti 1059) ir gE (iš viso ištirti 297) – palyginimas.

3.4. Pasiskirstymas pagal lytį

Atliekant tyrimą tikrinta hipotezė, ar 2017 m. teigiamų GIRT gB testo rezultatų proporcijos vyrų ir moterų grupėse (3.11 pav.) yra vienodos. Gauta p reikšmė, kuri lygi 0,005422, t. y. $p < 0,05$, taigi hipotezė atmetama. Išvada: moteriškos lyties galvijams dažniau nustatomas seroteigiamas GIRT gB.

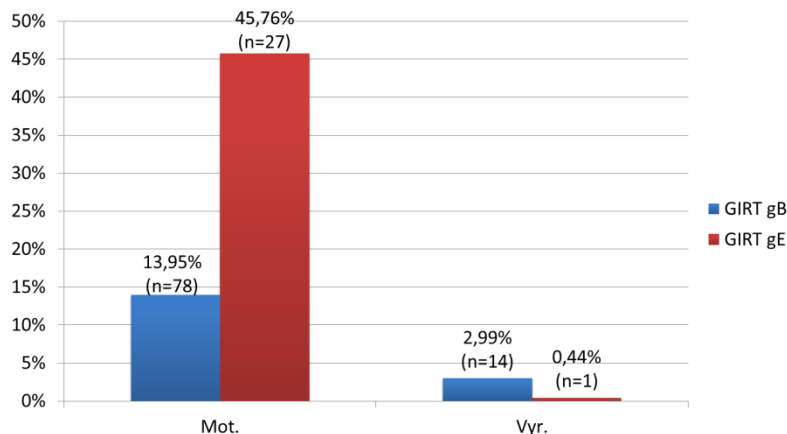
Dar viena tyrimo hipotezė – kad 2017 m. teigiamų GIRT gE testo rezultatų proporcijos vyriškos ir moteriškos lyties grupėse (3.11 pav.) yra vienodos, tačiau dėl per mažos vyriškos lyties galvijų imties GIRT gE testo rezultatų negalima lyginti pagal lytis.



3.11 pav. 2017 m. GIRT gB (iš viso ištirta: mot. 883, vyr. 124) ir gE (iš viso ištirta: mot. 490, vyr. 74) seroteigiamų rezultatų procentinis dažnis pagal lytį.

Tyrimo metu buvo tikrinama hipotezė, kad 2018 m. teigiamų GIRT gB testo rezultatų proporcijos vyriškos ir moteriškos lyties grupėse (3.12 pav.) yra vienodos. Gauta p reikšmė – $< 0,0001$, t. y. $p < 0,05$, taigi pradinė hipotezė, kad teigiamų GIRT gB testo rezultatų proporcijos pagal lytį nesiskiria, atmetama. Nustatyta, kad moteriškos lyties galvijai dažniau negu vyriškos buvo detektuojami kaip gB seroteigiami.

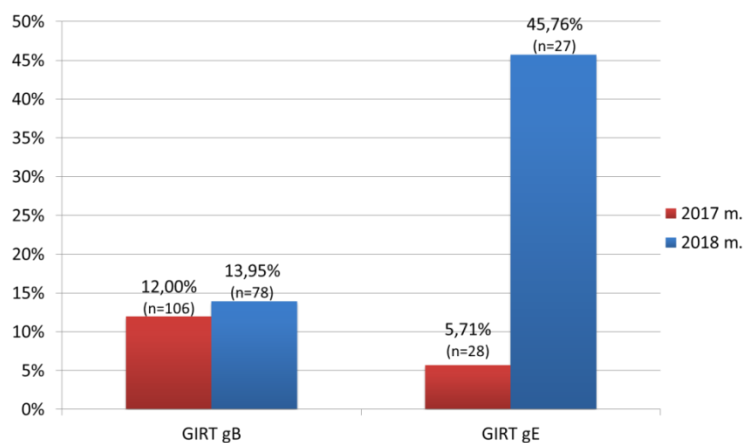
Tikrinta hipotezė, ar 2018 m. teigiamų GIRT gE testo rezultatų proporcijos vyrų ir moterų grupėse yra vienodos. Gauta p reikšmė, lygi $< 0,0001$, t. y. $p < 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Galima daryti išvadą, jog moteriškos lyties galvijams dažniau nustatomas seroteigiamas GIRT gE.



3.12 pav. 2018 m. GIRT gB (iš viso ištirta: mot. – 559, vyr. – 468) ir gE (iš viso ištirta: mot. – 59, vyr. – 228) seroteigiamų rezultatų procentinis dažnis pagal lytį.

Siekiant palyginti 2017 ir 2018 m. rezultatus (3.13 pav.), iškelta hipotezė, kad seroteigiamų moteriškos lyties rezultatų proporcijos tarp gB antikūnų yra vienodos. Hipotezė buvo patvirtinta: $p = 0,3174$ ($p > 0,05$) – gB seroteigiamų moteriškos lyties galvijų dažnis nepakito. Taip pat iškelta hipotezė, kad gB seroteigiamų vyriškos lyties rezultatų proporcijos 2017 ir 2018 m. yra vienodos. Hipotezė buvo patvirtinta: $p = 1$ – gB seroteigiamų vyriškos lyties galvijų dažnis nepakito.

Tęsiant 2017 ir 2018 m. rezultatų palyginimą (3.13 pav.), patikrinta, ar gE seroteigiamų moteriškos lyties rezultatų proporcijos yra vienodos. Hipotezė buvo atmesta, nes $p < 0,0001$ ($p < 0,05$). Tai rodo, kad moteriškos lyties galvijų sergamumas (tiriant su gE) 2018 metais, palyginti su 2017, padidėjo. Dėl 2017 m. mažos vyriškos lyties galvijų imties ($n = 74$) negalima lyginti 2017 ir 2018 m. gE seroteigiamų rezultatų pagal vyrišką lytį.



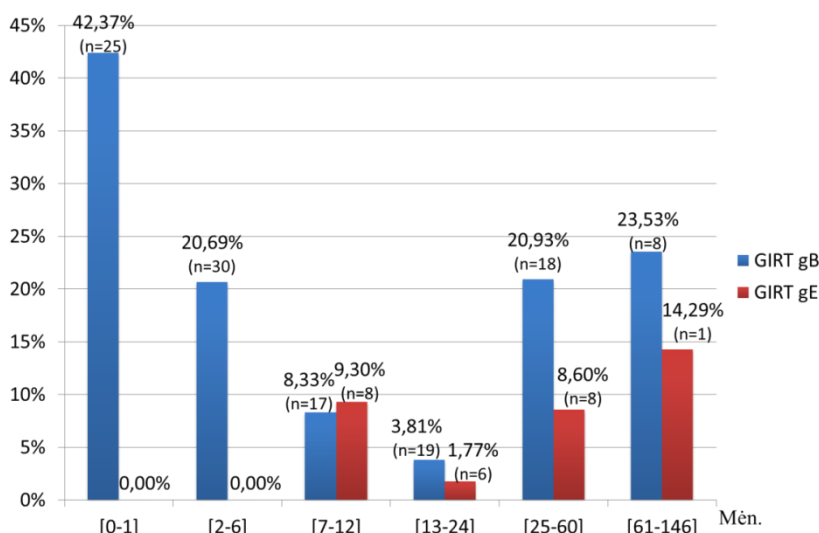
3.13 pav. GIRT gB ir gE seroteigiamų rezultatų procentinis dažnis pagal moterišką lytį, 2018 m. (iš viso ištirta: gB mot. – 559 ir gE mot. – 59) ir 2017 m. (iš viso ištirta: gB mot. – 883 ir gE mot. n – 490) palyginimas.

3.5. Pasiskirstymas pagal amžių

Siekiant patvirtinti arba paneigti išsikeltą hipotezę, kad 2017 m. seroteigiamų testo rezultatų GIRT gB (3.14 pav.) skirtingų amžiaus grupių proporcijos yra vienodos, atliktas proporcijų lygybės testas. Gauta p reikšmė $< 0,0001$, taigi hipotezė atmetama. Proporcijų lygybės testas taip pat parodė, kuriose grupėse dažniau nustatoma seroteigiamų galvijų. Jų daugiausiai buvo 0–1 mėnesio grupėje – apytiksliai 42 proc. seroteigiamų. Didesnė tikimybė, kad šioje grupėje bus gB seroteigiamas negu 2–6 mėn. grupėje, kur tokių beveik 21 proc. ($p = 0,002787$). Kitų amžiaus grupių pasiskirstymas toks: 7–12 mėn. – 8 proc. ($p < 0,0001$), 13–24 mėn. – 4 proc. ($p < 0,0001$) ir 25–60 mėn. – 21 proc. ($p = 0,009539$). Pastebėtina, kad 0–1 mėn. proporcijos su 61–146 mėn. amžiaus grupe, kurią sudaro beveik 24 proc. seroteigiamų, yra vienodos: $p = 0,1087$, t. y. $p > 0,05$. Seroteigiamų rezultatų proporcijos 2–6 mėn. ir 25–60 mėn. ($p = 1$), 2–6 mėn. ir 61–146 mėn. ($p = 0,8954$) amžiaus grupėse yra vienodos, gauta p reikšmė $> 0,05$. Todėl teigiamo rezultato tikimybė šiose amžiaus grupėse vienoda. 0–1 mėn., 2–6 mėn. amžiaus grupėse dažniau nustatoma seroteigiamų galvijų negu 7–12 mėn. ir 13–24 mėn. amžiaus grupėse ($p < 0,0001$). 7–12 mėn. amžiaus grupėje teigiami rezultatai dažnesni negu 13–24 grupėje ($p = 0,02248$). gB seroteigiami rezultatai dažniau negu 7–12 mėn. ($p = 0,00495$) ir 13–24 mėn. ($p < 0,0001$) amžiaus grupes pasitaikydavo 25–60 mėn. Nepaminėti amžiaus grupių palyginimai šiame darbe nepateikiami dėl galimos nepatikimos rezultatų analizės, nulemtos imčių skirtumų.

Atliekant tyrimą buvo išsikelta hipotezė, kad 2017 m. skirtingų amžiaus grupių teigiamų testo rezultatų GIRT gE (3.14 pav.) proporcijos yra vienodos. Atlikus proporcijų lygybės testą gauta p reikšmė, lygi 0,002323, t. y. $p < 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Atliktas proporcijų lygybės testas, kurio tikslas – nustatyti, kuriose grupėse statistiškai reikšmingai dažniau nustatoma seroteigiamų galvijų. Ištirta, kad 7–12 mėn. amžiaus tarpsniu seroteigiami rezultatai, kurie sudaro apie 9 proc., pasitaiko dažniau negu 13–24 mėn. (kur apytiksliai 2

proc. seroteigiamų). Gautasis $p = 0,001593$ ($p < 0,05$). Taikant proporcijų lygybės testą nustatyta ir dar viena grupė, kurios seroteigiamo gE pasireiškimas statistiškai reikšmingai skiriasi ($p = 0,003022$) nuo kitų – tai 25–60 mėn. amžiaus grupė, kurioje seroteigiamo gE aptikti beveik 9 proc. – tai yra dažniau negu 13–24 mėn. grupėje, kurioje, kaip jau minėta, gauta apie 2 proc. teigiamų rezultatų. Likusiose grupėse nebuvo nustatyto statistiškai reikšmingo skirtumo – $p > 0,05$.

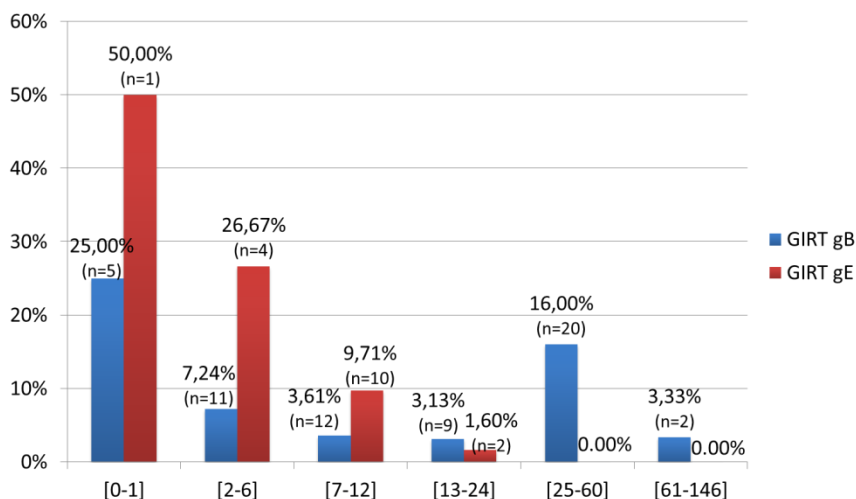


3.14 pav. 2017 m. GHV-1 infekcijos paplitimas pagal galvijų amžiaus grupes (pagal GIRT gB (iš viso ištirta: [0–1] n = 59, [2–6] n = 145, [7–12] n = 204, [13–24] n = 499, [25–60] n = 86, [61–146] n = 34) ir gE (iš viso ištirta: [0–1] n = 9, [2–6] n = 24, [7–12] n = 86, [13–24] n = 339, [25–60] n = 93, [61–146] n = 7) antikūnus).

Prieš atliekant tyrimą hipotetiškai manyta, kad 2018 m. atliktų tyrimų teigiamų testo rezultatų GIRT gB (3.15 pav.) proporcijos skirtingose amžiaus grupėse yra vienodos. Atlikus proporcijų lygybės testą gauta p reikšmė $< 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Tikslingai atliktas proporcijų lygybės testas, kuriuo siekta nustatyti, kuriose grupėse dažniau nustatoma seroteigiamų galvijų. Nustatyta, kad didesnė tikimybė, jog 25–60 mėn. amžiaus grupė, kurią sudarė 16 proc. gB seroteigiamų tyrimo rezultatų, bus teigiami negu 61–146 mėn. (3,33 proc. seroteigiamų) amžiaus grupės galvijai ($p = 0,02451$). Taip pat 25–60 mėn. amžiaus grupėje gB seroteigiami dažnesni negu 2–6 mėn. ($p = 0,0348$), 7–12 mėn. ($p < 0,0001$) ir 13–24 mėn. ($p < 0,0001$) amžiaus grupių galvijų. Seroteigiamų rezultatų proporcijos tarp 2–6 mėn., 7–12 mėn. ir 13–24 mėn. amžiaus grupių yra vienodos, gauta p reikšmė $> 0,05$, todėl teigiamo rezultato tikimybė šiose amžiaus grupėse yra vienoda. Dėl mažos 0–1 mėn. amžiaus grupės imties, lyginant su kitomis amžiaus grupėmis, statistinė analizė, orientuota į 0–1 mėn. amžiaus grupę, laikoma nepateikiama, todėl šiame darbe nepateikiama.

Išsikelta hipotezė, ar 2018 m. teigiamų testo rezultatų GIRT gE (3.15 pav.) proporcijos skirtingose amžiaus grupėse yra vienodos. Atlikus proporcijų lygybės testą gauta p reikšmė, $< 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Toliau atliktas proporcijų lygybės testas, kurio

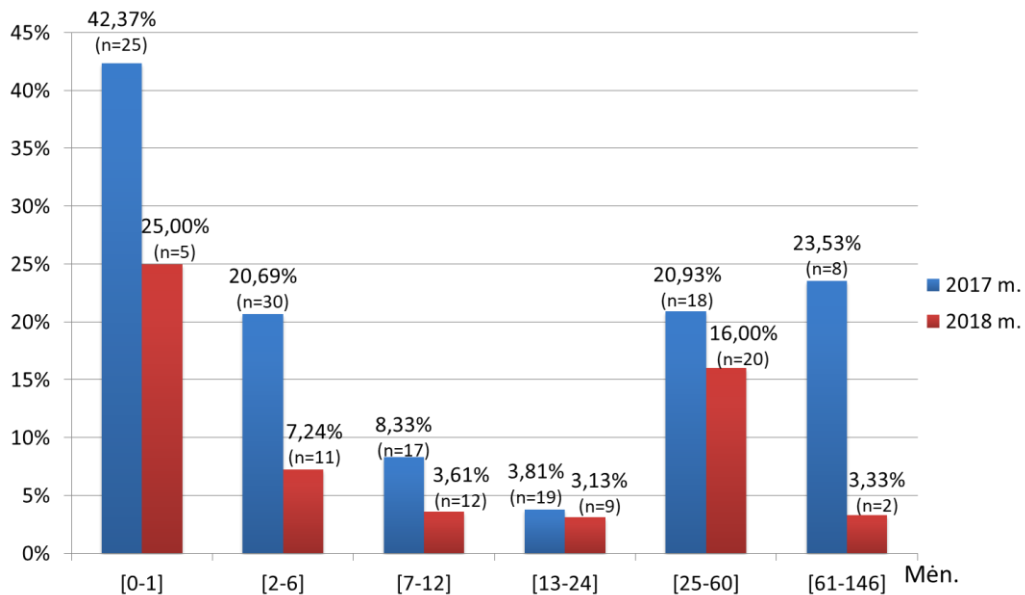
tikslas – nustatyti, kuriose grupėse statistiškai reikšmingai dažniau nustatoma seroteigiamų galvijų. Gauti duomenys, kad 7–12 mėn. seroteigiami rezultatai, kurie sudaro beveik 10 proc., pasitaiko dažniau negu 13–24 mėn. (apytiksliai 2 proc. seroteigiamų), gautasis $p = 0,01506$ ($p < 0,05$). Analizuojant kitas amžiaus grupes nustatyta, kad likusioms amžiaus grupėms taikomi statistiniai metodai dėl duomenų pasiskirstymo būtų nepatikimi ir išvados būtų klaidingos, todėl gauti rezultatai nepateikiami.



3.15 pav. 2018 m. GHV-1 infekcijos paplitimas pagal galvijų amžiaus grupes (pagal GIRT gB (iš viso ištirta: [0–1] $n = 20$, [2–6] $n = 152$, [7–12] $n = 332$, [13–24] $n = 288$, [25–60] $n = 125$, [61–146] $n = 60$) ir gE (iš viso ištirta: [0–1] $n = 2$, [2–6] $n = 15$, [7–12] $n = 103$, [13–24] $n = 125$, [25–60] $n = 28$, [61–146] $n = 10$) antikūnus).

Palyginus 2017 ir 2018 m. rezultatus (3.16 pav.) buvo nustatyta, kad gE seroteigiamų dažnis 7–12 mėn. amžiaus grupėje nepasikeitė: 2018 m. (9,71 proc.) liko toks pat kaip ir 2017 m. (9,30 proc.). Pastebėta, kad 2018 m. 7–12 mėn. amžiaus grupės seroteigiamų dažnis atitinka 2017 m. 25–60 mėn. (8,60 proc.) amžiaus grupės duomenis. Kitos gE 2017 m. ir 2018 m. lyginimo pagal amžiaus grupes interpretacijos būtų nepatikimos dėl netinkamo duomenų pasiskirstymo, todėl čia neaptariamos.

Lyginant gB 2017 m. ir 2018 m. rezultatus (3.16 pav.) buvo aiškinamasi, ar nepakito seroteigiamumas tose pačiose amžiaus grupėse: proporcija tarp 2017 m. ir 2018 m. 0–1 mėn. amžiaus grupių yra vienoda – $p = 0,264$, taip pat ir 25–60 mėn. amžiaus grupėje ($p = 0,4633$). 2–6 mėn. amžiaus grupių proporcijos išsiskyrė (gauta p reikšmė – 0,00273): paaiškėjo, kad 2017 m. seroteigiamumo dažnis šioje amžiaus grupėje buvo didesnis (beveik 21 proc.) negu 2018 m., kuriais seroteigiamumas sudarė apytiksliai 7 procentus. 7–12 mėn. amžiaus grupėje gB seroteigiami galvijai detektuoti statistiškai reikšmingai ($p = 0,0317$) dažniau 2017 m. (8 proc.) negu 2018 m. (apytiksliai 4 proc.). Atlikus 13–24 mėn. grupės analizę paaiškėjo, kad proporcija vienoda ($p = 0,7655$), gB seroteigiamumas šioje amžiaus grupėje nepakito.

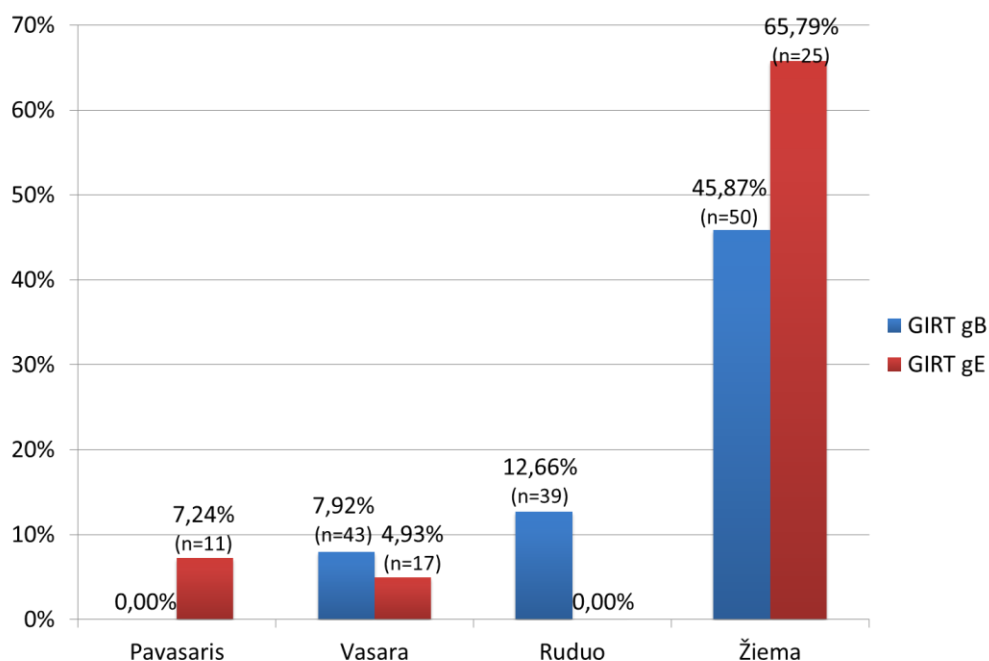


3.16 pav. GHV-1 infekcijos paplitimas pagal galvijų amžiaus grupes, pagal GIRT gB antikūnus. 2017 m. (iš viso ištirta: [0–1] n = 59, [2–6] n = 145, [7–12] n = 204, [13–24] n = 499, [25–60] n = 86, [61–146] n = 34) ir 2018 m. (iš viso ištirta: [0–1] n = 20, [2–6] n = 152, [7–12] n = 332, [13–24] n = 288, [25–60] n = 125, [61–146] n = 60) palyginimas.

3.6. Pasiskirstymas pagal metų laikus

Atliekant tyrimą tikrinta hipotezė, ar teigiamų 2017 m. GIRT gE testo rezultatų (3.17 pav.) proporcijos skirtingais metų laikais yra vienodos. Gauta p reikšmė $< 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Statistiškai reikšmingai dažniau gE seroteigiamų rezultatų nustatoma žiemą negu pavasarį ($p < 0,0001$) arba vasarą ($p < 0,0001$). Proporcija su rudenį atliekamų tyrimų rezultatais dėl nepakankamo duomenų kiekio negalėjo būti patikrinta.

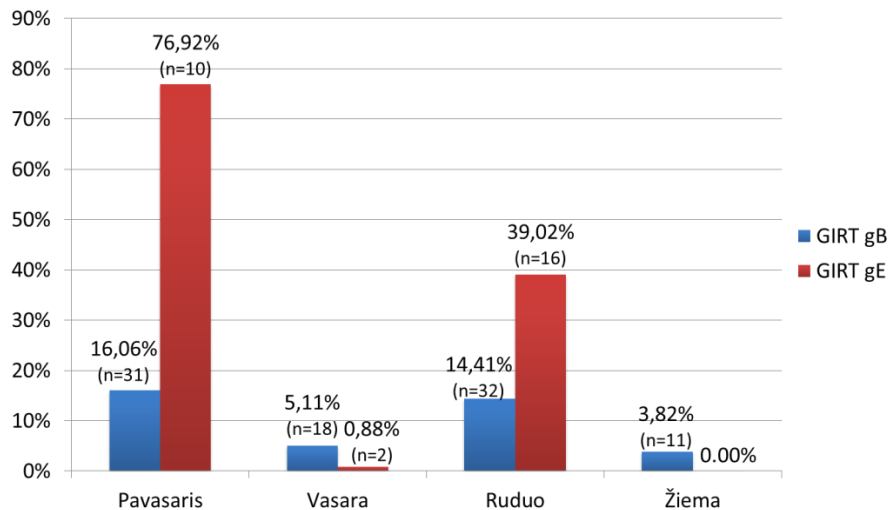
Toliau analizuota, ar teigiamų 2017 m. GIRT gB testo rezultatų (3.17 pav.) proporcijos skirtingais metų laikais yra vienodos. Gauta p reikšmė, kuri $< 0,05$, taigi hipotezė atmesta. GIRT gB seroteigiami dažniau nustatomi žiemą negu visais kitais metų laikais: pavasarį ($p < 0,0001$), vasarą ($p < 0,0001$), rudenį ($p < 0,0001$). Taip pat gB seroteigiamų rezultatų dažniau nustatoma rudenį negu pavasarį ($p = 0,0006447$) ar vasarą ($p = 0,03296$). Be to, vasarą seroteigiamumas dažniau nustatomas negu pavasarį ($p = 0,009682$).



3.17 pav. Galvijų IRT antikūnų tipų pasiskirstymas pagal metų laikus 2017 metais (iš viso ištirta: gB pavasarį n = 93, vasarą n = 543, rudenį n = 308, žiemą n = 109, gE pavasarį n = 152, vasarą n = 345, rudenį n = 55, žiemą n = 38).

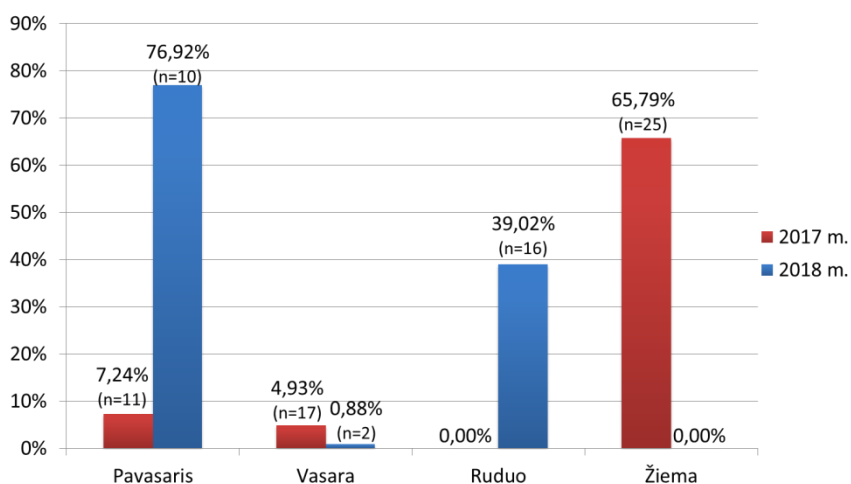
Buvo tikrinama hipotezė, ar 2018 m. teigiamų GIRT gE testo rezultatų (3.18 pav.) proporcijos skirtingais metų laikais vienodos. Gauta p reikšmė – $< 0,05$, taigi hipotezė atmesta. Statistiškai reikšmingai dažniau gE seroteigiamų rezultatų nustatoma pavasarį negu rudenį ($p = 0,03897$).

Toliau buvo tikrinama hipotezė, ar teigiamų 2018 m. GIRT gB testo rezultatų (3.18 pav.) proporcijos skirtingais metų laikais yra vienodos. Gauta p reikšmė – $0,0006635$, t. y. $p < 0,05$, tad hipotezė atmesta. 2018 m. GIRT gB žiemą (gB seroteigiamų apie 4 proc.), priešingai negu 2017 m., seroteigiamų nustatoma rečiau negu pavasarį – 16 proc. ($p = 0,0008579$) ir rudenį – 14 proc. ($p = 0,003456$). Lyginant su vasara (5 proc.) nebuvo rasta reikšmingo skirtumo ($p = 0,5538$) – žiemos ir vasaros dažnis toks pat. Pavasarį ir rudenį antikūnų pasiskirstymas statistiškai reikšmingai nesiskiria ($p = 0,7418$). 2018 m. vasarą mažiau detektuota gB seroteigiamų negu pavasarį ($p = 0,0001$) ir rudenį ($p = 0,0002187$).



3.18 pav. Galvijų IRT antikūnų tipų pasiskirstymas pagal metų laikus 2018 metais (iš viso ištirta: gB pavasarį n = 193, vasarą n = 352, rudenį n = 222, žiemą n = 288, gE pavasarį n = 13, vasarą n = 41, rudenį n = 228, žiemą n = 15).

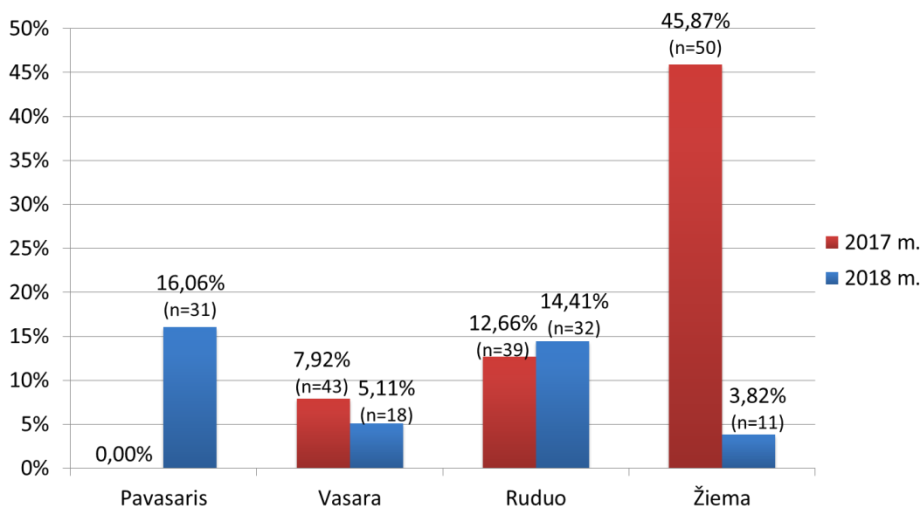
Nustatyta, kad 2017 m. ir 2018 m. skirtingais metų laikais seroteigiamų gE dažnis skiriasi ($p < 0,05$). Sergamumo dažnis rudeni pagal gE 2018 m. (seroteigiami sudaro 39 proc.) padažnėjęs ($p < 0,0001$) palyginti su 2017 m. rudeni, kurio metu nebuvo detektuota seroteigiamų galvijų. Sergamumo dažnis žiemos metu pagal gE 2017 m. (seroteigiami sudarė beveik 66 proc.) buvo statistiškai reikšmingai ($p < 0,0001$) didesnis lyginant su 2018 m., kuriais žiemą iš tiriamųjų nebuvo detektuotas nė vienas gE seroteigiamas galvijai. Toliau analizuojant paaiškėjo, kad 2018 m. vasarą statistiškai reikšmingai mažiau ($p < 0,05$) buvo aptikta seroteigiamų galvijų (seroteigiamų gE galvijų sudarė tik 0,88 proc.) negu 2017 m. vasarą (5 proc.). Tyrimų rezultatai pateikti 3.19 paveiksle.



3.19 pav. 2017 m. (iš viso ištirta gE: pavasarį n = 152, vasarą n = 345, rudenį n = 55, žiemą n = 38) ir 2018 m. (iš viso ištirta gE: pavasarį n = 13, vasarą n = 41, rudenį n = 228, žiemą n = 15) galvijų IRT gE antikūnų tipo pasiskirstymo pagal metų laikus palyginimas.

Siekiant palyginti 2017 m. ir 2018 m. rezultatus (3.20 pav.), manyta, kad skirtingais metų laikais seroteigiamų rezultatų proporcijos tarp gB antikūnų yra vienodos, tačiau ši

hipotezė buvo paneigta – $p < 0,0001$ ($p < 0,05$). Nustatyta, kad 2018 m. pavasario ir 2017 m. pavasario seroteigiamų gB rezultatų skirtumas yra reikšmingas – $p = 0,0001002$ ($p < 0,05$). 2018 m. pavasarį seroteigiamų nustatyta dažniau negu 2017 m., kuriais iš 93 tirtų galvijų pavasarį nebuvo diagnozuotas nė vienas seroteigiamas atvejis. Taip pat nustatyta, kad statistiškai reikšmingo skirtumo ($p = 0,136$) tarp 2018 m. vasaros (5 proc.) ir 2017 m. vasaros (apie 8 proc. seroteigiamų) nebuvo, gB seroteigiamų kiekis toks pat. Bet 2017 m. žiema statistiškai reikšmingai skiriasi, p reikšmė – $< 0,0001$. Tuo laiku seroteigiamų gB galvijų detektuota daugiau, beveik 46 proc., negu 2018 m. žiemą, kurios metu iš tirtų galvijų seroteigiami sudarė apytiksliai tik 4 proc. Toliau analizuojant duomenis nustatyta, kad tarp 2018 m. rudens ir 2017 m. rudens seroteigiamų gB rezultatų reikšmingo skirtumo nėra – $p = 0,6491$ ($p > 0,05$).



3.20 pav. 2017 m. (iš viso ištirta gB: pavasarį $n = 193$, vasarą $n = 352$, rudenį $n = 222$, žiemą $n = 288$) ir 2018 m. (iš viso ištirta gB: pavasarį $n = 93$, vasarą $n = 543$, rudenį $n = 308$, žiemą $n = 109$) galvijų IRT gB antikūnų tipo pasiskirstymo pagal metų laikus palyginimas.

3.7. Pasiskirstymas pagal veislę

2017 m. iš viso tirti 27 skirtingų ir nežinomų (nenustatytų) veislių galvijai. 18-oje veislių rūšių pagal gB ir gE nebuvo nustatyta seroteigiamų rezultatų. Todėl toliau darbe pateikiama 8 veislių, kuriose aptikta teigiamų rezultatų pagal kurią nors vieną antikūnų tipą, analizė. Taip pat vertinami vienos veislės (limuzinų) (3.21 pav.), kurioje nebuvo rasta nė vieno teigiamo rezultato, bet buvo pakankamai didelis tiriamųjų skaičius (gB $n = 101$, gE $n = 20$), duomenys.

Taikant proporcijų lygybės testą išsikelta hipotezė, kad seroteigiamumas tarp skirtingų galvijų veislių yra vienodas (tiek GIRT gB, tiek gE), buvo paneigta, gauta p reikšmė – $< 0,05$ ($p < 0,0001$). Analizuojant gautus GIRT gB IFA testo rezultatus (3.21 pav.), pritaikius proporcijų lygybės testą, paaiškėjo, kad Lietuvos juodmargiams dažniau nustatomas seroteigiamumas palyginti su mėsiniais juodmargiais, angusais, limuziniais ir nežinomos

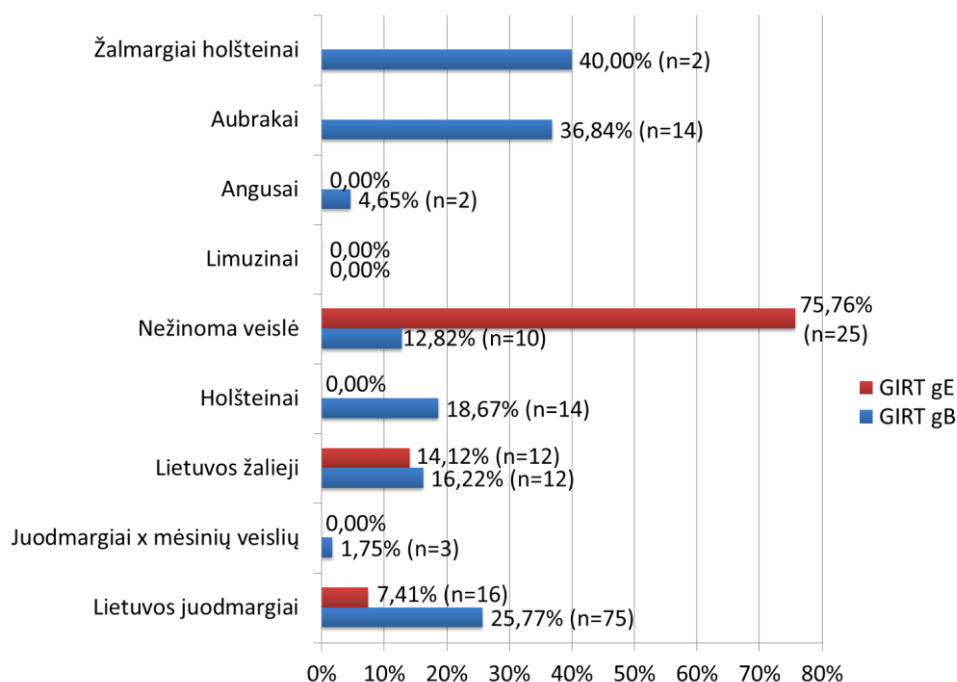
veislės galvijais. Statistiškai reikšmingai didesniu gB seroteigiamų tyrimo rezultatų kiekiu negu limuzinų veislės galvijai pasižymi ne tik Lietuvos juodmargiai, bet ir Lietuvos žalieji, holšteinai, nežinomos veislės, aubrakai ir žalmargiai holšteinai. Juodmargiai mėsiniai galvijai statistiškai reikšmingai neišsiskyrė palyginus su limuzinų ir angusų veislės galvijais. Likusių veislių (Lietuvos žaliųjų, holšteinų, nežinomos veislės, aubrakų, žalmargių holšteinų) galvijai statistiškai reikšmingai dažniau nustatomi gB seroteigiamais negu juodmargiai mėsiniai. Likusi veislė, statistiškai reikšmingai išsiskirianti iš kai kurių kitų, yra aubrakai. Jie labiau linkę būti nustatomi seroteigiami gB antikūno atžvilgiu negu Lietuvos žalieji, nežinomos veislės ir angusai, bet palyginus su žalmargiais holšteinais ir holšteinais statistiškai reikšmingas skirtumas nebuvo rastas. Visos gautos p reikšmės pateikiamos 3.1 lentelėje. Reikšmingo skirtumo tarp nepaminėtų veislių nebuvo arba dėl duomenų trūkumo statistinė analizė būtų buvusi nepatikima.

3.1 lentelė. Gautos p reikšmės proporcijų tarp GIRT gB seroteigiamų veislių (netirta – nes netinkamos imtys).

Veislės	Lietuvos žalieji	Nežinoma veislė	Aubrakai	Juodmargiai mėsiniai	Angusai	Limuzinai
Lietuvos juodmargiai	Netirta	p = 0,02374	Netirta	p < 0,0001	p = 0,004032	p < 0,0001
Lietuvos žalieji	X	Netirta	Netirta	p < 0,0001	Netirta	p < 0,0001
Holšteinai	Netirta	Netirta	p = 0,05961	p < 0,0001	Netirta	p < 0,0001
Nežinoma veislė	Netirta	X	Netirta	p = 0,0008566	Netirta	p = 0,0007376
Aubrakai	p = 0,027	p = 0,005898	X	p < 0,0001	p = 0,0008026	p < 0,0001
Žalmargiai holšteinai	Netirta	Netirta	p = 1	p = 0,0002086	Netirta	p < 0,0001
Juodmargiai mėsiniai	Netirta	Netirta	Netirta	X	p = 0,5759	p = 0,4607

Toliau analizuojant 2017 m. gautus rezultatus (3.21 pav.) atliekant GIRT gE IFA, pritaikius proporcijų lygybės testą, paaiškėjo, kad seroteigiamų Lietuvos juodmargių nustatyta daugiau negu juodmargių mėsinių (p = 0,00928), bet lyginant su Lietuvos žaliaisiais nebuvo rasta statistiškai reikšmingo skirtumo (p = 0,1132). Seroteigiami sudarė didesnę Lietuvos žaliųjų, o ne holšteinų dalį (p = 0,01459). Nežinomos veislės galvijų tyrimų rezultatų didžiausią dalį sudarė seroteigiami rezultatai lyginant su kitomis veislėmis (Lietuvos juodmargiai – p < 0,0001, Lietuvos žalieji – p < 0,0001, juodmargiai mėsiniai – p < 0,0001, holšteinai – p < 0,0001, limuzinai – p = 0,0001, angusai – p = 0,0008662). Tarp nepaminėtų

veislių nebuvo reikšmingo tarpusavio skirtumo arba dėl duomenų trūkumo statistinė analizė būtų nepatikima.



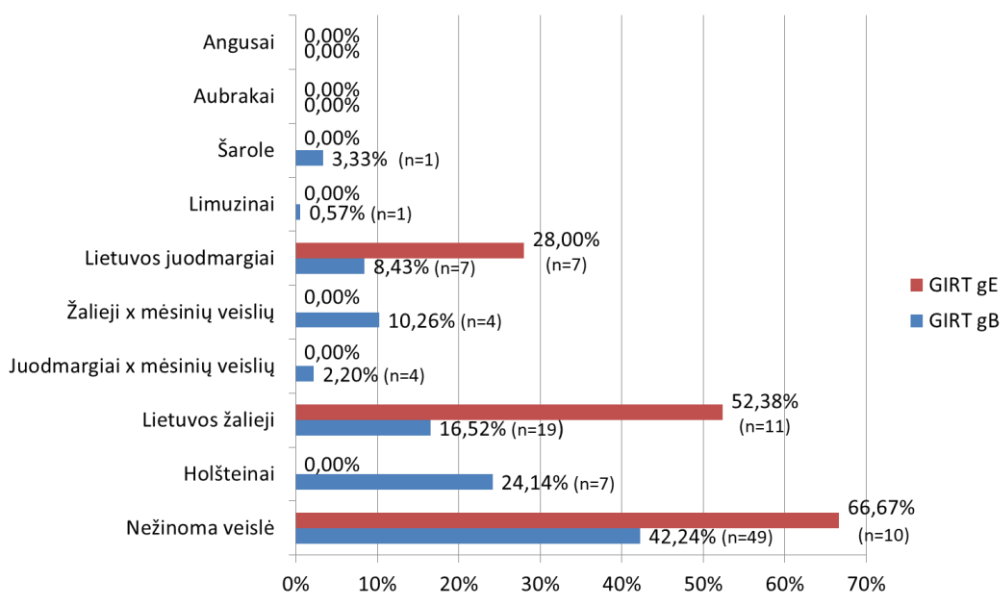
3.21 pav. 2017 m. galvijų IRT gE ir gB seroteigiamų rezultatų pasiskirstymas pagal veislę (iš viso ištirta gB: žalmargiai holšteinai – n = 5, aubrakai – n = 38, angusai – n = 43, limuzinai – n = 101, nežinoma veislė – n = 78, holšteinai – n = 75, Lietuvos žalieji – n = 74, juodmargiai x mėšinių veislių – n = 171, Lietuvos juodmargiai – n = 291. Iš viso ištirta gE: angusai – n = 7, limuzinai – n = 20, nežinoma veislė – n = 33, holšteinai – n = 49, Lietuvos žalieji – n = 85, juodmargiai x mėšinių veislių – n = 106, Lietuvos juodmargiai – n = 216).

2018 m. iš viso ištirtos 29 skirtingos ir nežinomos (nenustatytos) veislės. Iš jų 22-ose nebuvo nustatyta seroteigiamų rezultatų pagal gB ir gE, todėl toliau šiame darbe pateikiama 8 veislių, kuriose aptikta teigiamų rezultatų bent pagal kurią nors vieną antikūnų tipą, analizė. Taip pat aptiriamos dvi veislės (3.22 pav.), kuriose nerastas nė vienas teigiamas rezultatas, bet buvo pakankamai didelis tiriamųjų skaičius: angusai pagal gB (gB n = 117, gE n = 5) ir aubrakai (gB n = 66, gE n = 12). 2017 m. šiose grupėse detektuota seroteigiamų galvojų, todėl ir dėl galimo palyginimo šios veislės analizuojamos ir remiantis 2018 m. duomenimis.

Taikant proporcijų lygybės testą išsikelta hipotezė, kad 2018 m. seroteigiamumas tarp skirtingų galvijų veislių yra vienodas, buvo paneigta, gauta p reikšmė – < 0,05. Analizuojant 2018 m. gautus rezultatus (3.22 pav.) atliekant GIRT gB IFA, pritaikius proporcijų lygybės testą paaiškėjo, kad nežinomos veislės galvijams seroteigiamumas nustatomas dažniau negu angusų (p < 0,0001), aubrakų (p < 0,0001), šarolės (p = 0,0001524), limuzinų (p < 0,0001), Lietuvos juodmargių (p < 0,0001), žaliųjų mėšinių (p = 0,0005654), juodmargių x mėšinių (p < 0,0001) ir Lietuvos žaliųjų (p < 0,0001) veislėms. Statistiškai reikšmingais seroteigiamais tyrimo rezultatais (jų dažnumu, kiekiu) pasižymi ir Lietuvos

žalieji, kurių 16,52 proc. tirtųjų – seroteigiami. Toks rezultatas palyginti su limuziniais, kurių tik 0,57 proc. ($p < 0,0001$), juodmargiais mėsiniais galvijais – 2,20 proc. ($p < 0,0001$), aubrakais – 0 proc. ($p = 0,001201$) ir angusais – 0 proc. ($p < 0,0001$), gerokai skiriasi. Tačiau su holšteinų 24,14 proc. ($p = 0,4947$), žaliųjų mėsinų – 10,26 proc. ($p = 0,491$) ir Lietuvos juodmargių 8,43 proc. ($p = 0,1472$) veislėmis statistiškai reikšmingas skirtumas ($p > 0,05$) nerastas, t. y. šių veislių, lyginant su Lietuvos žaliaisiais, gB seroteigiamumo tikimybė vienoda. Kitos veislės nepaminimos dėl duomenų trūkumo, netinkamo jų pasiskirstymo, kas padarytų įtaką analizei, leistų formuoti netinkamas išvadas.

Toliau analizuojant 2018 m. gautus rezultatus (3.22 pav.) atliekant GIRT gE IFA, pritaikius proporcijų lygybės testą, nustatyta, kad nežinomos veislės seroteigiamų yra daugiau negu Lietuvos juodmargių ($p = 0,03896$). Tačiau lyginant su Lietuvos žaliaisiais statistiškai reikšmingo skirtumo ($p = 0,6071$) nerasta. Tarp Lietuvos žaliųjų ir Lietuvos juodmargių statistiškai reikšmingas skirtumas ($p = 0,1662$) taip pat nerastas. Bet seroteigiami sudarė didesnę Lietuvos žaliųjų, o ne Holšteinų ($p = 0,0008066$) dalį. Dėl duomenų trūkumo negalimas adekvatus nepaminėtų veislių palyginimas, nes netinkamas pasiskirstymas būtų lėmęs nepatikimas išvadas.

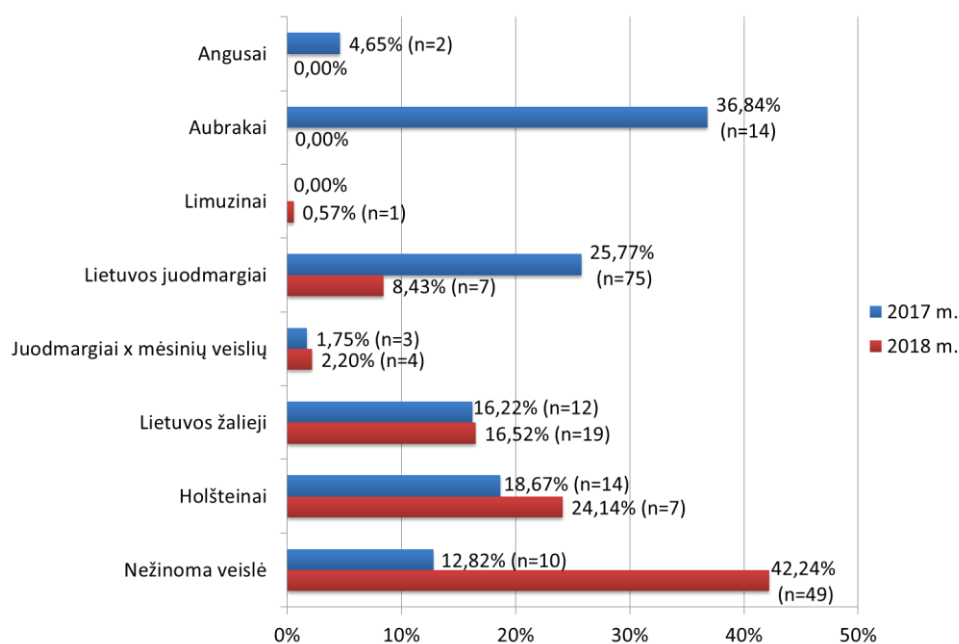


3.22 pav. 2018 m. tirtų galvijų IRT gE ir gB seroteigiamų rezultatų pasiskirstymas pagal veislę (iš viso ištirta gB: angusai – $n = 117$, aubrakai – $n = 66$, šarolė – $n = 30$, limuzinai – $n = 176$, Lietuvos juodmargiai – $n = 83$, žalieji x mėsinų veislių – $n = 39$, juodmargiai x mėsinų veislių – $n = 182$, Lietuvos žalieji – $n = 115$, holšteinai – $n = 29$, nežinomos veislės – $n = 116$.)

Iš viso ištirta gE: angusai – $n = 5$, aubrakai – $n = 12$, šarolė – $n = 13$, limuzinai – $n = 11$, Lietuvos juodmargiai – $n = 25$, žalieji x mėsinų veislių – $n = 11$, juodmargiai x mėsinų veislių – $n = 109$, Lietuvos žalieji – $n = 21$, holšteinai – $n = 19$, nežinomos veislės – $n = 15$.)

Siekiant palyginti 2017 m. ir 2018 m. rezultatus (3.23 pav.), išsikelta hipotezė, kad skirtingų veislių seroteigiamų rezultatų proporcijos tarp gB antikūnų yra vienodos, buvo

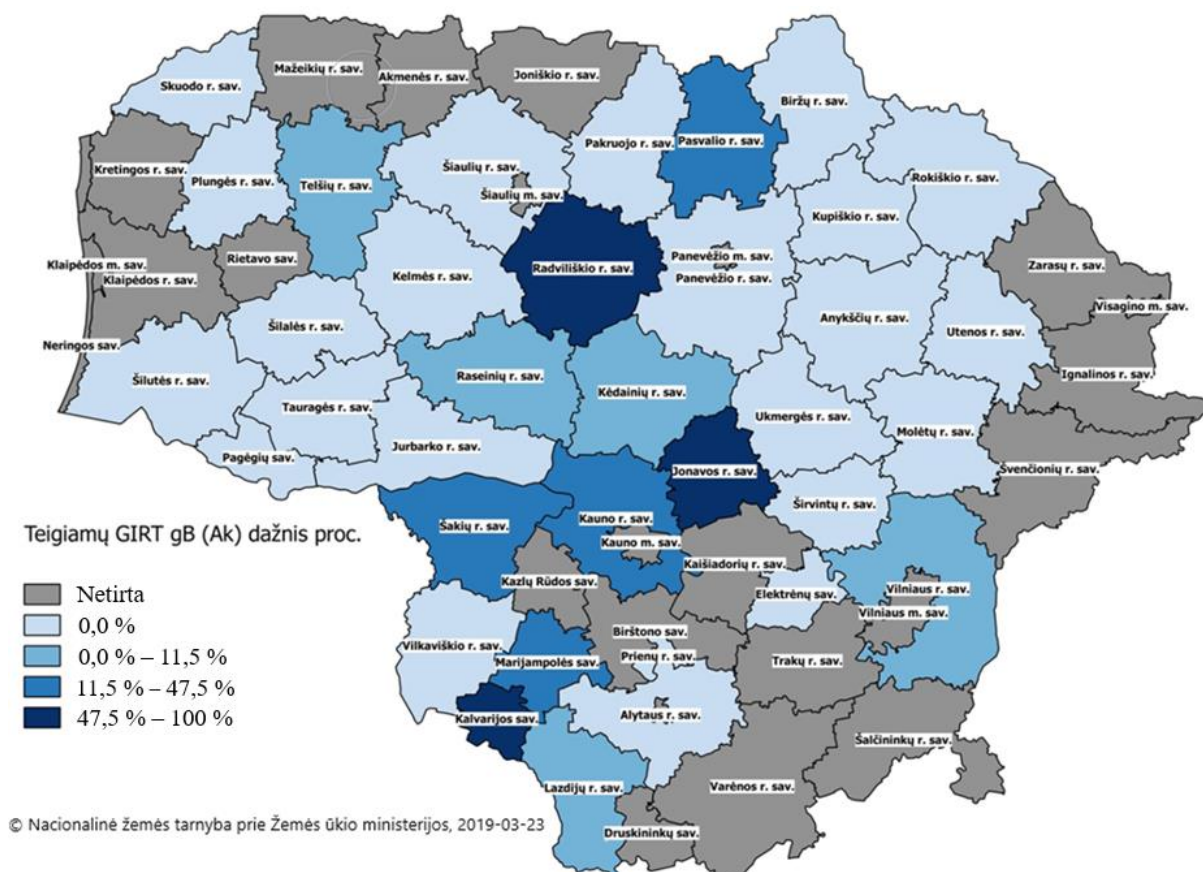
paneigta ($p < 0,05$). Nustatyta, kad 2018 m. buvęs didesnis nežinomos veislės ($p < 0,0001$) galvijų sergamumas negu 2017 m. Tokių veislių kaip aubrakai ($p < 0,0001$) ir Lietuvos juodmargiai ($p = 0,002973$) 2017 m. gB seroteigiamų detektuota daugiau (aubrakų sudarė beveik 37 proc., Lietuvos juodmargių 26 proc.) negu 2018 m., kuriais iš tirtų Lietuvos juodmargių gB seroteigiamų buvo 8,43 proc., o aubrakų – 0 proc. Per metus holšteinų veislės gB seroteigiamų galvijų dažnis ($p = 0,7256$) statistiškai reikšmingai nepasikeitė, 2017 m. holšteinų gB seroteigiami sudarė beveik 19 proc., o 2018 m. apie 24 proc. Paminėtina, kad gB seroteigiamų Lietuvos žaliųjų 2017 m. aptikta apie 16 proc., o 2018 m. – apie 16,52 proc. ($p = 1$). Tarp nepaminėtų veislių dėl duomenų trūkumo nebuvo galimas palyginimas, nes duomenys dėl netinkamo pasiskirstymo būtų statistiškai nepatikimi, išvados neadekvačios. Dėl imčių skirtumų arba per mažų imčių gautos gE seroteigiamų galvijų dažnio 2017 m. ir 2018 m. pagal veisles išvados nepatikimos, todėl grafikas nepateikiamas ir galimi rezultatai neaptariami.



3.23 pav. 2017 m. (iš viso ištirta: angusai – $n = 43$, aubrakai – $n = 38$, limuzinai – $n = 101$, Lietuvos juodmargiai – $n = 291$, juodmargiai x mėšinių veislių – $n = 171$, Lietuvos žalieji – $n = 74$, holšteinai – $n = 75$, nežinoma veislė – $n = 78$) ir 2018 m. (iš viso ištirta: angusai – $n = 117$, aubrakai – $n = 66$, limuzinai – $n = 176$, Lietuvos juodmargiai – $n = 83$, juodmargiai x mėšinių veislių – $n = 182$, Lietuvos žalieji – $n = 115$, holšteinai – $n = 29$, nežinoma veislė – $n = 116$) galvijų IRT gB seroteigiamų rezultatų pasiskirstymo pagal veislę palyginimas.

3.8. Pasiskirstymas pagal rajonus

Pagal 2017 m. teigiamų gB rezultatų pasiskirstymą (3.24 pav.) savivaldybėse galima išskirti, kuriose iš jų per 2017 m. didžiausią tirtųjų dalį sudarė seroteigiami galvijai: Jonavos r. sav. (iš tirtųjų 100 proc. gB seroteigiami), Kalvarijos sav. (100 proc.) ir Radviliškio r. sav. (beveik 82 proc.). Antrąją vietą pagal seroteigiamų rezultatų dažnumą užima Marijampolės sav. (46 proc.), Kauno r. sav. (43 proc.), Pasvalio r. sav. (beveik 35 proc.) ir Šakių r. sav. (apytiksliai 27 proc.).



3.24 pav. Galvijų IRT gB seroteigiamų rezultatų, remiantis 2017 m. atliktais tyrimais, procentinis pasiskirstymas rajonuose.

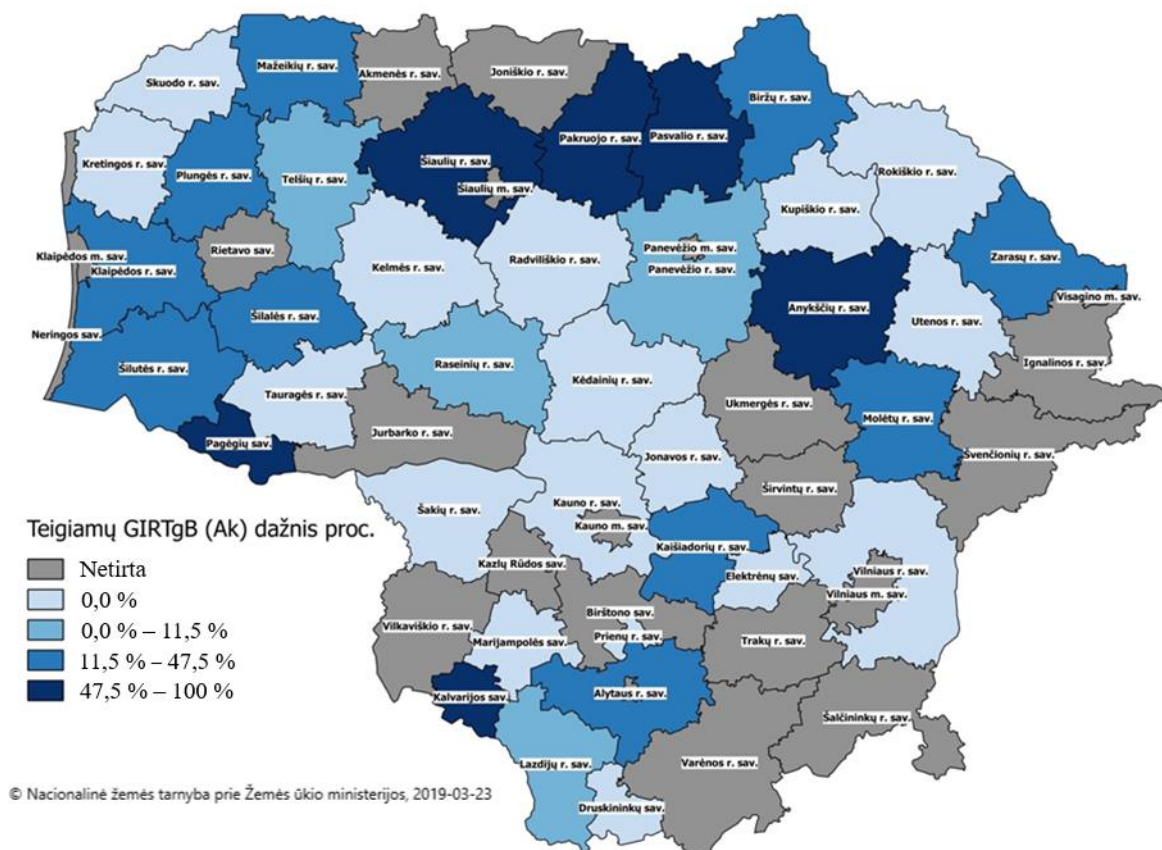
Vėliau tikrinta, ar 2017 m. teigiamų GIRT gB testo rezultatų (3.2 lent.) proporcijos skirtinguose rajonuose vienodos. Gauta p reikšmė – $< 0,05$, tad hipotezė atmesta. Paaikškėjo, kad GIRT gB Radviliškio rajone seroteigiamų nustatoma dažniau negu Pasvalio ($p = 0,02346$), bet dažnis, lyginant su Marijampolės ($p = 0,07922$) ir Kauno ($p = 0,05126$) rajonais, vienodas, nors subjektyviai gali atrodyti, kad Radviliškyje seroteigiamų dažnis didesnis. Proporcijos tarp Marijampolės, Kauno, Pasvalio ir Šakių rajonų vienodos ($p > 0,05$). gB seroteigiamų galvijų tikimybė šiuose miestuose tokia pat. Marijampolės ir Kauno rajonuose gB seroteigiamumas statistiškai reikšmingai dažnesnis ($p < 0,05$) negu Kėdainių, Lazdijų, Vilniaus ir Raseinių. Taip pat reikšmingai didesnis už tokių rajonų kaip Elektrėnų, Kelmės, Skuodo ir Panevėžio, kuriuose nebuvo detektuota gB seroteigiamų galvijų. Pasvalio ir Šakių

rajonai ne tik pasižymi vienodomis proporcijomis (kaip ir Kauno bei Marijampolės rajonai), bet ir gB seroteigiamumo tikimybė čia vienoda palyginti su Kėdainių ir Lazdijų rajonais ($p > 0,05$). Šakių rajonas reikšmingai išsiskyrė lyginant jį su Raseinių rajonu ($p = 0,0001739$) – nustatyta, kad Šakių rajono galvijai, remiantis ištirtu sergamumu, turi didesnę tikimybę būti gB seroteigiamais negu Raseinių rajono. Raseinių rajone gB seroteigiamų galvijų daugiau detektuojama negu Telšių rajone ($p = 0,001216$). Tarp nepaminėtų rajonų palyginimas negalimas dėl duomenų trūkumo, netinkamo jų pasiskirstymo, kai kurių rajonų mažų tyrimo imčių, nes duomenys ir išvados būtų nepatikimos.

3.2 lentelė. 2017 m. galvijų IRT gB seroteigiamų rezultatų pasiskirstymas pagal rajonus.

Rajonas	Iš viso tirta, n	Teigiami GIRT gB, n	Teigiami GIRT gB (%)
Jonavos	7	7	100.00 %
Kalvarijos	5	5	100.00 %
Radviliškio	11	9	81.82 %
Marijampolės	41	19	47.50 %
Kauno	46	20	43.48 %
Pasvalio	26	9	34.62 %
Šakių	64	17	26.56 %
Kėdainių	27	3	11.54 %
Lazdijų	26	3	11.54 %
Vilniaus	19	2	10.53 %
Raseinių	368	34	9.26 %
Telšių	209	4	1.91 %

2018 m. didžiausią tiriamųjų dalį sudarė seroteigiami galvijai (3.25 pav.): Kalvarijos sav. (iš tirtųjų 100 proc. gB seroteigiamų), Pasvalio r. sav. (75 proc.), Šiaulių r. sav. (beveik 73 proc.), Pakruojo r. sav. (70 proc.), Pagėgių sav. (beveik 67 proc.) ir Anykščių r. sav. (apie 58 proc.). Antrojoje vietoje pagal seroteigiamų rezultatų dažnį: Molėtų r. sav. (iš tirtųjų apie 31 proc. gB seroteigiamų), Šilutės r. sav. (25 proc.), Klaipėdos r. sav. (25 proc.), Mažeikių r. sav. (25 proc.), Zarasų r. sav. (apie 22 proc.), Kaišiadorių r. sav. (20 proc.), Šilalės r. sav. (beveik 20 proc.), Alytaus r. sav. (apytikisliai 17 proc.), Biržų r. sav. (apie 15 proc.) ir Plungės r. sav. (beveik 13 proc.).



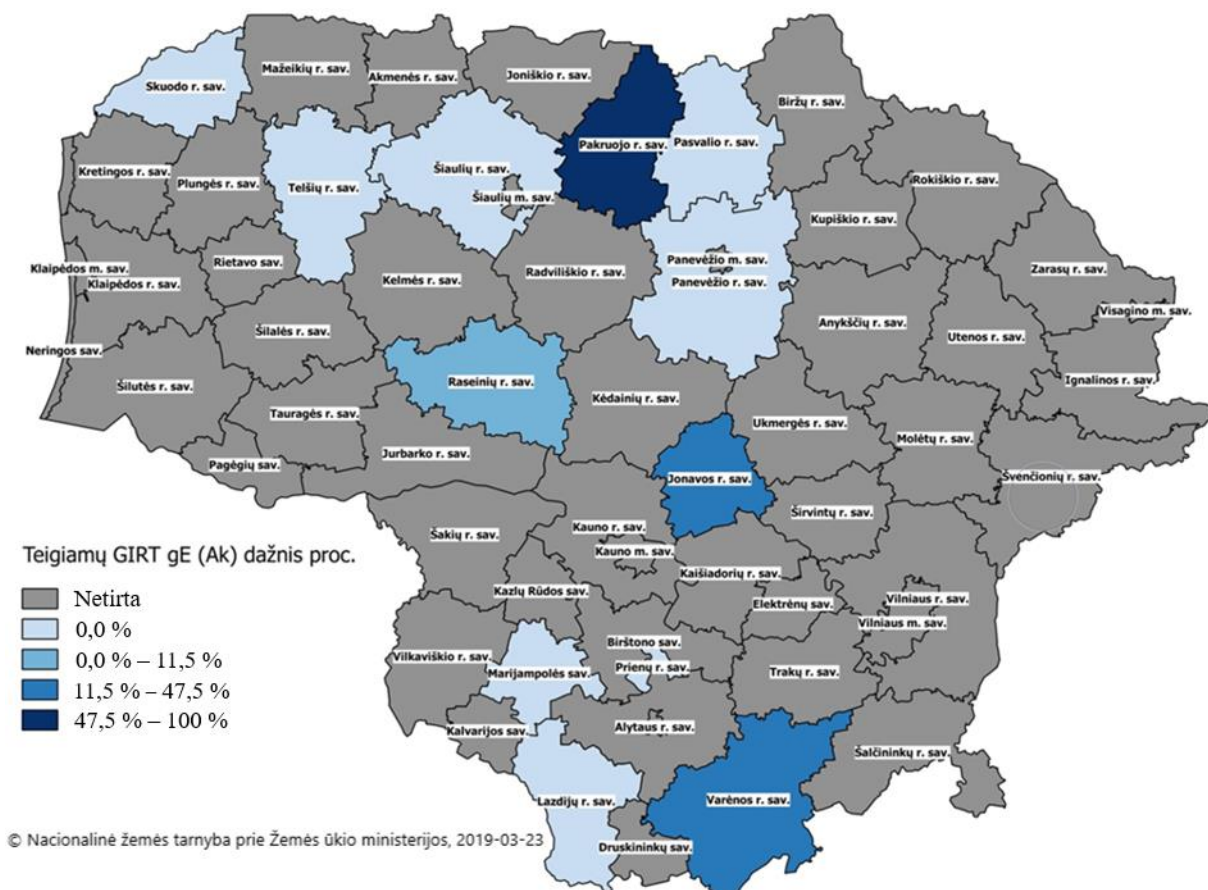
3.25 pav. Galvijų IRT gB seroteigiamų rezultatų, remiantis 2018 m. atliktais tyrimais, procentinis pasiskirstymas rajonuose.

Atliekant tyrimą tikrinta, ar 2018 m. teigiamų GIRT gB testo rezultatų (3.3 lent.) proporcijos skirtinguose rajonuose yra vienodos. Gauta p reikšmė – $< 0,05$, hipotezė atmesta. Todėl buvo aiškinamasi, tarp kurių rajonų gB seroteigiamumo dažnis statistiškai reikšmingai skiriasi. Paaikškėjo, kad Kalvarijų ir Pakruojo rajonuose GIRT gB seroteigiamų galvijų nustatoma dažniau negu Molėtų, Šilutės, Šilalės, Biržų, Plungės, Raseinių, Lazdijų rajonuose ($p < 0,05$). Reikšmingai didesniu gB seroteigiamumu išsiskyrė Šilalės rajonas, jame didesnė tikimybė detektuoti gB seroteigiamą galviją negu Telšių ($p = 0,006251$), Lazdijų ($p = 0,006823$) ir Panevėžio ($p < 0,0001$) rajonuose. Taip pat statistiškai reikšmingai už Panevėžio rajoną didesniu gB seroteigiamumu pasižymėjo Telšių rajonas ($p = 0,02906$). Statistiniais metodais paremtas gB seroteigiamumo dažnio vienodumas buvo aptiktas tarp Šilalės ir Raseinių ($p = 0,3315$), Šiaulių ir Molėtų ($p = 0,08409$), Anykščių ir Molėtų ($p = 0,295$), Šilutės ir Šilalės ($p = 0,6592$), Šilutės ir Raseinių ($p = 0,2253$). Tarp nepaminėtų rajonų svarus palyginimas negalimas dėl duomenų trūkumo: netinkamo jų pasiskirstymo, mažų imčių kai kuriuose rajonuose. Todėl, vengiant nepatikimų statistinių rezultatų ir neteisingų išvadų, rajonų padėtis neaptariama.

3.3 lentelė. 2018 m. galvijų IRT gB seroteigiamų rezultatų pasiskirstymas pagal rajonus.

Rajonas	Iš viso tirta, n	Teigiami GIRT gB, n	Teigiami GIRT gB (%)
Kalvarijos	15	15	100.00 %
Pasvalio	4	3	75.00 %
Šiaulių	11	8	72.73 %
Pakruojo	25	19	76.00 %
Pagėgių	3	2	66.67 %
Anykščių	12	7	58.33 %
Molėtų	16	5	31.25 %
Mažeikių	4	1	25.00 %
Klaipėdos	8	2	25.00 %
Šilutės	32	8	25.00 %
Zarasų	9	2	22.22 %
Kaišiadorių	5	1	20.00 %
Šilalės	133	26	19.55 %
Alytaus	6	1	16.67 %
Biržų	13	2	15.38 %
Plungės	16	2	12.50 %
Raseinių	30	3	10.00 %
Telšių	144	11	7.64 %
Lazdijų	59	2	3.39 %
Panevėžio	328	9	2.74 %

Pagal teigiamų gE rezultatų pasiskirstymą (3.26 pav.) savivaldybėse galima išskirti tas, kuriose per 2017 m. didžiausią tiriamųjų dalį sudarė seroteigiami galvijai – tai Pakruojo r. sav. (iš tirtųjų apie 96 proc. – gE seroteigiamų). Antrojoje vietoje pagal seroteigiamų rezultatų dažnumą – Jonavos r. sav. (45 proc.) ir Varėnos r. sav. (apie 14 proc. gE seroteigiamų iš tirtųjų).



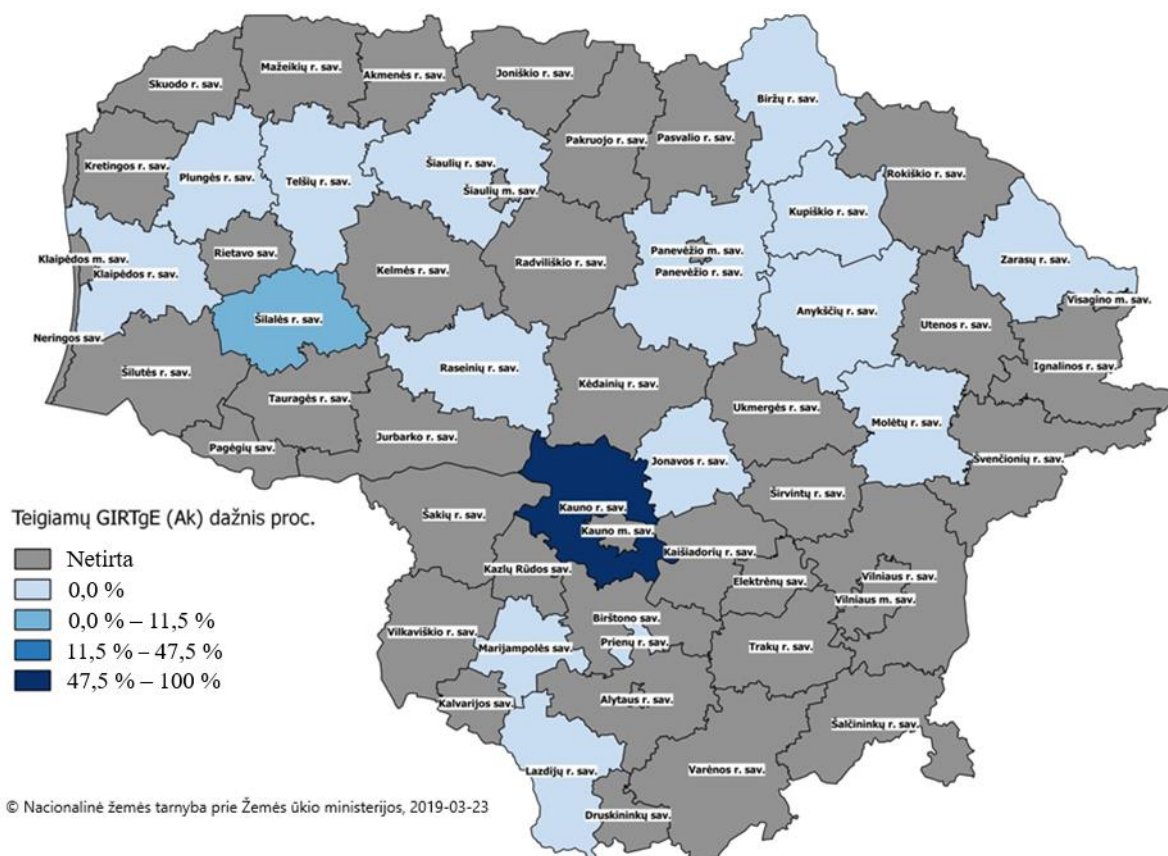
3.26 pav. Galvijų IRT gE seroteigiamų rezultatų, remiantis 2017 m. atliktais tyrimais, procentinis pasiskirstymas rajonuose.

Tikrinta hipotezė, ar 2017 m. teigiamų GIRT gE testo rezultatų (3.4 lent.) proporcijos skirtinguose rajonuose yra vienodos. Gauta p reikšmė – $<0,05$, tad spėjimas atmestas. Paaaiškėjo, kad GIRT gE Pakruojo rajone seroteigiamų nustatoma dažniau negu Jonavos ($p = 0,0001147$). Šių dviejų rajonų (Pakruojo ir Jonavos) seroteigiamumas statistiškai reikšmingai didesnis ($p < 0,05$) už tokių rajonų kaip Šiaulių, Marijampolės ir Skuodo, kuriuose nebuvo detektuota gE seroteigiamų galvijų. Tarp nepaminėtų rajonų palyginimas negalimas dėl duomenų trūkumo, netinkamo pasiskirstymo ar kai kurių rajonų mažų imčių, kas lemtų nepatikimus statistinius duomenis, išvadas.

3.4 lentelė. 2017 m. galvijų IRT gE seroteigiamų rezultatų pasiskirstymas pagal rajonus.

Rajonas	Iš viso tirta, n	Teigiami GIRT gE, n	Teigiami GIRT gE (%)
Pakruojo	26	25	96.15 %
Jonavos	33	15	46.88 %
Varėnos	7	1	14.29 %
Raseinių	252	12	4.76 %
Šiaulių	56	0	0.00 %

2018 m. pagal teigiamų gE rezultatų pasiskirstymą (3.27 pav.) didžiausią dalį seroteigiamų iš tiriamųjų sudarė Kauno r. sav. galvijai (iš tirtųjų apie 84 proc. – gE seroteigiamų). Antroje vietoje – Šilalės r. sav. (iš tirtųjų beveik 2 proc. gE seroteigiamų).



3.27 pav. Galvijų IRT gE seroteigiamų rezultatų, remiantis 2018 m. atliktais tyrimais, procentinis pasiskirstymas rajonuose.

2018 m. atliktų rajonų gE tyrimų palyginimas negalimas, nes trūksta duomenų, netinkamas jų pasiskirstymas ir kai kurių rajonų imtys itin mažos, todėl statistiniai tyrimai ir išvados būtų nepasiklaustinos.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Rinkinių palyginimas. Kaip paaiškinta metodikoje, GHV-1 diagnostikai naudojama blokuojamoji imunofermentinė analizė, pagal kurią teigiamų mėginių optinis tankis turi būti mažesnis negu neigiamų mėginių gautas optinis tankis (pvz., neigiamo mėginio optinis tankis – 1,120, o teigiamo mėginio optinis tankis – tik 0,131). X rinkinys gB serologiškai teigiamus mėginius aptinka vienodu jautrumu, kaip ir Y rinkinys, bet X rinkinys linkęs serologiškai neigiamus mėginius detektuoti intensyviau (pastebimas didesnis optinis tankis negu Y rinkiniu). Viso to galima priežastis yra tai, kad X rinkinys nėra toks jautrus nespecifiniams junginiams, ir todėl, jei nėra specifinių GHV-1 antikūnų, tai mažesnė tikimybė, kad prie laisvųjų antigenų plokštelėje prisijungs klaidingi antikūnai. Prie laisvųjų antigenų prisikabinantys paties rinkinio žymėti antikūnai gali būti, kad yra žymėti stipresnę spalvinę reakciją sukeliančiu fermentu negu Y rinkinyje. Atsižvelgiant į tai, kad gB teigiamus mėginius abu rinkiniai aptiko vienodu jautrumu, nėra skirtumo, kurį rinkinį naudoti galbūt norint išvengti įtartinų rezultatų, – kai nėra aišku, ar tikrai neigiamas mėginys labiau tiktų naudoti X rinkinį kuris tokius mėginius nustato intensyviau.

Nustatyti gE skirtas X rinkinys linkęs serologiškai teigiamus mėginius detektuoti aukštesnėmis reikšmėmis, o neigiamus – žemesniu intensyvumu (mažesnis optinis tankis) negu Y rinkinys. Galima šių skirtumų priežastis X rinkinyje teigiamo mėginio atveju yra tai, kad X rinkinio naudojami žymėti antikūnai labiau geba prisijungti prie antigeno, dengiančio plokštelę, nes antigenas su tiriamo mėginio gE antikūnais sudaro silpnesnę ryšį. Tikriausiai dėl to, kad norint kompensuoti ir sumažinti klaidingų rezultatų riziką pati spalvinė reakcija yra silpnesnė, kai rinkinio antikūno fermentas reaguoja su TMB substratu, ir tai galima pastebėti lyginant neigiamus mėginius, kurių optinio tankio vertės žemesnės, negu tiriant Y rinkiniu. Nepatyrusiam darbuotojui dėl galimos didesnės rizikos gauti rezultatus, kai neaišku, ar teigiamas, ar neigiamas mėginys tiriant su X rinkiniu, patartina geriau rinktis Y rinkinį.

Sergamumas. Kol kas per pastaruosius 2 metus (2017–2018 m.) GIRT gB ir gE serologiškai teigiamų galvijų detektavimo dažnis, tiriant atvežtus galvijų mėginius, statistiškai reikšmingai nepadidėjo. Bet tai, kad GHV-1 Lietuvoje yra aptinkamas, ir pagal gB net 13 proc. visų ištirtų mėginių sudaro seroteigiami, o pagal gE – 9 proc. (tai reiškia, kad pagal gE 9 proc. iš tirtų mėginių yra galvijų, užsikrėtusių laukinio tipo GHV-1). Tai rodo viruso likvidavimo sistemos taikymo poreikį Lietuvoje. Vakcinų poreikis ir Lietuvoje pasitaikančios GHV-1 endemijos aprašomos ir ankstesniuose tyrimuose (A. Šalomska et al., 2006) [184]. Juose pabrėžiami faktai, kad Lietuvoje šis virusas vis dar egzistuoja ir yra viena iš galvijų GIRT susirgimo priežasčių.

Pasiskirstymas pagal lytį. 2017 m. ir 2018 m. moteriškos lyties galvijams dažniau nustatoma seroteigiamas GIRT gB (12–14 proc.) negu vyriškos lyties galvijams (apie 3 proc.). 2017 m. nebuvo galima tiksliai nustatyti gE seroteigiamumo dažnio skirtumo pagal lytį, o 2018 m. gE seroteigiamesni moteriškos lyties galvijai – 46 proc. moteriškos lyties galvijų ir tik 1 proc. vyriškos lyties galvijų. Lyginant metų pokytį, paaiškėjo, kad moteriškos ir vyriškos lyties galvijų gB seroteigiamumas nepakito. Lyginant gE seroteigiamų galvijų detektavimo dažnio pokytį, nustatyta, kad galvijų patelių sergamumo dažnis pagal gE 2018 m. (46 proc.) padidėjo lyginant su 2017 m. (6 proc.). Pagal gautus analizės rezultatus galima daryti išvadą, kad moteriškos lyties galvijai dažniau būna infekuoti GHV-1 virusu. Viename Lietuvoje atliktame tyrime taip pat buvo pastebėta, kad GIRT dažniau nustatoma karvėms (A. Šalomska et al., 2006)[184].

Pasiskirstymas pagal amžių. 2017 m. gB seroteigiamų galvijų daugiausia buvo 0–1 mėn. amžiaus grupėje (apytiksliai 42 proc.) – šioje grupėje yra didesnė tikimybė, kad bus gB seroteigiamas galvijai, negu kitose grupėse. 0–1 mėn. amžiaus galvijų grupėje gB seroteigiamumo tikimybė yra tokia pati, kaip ir 61–146 mėn. amžiaus grupėje, kurioje seroteigiamumo tikimybė – beveik 24 proc. 2–6 mėn. ir 25–60 mėn. amžiaus grupėse (jų gB seroteigiamumo dažnis yra toks pat – po 21 proc.) dažniau nustatoma gB seroteigiami galvijai negu 7–12 mėn. (8 proc.) ir 13–24 mėn. (4 proc.) grupėse.

2018 m. buvo nustatyta, kad 25–60 mėn. galvijai turi didesnę tikimybę būti gB seroteigiami (16 proc.) negu 61–146 mėn. (3,33 proc.), taip pat 2–6 mėn. (7 proc.), 7–12 mėn. (4 proc.) ir 13–24 mėn. (3 proc.) (šios trys grupės, atlikus proporcijos lygybės testą, tarpusavyje vienodos pagal gB seroteigiamumo dažnį) amžiaus grupės galvijai. Dėl mažos 0–1 mėn. amžiaus grupės imties (ištirta tik 20 galvijų), lyginant su kitomis amžiaus grupėmis, statistinė analizė, orientuota į 0–1 mėn. amžiaus grupę, yra nepatikima.

2017 m. ir 2018 m. 0–1 mėn., 13–24 mėn. ir 25–60 mėn. amžiaus grupių gB seroteigiamumo dažnis statistiškai reikšmingai nesiskiria. 2017 m. seroteigiamumo dažnis 2–6 mėn. amžiaus grupėje buvo didesnis (beveik 21 proc.) negu 2018 m. (seroteigiamumo atvejai sudarė apie 7 proc.). Taip pat 7–12 mėn. galvijų gB seroteigiamumas buvo didesnis 2017 metais.

2017 m. gE seroteigiami rezultatai 7–12 mėn. ir 25–60 mėn. amžiaus grupėse, kurias sudarė po 9 proc. seroteigiamų galvijų, pasitaikė dažniau negu 13–24 mėn. (apie 2 proc.). 2018 m. nustatyta, kad, kaip ir 2017 m., 7–12 mėn. (10 proc.) galvijų seroteigiami rezultatai dažniau pasitaiko negu 13–24 mėn. (apie 2 proc.) grupėse. Palyginus 2017 m. ir 2018 m. rezultatus, nustatyta, kad gE seroteigiamų rezultatų dažnis 7–12 mėn. amžiaus grupėje nepasikeitė, t. y. 2017 m. ir 2018 m. jis vienodas.

Taigi, pagal 2017 m. gB rezultatus, jaunikliai (0–1 mėn.) dažniau užsikrečia GHV-1. Tai gali lemti užkratas per motiną, t. y. motininius antikūnus, jos pieną ir tai, kad tokio amžiaus jaunikliai yra jautresni infekcijoms [185] (kaip minėta, 2018 m. patvirtinti šią hipotezę trūko duomenų). 2–6 mėn. amžiaus grupės galvijai, atsižvelgiant į tai, kaip auginami, pavyzdžiui, jei tai mėsiniai galvijai, jie dar gali būti maitinami pienu [186], yra jautresni infekcijoms ir iki 6 mėnesių jiems gali būti aptinkama motininių antikūnų, todėl 2017 m. dėl šių veiksnių galėjo pasitaikyti didesnis sergamumas, o 2018 m. jie jau galbūt turėjo mažiau įtakos. Lietuvoje 2005–2011 m. atliktame tyrime paaiškėjo, kad, palyginti su kitomis amžiaus grupėmis, 0–4 mėn. amžiaus galvijų sergamumas buvo mažas (E. Jacevičius, 2012) [24].

7–12 mėn. galvijai paprastai dar neapvaisinami – jiems nebūdinga ruja [185, 186], todėl rizika sumažėja vienu faktoriumi – užsikrėtimu per spermą, kai apsėklinama ūkiui ar kitam ūkiui priklausančio nepatikrinto [185, 186] galvijo sperma. Tikriausiai todėl, 2017 m. ir 2018 m. duomenimis, tai buvo viena iš rečiau apsikrėtusių galvijų grupių.

Nuo 13–24 mėn. galvijai praddami apsėklinti (14–15 mėn. dažnai jau prasideda ruja [185, 186]), bet tai dar tik pirmasis apsėklinimas, ir sergamumo tikimybė mažesnė. Be to, tokie maži gB seroteigiami rezultatai gali būti dėl auginimo pobūdžio įtakos, veislės ir nesėklinimo tokiam amžiuje [186] (didelę dalį moteriškos lyties galvijų sudarė mėsiniai gyvuliai), nemaža dalis tiriamųjų sudarė vyriškos lyties galvijai. Dėl šių priežasčių 2017–2018 m. galėjo būti mažas seroteigiamumas. Kad 1–2 metų amžiaus galvijai rečiau būna užsikrėtę GHV-1, pastebėta ir kituose tyrimuose – juose taip pat teigiama, kad didžiausias viruso paplitimas tarp senesnių kaip 7 metai galvijų (E. Jacevičius, 2012) [24].

25–60 mėn. galvijai jau gali būti kelis kartus apsėklinti, todėl padidėja užsikrėtimo rizika (jei naudojama nepatikrinto galvijo sperma), jų laikymo sąlygos taip pat palankesnės virusui plisti [185, 186], galbūt todėl 2017 m. ir 2018 m. ši grupė išsiskyrė didesniu seroteigiamumu negu pienu nebemaitinami ir dar neruojantys galvijai (7–12 mėn., 13–24 mėn., o 2018 m. – ir 2–6 mėn.). Kiti Lietuvoje atlikti tyrimai taip pat parodė, kad dažniau GHV-1 užsikrečia senesni galvijai (A. Šalomska et al., 2006) [184].

Norint patvirtinti amžiaus įtaką sergamumui, reikalingas detalesnis labiau kontroliuojamas tyrimas, kuriame daug dėmesio būtų skirta amžiaus įtakai ir jį veikiantiems faktoriams (biologiniams, aplinkos ir kt.).

Pasiskirstymas pagal metų laikus. 2017 m. tiriant antikūnų pasiskirstymą pagal metų laikus, pastebėta, kad labiausiai išsiskiria žiemos laikotarpis – gB seroteigiamų (46 proc.) ir gE seroteigiamų (66 proc.) antikūnų kiekis žiemą padidėja, palyginti su kitais metų laikais. 2017 m. gB seroteigiami rezultatai dažniau nustatomi rudenį (13 proc.) negu pavasarį (0 proc.) ar vasarą (8 proc.). Vasarą dažniau nustatomas seroteigiamumas negu pavasarį.

2018 m. gE seroteigiami rezultatai dažniau nustatyti pavasarį (77 proc.) negu rudenį (39 proc.). 2018 m. GIRT gB žiemai (4 proc.), priešingai negu 2017 m., būdingi tokie pat gB seroteigiamumo dažniai, kaip ir vasarai (5 proc.), bet šiais metų laikais gB seroteigiamumas rečiau nustatomas negu pavasarį (16 proc.) ir rudenį (14,41 proc.) (pastarųjų metų laikų gB seroteigiamumo detektavimo dažniai yra tokie pat).

Rezultatų pokyčiai per metus: 2018 m. mažiau negu 2017 m. gB seroteigiamų atvejų buvo detektuota žiemą. 2018 m. pavasarį seroteigiamų galvijų detektuota daugiau negu 2017 metais. O vasarą ir rudenį dažnis nepakito – jis vienodas.

gE seroteigiamų atvejų dažnio pokyčiai per metus: 2018 m. mažiau negu 2017 m. gE seroteigiamų galvijų buvo detektuota žiemą ir vasarą. O 2018 m. rudenį seroteigiamų detektuota daugiau negu 2017 metais.

Dėl 2017 m. ir 2018 m. tyrimų pagal metų laikus rezultatų skirtumų kol kas galima tik iškelti hipotezę, kad vasarą rečiau sergama. Galima to priežastis – gyvulių laikymas ganyklose ir mažesnis tarpusavio kontaktas. Taip pat pastebimas GHV-1 seroteigiamų galvijų skaičiaus didėjimas pavasarį, rudenį, žiemą, tikriausiai jis labiausiai išryškėja, kai dėl sezoniškumo laikomi aptvaruose ar tvartuose, tada padidėja rizika užsikrėsti. Toks ryšys tarp metų laikų ir GHV-1 užsikrėtusių galvijų kiekio buvo aptartas 2013 m. Irane atliktame tyrime (A. Ezzi et al., 2013) [187]. Tačiau reikalingi tolesni tyrimai, kad būtų galima pagrįsti arba paneigti ryšį tarp užsikrėtimo GHV-1 ir metų laikų.

Pasiskirstymas pagal veislę. 2017–2018 m. gB seroteigiamumo dažnio pagal veislę pokyčiai: 2018 m. gB seroteigiami rezultatai padažnėjo tarp nežinomos veislės galvijų, bet, palyginti su 2017 m., sumažėjo gB seroteigiamų aubrakų ir Lietuvos juodmargių veislių galvijų. Nepakito gB seroteigiamumo rezultatai tarp holšteinų ir Lietuvos žaliųjų veislės galvijų.

Pagal gautus duomenis, 2018 m. ir 2017 m. statistiškai reikšmingai Lietuvoje didesniu gB seroteigiamų rezultatų dažniu išsiskyrė Lietuvos žalieji, palyginti su limuziniais ir juodmargiais mėsiniais galvijais. Tarp kitų veislių sergamumo dažnis 2018 m. skyrėsi nuo 2017 m. arba nebuvo galima palyginti, todėl reikalingi tolesni tyrimai, kad būtų galima pagrįsti arba paneigti ryšį tarp GHV-1 užsikrėtimo ir veislės. Taip pat įtakos rezultatams galėjo turėti vakcinuoti galvijai, jų laikymo skirtumai ir įvairūs kiti faktoriai.

Pasiskirstymas pagal rajonus. Išanalizavus gautus 2017 m. ir 2018 m. rezultatus, pastebima, kad kai kuriuose rajonuose didesnis galvijų GHV-1 seroteigiamumas nei kituose rajonuose. 2017 m. Radviliškio rajone buvo didesnė gB seroteigiamų galvijų tikimybė nei Pasvalio rajone. Šakių rajone taip pat didesnė gB seroteigiamų galvijų tikimybė negu

Raseiniuose, o šiuose didesnis dažnis gB seroteigiamų galvijų negu Telšiuose. Marijampolės ir Kauno rajonuose dažnesnis gB seroteigiamumas negu Kėdainių, Lazdijų, Vilniaus ir Raseinių rajonuose, taip pat reikšmingai didesnis nei Elektrėnų, Kelmės, Skuodo ir Panevėžio rajonuose. 2018 m. atlikus GIRT gB tyrimus, paaiškėjo, kad Kalvarijų ir Pakruojo rajonuose gB seroteigiami galvijai dažniau nustatomi negu Molėtų, Šilutės, Biržų, Plungės, Raseinių, Lazdijų, Šilalės rajonuose. O Šilalės rajone buvo didesnė tikimybė detektuoti gB seroteigiamą galviją negu Telšių, Lazdijų ir Panevėžio rajonuose. Telšių rajone didesnis gB seroteigiamumas nei Panevėžio.

Iš 2017 m. pagal GIRT gB ištirtų 35 rajonų 12 rajonų buvo aptikta seroteigiamų galvijų, o 2018 m. paplitimas padidėjo – iš 37 tirtų rajonų 20 rajonų buvo aptikta gB seroteigiamų galvijų. Būtina ištirti ir tuos rajonus, kuriuose nebuvo atlikti tyrimai, kad būtų žinomas galimas GHV-1 paplitimas juose ir nustatyta detalesnė būklė rajonų, kurie išsiskiria didesniu GHV-1 užsikrėtusių galvijų dažniu, kai užsakoma ištirti dėl GIRT.

IŠVADOS

1. Iš visų laboratorijoje pagal gB tirtų galvijų 13 proc., o pagal gE tirtų 9 proc. galvijų turėjo antikūnus prieš galvijų 1-o tipo herpes virusą.
2. Karvės ir telyčios dažniau būna infekuoti GHV-1 virusu (pagal gB – 12–14 proc., pagal gE – 6–46 proc.).
3. Pastebėta, kad užsikrėtimui GHV-1 turi įtakos amžius: veršelių grupėse paplitimas 2017 m. siekė net 42 proc. 0–1 mėn. grupėje ir 21 proc. – 2–6 mėn. grupėse, taip pat dažniau užsikrėtę senesni negu 2 m. galvijai – 25–60 mėn. grupėje 21 proc. buvo gB seroteigiamų. Mažiausias paplitimas 7–12 mėn. (4–8 proc.) ir 13–24 mėn. (3–4 proc.) grupėse.
4. Pastebimi GHV-1 paplitimo tarp galvijų reikšmingi sezoniniai skirtumai. Pagal 2017 m. ir 2018 m. duomenis, rudenį (13–14 proc.) dažniau negu vasarą (5–8 proc.) aptinkama seroteigiamų galvijų.
5. Pagal galvijų veisles, Lietuvoje dažnesniu GIRT sergamumo dažniu išsiskiria Lietuvos žalieji (16–17 proc.), palyginti su limuziniais (0–1 proc.) ir juodmargiais mėsiniais (2 proc.) galvijais.
6. Lyginant rajonus, kai kuriuose rajonuose pastebimas didesnis galvijų GHV-1 gB seroteigiamumas. 2017 m. pagal GIRT gB ištirti 35 rajonai – 12 rajonų aptikta seroteigiamų galvijų. 2018 m. paplitimas padidėjo: iš 37 tirtų rajonų 20 rajonų buvo aptikta gB seroteigiamų galvijų.
7. X ir Y rinkiniai, tiek skirti gB, tiek gE antikūnams aptikti, išsiskiria jautrumu, spalvinės reakcijos intensyvumu. Rinkinių optiniai tankiai labiausiai sutapo tik tiriant teigiamus mėginius pagal gB (vidutinė optinių tankių reikšmė: tiriant X rinkiniu – 0,127, Y rinkiniu – 0,116).

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRO BIOMOKSLŲ INSTITUTAS
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Rasa Kirkaitė

**GALVIJŲ INFEKČINIO RINOTRACHEITO (GALVIJŲ I TIPO HERPES VIRUSO)
ANALIZĖ IMUNOLOGINIAIS METODAIS**

Baigiamasis magistro darbas

Santrauka

Darbo tikslas. Ištirti ir išanalizuoti galvijų infekcinio rinotracheito antikūnus kraujo/serumo ėminiuose naudojant dviejų skirtingų gamintojų imunofermentinės analizės rinkinius.

Tyrimo metodai. Tyrimai atlikti 2017–2018 m. Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Virusologinių tyrimų skyriuje. Tyrimo laikotarpiu buvo ištirta 2 115 dėl GHV-1 gB ir 888 dėl GHV-1 gE galvijų kraujo serumo mėginių IFA metodu.

Rezultatai ir išvados. Iš visų pagal gB tirtų galvijų 13 proc., o pagal gE – 9 proc. galvijų turėjo antikūnus prieš I tipo herpes virusą. Moteriškos lyties galvijai dažniau būna infekuoti GHV-1 virusu (pagal gB – 12–14 proc., pagal gE – 6–46 proc.). Pastebėta, kad užsikrėtimui GHV-1 turi įtakos amžius: jaunesnių galvijų grupėse paplitimas 2017 m. siekė net 42 proc. 0–1 mėn. grupėje ir 21 proc. – 2–6 mėn. grupėje, dažniau užsikrėtę ir senesni negu 2 m. galvijai – 25–60 mėn. grupėje 21 proc. buvo gB seroteigiamų. Mažiausias paplitimas 7–12 mėn. (4–8 proc.) ir 13–24 mėn. (3–4 proc.) grupėse. Pastebimi GHV-1 paplitimo tarp galvijų reikšmingi sezoniniai skirtumai. Pagal 2017 m. ir 2018 m. duomenis, rudenį (13–14 proc.) dažniau negu vasarą (5–8 proc.) aptinkama seroteigiamų galvijų. Vertinant pagal veisles, pastebėta, kad Lietuvoje didesniu GIRT sergamumo dažniu išsiskiria Lietuvos žalieji (16–17 proc.), palyginti su limuziniais (0–1 proc.) ir juodmargiais mėsiniais (2 proc.). Lyginant rajonus, kai kur pastebimas didesnis galvijų GHV-1 gB seroteigiamumas. 2017 m. pagal GIRT gB ištirti 35 rajonai – 12 rajonų aptikta seroteigiamų galvijų. 2018 m. paplitimas padidėjo: iš 37 tirtų rajonų 20 aptikta gB seroteigiamų galvijų. Nustatyta, kad naudoti X ir Y rinkiniai, tiek skirti gB, tiek gE antikūnams aptikti, išsiskiria jautrumu, spalvinės reakcijos intensyvumu.

Raktiniai žodžiai. Galvijų infekcinis rinotracheitas, galvijų I tipo herpes virusas.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER BIOSCIENCES INSTITUTE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Rasa Kirkaitė

**ANALYSIS OF BOVINE INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS (BOVINE
HERPESVIRUS 1) BY IMMUNOLOGICAL METHODS**

Master thesis

Summary

The aim of research work: to investigate and analyse antibodies against Infectious Bovine Rhinotracheitis in blood/serum samples using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits from two different manufacturers.

Research methods. Studies conducted in years 2017-2018 at National Food and Veterinary Risk Assessment Institute's Department of Virological Research. During the study, 2115 cattle blood serum samples were tested for BHV-1 gB and 888 for BHV-1 gE by ELISA.

Results and conclusions. Of all tested cattle: 13% of tested by gB and 9% tested with gE kits had antibodies against BHV-1. Female cattle are more likely to be infected with BHV-1 virus (12–14% by gB, 6–46% by gE). Connection between age and infection by BHV-1 has been shown: spread in younger cattle groups in 2017 was 42% in 0–1 month and 21% in 2–6 months age groups, more infected cattle were also detected and in older than 2 years cattle – in the 25-60 months old group 21% were gB-seropositive. Minimum spread noticed in 7–12 months (4–8%) and 13-24 months (3–4%) age groups. There are significant seasonal differences in BHV-1 spread among cattle. According to data of years 2017 and 2018 – in the autumn (13–14%) seropositive cattle were more frequent than in summer (5–8%). By cattle breeds, Lithuanian Greens (16–17%) have a higher incidence of IBR in Lithuania compared to Limousines (0–1%) and Black-and-White Beef (2%) cattle breeds. Comparing the areas, some regions have a higher gB seropositivity of BHV-1 in cattle. In 2017, 35 regions were tested for IBR gB and 12 regions were diagnosed with seropositive cattle. In 2018 the prevalence has increased – gB-seropositive cattle has been detected in 20 regions of 37 tested regions. It has been found that the used X and Y kits, both for the detection of gB and gE antibodies, exhibits differences in sensitivity, intensity of colour reaction.

Key words. Cattle infectious rhinotracheitis, bovine herpesvirus 1.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Labiuk SL, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus 1 is phosphorylated by viral US3 and cellular CK2 protein kinases. *J Gen Virol.* 2009;90(12):2829-2839.
2. Hodgins DC, Conlon JA, Shewen PE. Respiratory viruses and bacteria in cattle. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial Diseases. Polymicrobial Diseases. Washington (DC): ASM Press; 2002. Skyrius 12.
3. Mars MH, De Jong MCM, Van Maanen C, Hage JJ, Van Oirschot JT. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol.* 2000;76(1):1-13.
4. Van Oirschot JT. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q.* 1995;17(1):29-33.
5. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.* 2007;38(2):181-209.
6. Mars MH, De Jong MCM, Franken P, Van Oirschot JT. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine.* 2001;19(15-16):1924-1930.
7. Vonk Noordegraaf A, Buijtel JA, Dijkhuizen AA, Franken P, Stegeman JA, Verhoeff J. An epidemiological and economic simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in The Netherlands. *Prev Vet Med.* 1998;36(3):219-238.
8. Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiäinen M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet Scand.* 2007;49(1):3.
9. Boelaert F, Biront P, Soumare B, et al. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med.* 2000;45(3-4):285-295.
10. Thiry J, Keuser V, Muylkens B, et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res.* 2006;37(2):169-190.
11. Crook TC, Catherine T. Investigating the role of bovine herpesvirus-1 in abortion and systemic disease in cattle. 2011 (Spalis) [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: <https://www.era.lib.ed.ac.uk/handle/1842/5908>.
12. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science (80-).* 1998;280(5369):1618-1620.
13. Connolly SA, Whitbeck JC, Rux AH, et al. Glycoprotein D homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities. *Virology.* 2001;280(1):7-18.
14. Thunuguntla P, El-mayet FS, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can efficiently infect the human (SH-SY5Y) but not the mouse neuroblastoma cell line (Neuro-2A). *Virus Res.* 2017;232:1-5.

15. Zhu L, Fu X, Yuan C, Jiang X, Zhang G. Induction of oxidative DNA damage in bovine herpesvirus 1 infected bovine kidney cells (MDBK cells) and human tumor cells (A549 cells and U2OS cells). *Viruses*. 2018;10(8).
16. Herpesviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2011 [Žiūrėta 2018-11-9]. Prieiga internetu: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae.
17. Edwards S, White H, Nixon P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. *Vet Microbiol*. 1990;22(2-3):213-223.
18. Edwards S, Newman RH, White H. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br Vet J*. 1991;147(3):216-231.
19. Miller JM, Van der Maaten MJ, Whetstone CA. Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*. 1988;49(10):1653-1656.
20. Graham DA. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Ir Vet J*. 2013;66(1):15.
21. Spilki FR, Esteves PA, Lima M de, et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesqui Veterinária Bras*. 2004;24(1):43-49.
22. Schroeder RJ, Moys MD. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1954;125(933):471-472.
23. Miller NJ. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1955;126(939):463-467.
24. Jacevičius E. Galvijų infekcinio rinotracheito epidemiologinė padėtis, diagnostika, profilaktika ir prevencija Lietuvoje. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. 2012.
25. Fraefel C, Wirth U V, Vogt B, Schwyzer M. Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1 : the circ gene. *J Virol*. 1993;67(3):1328-1333.
26. Robinson KE, Meers J, Gravel JL, McCarthy FM, Mahony TJ. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol*. 2008;89(11):2851-2863.
27. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol*. 1996;53(1-2):3-15.
28. Wirth U V, Gunkel K, Engels M, Schwyzer M. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J Virol*. 1989.
29. Miller JM, Whetstone CA, Bello LJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res*. 1991;52(7):1038-1043.
30. Glazov EA, Horwood PF, Assavalapsakul W, et al. Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome. *J Gen Virol*. 2010;91(1):32-41.

31. Cullen BR. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature*. 2009;457(7228):421-425.
32. Russell T, Bleasdale B, Hollinshead M, Elliott G. Qualitative differences in capsidless L-particles released as a by-product of bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus 1 infections. *J Virol*. 2018;92(22):e01259-18.
33. Loret S, Guay G, Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*. 2008;82(17):8605-8618.
34. Barber KA, Daugherty HC, Ander SE, et al. Protein composition of the bovine herpesvirus 1.1 virion. *Vet Sci*. 2017;4(1).
35. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Heal Res Rev*. 2009;10(01):85-98.
36. Luecke S, Paludan SR. Innate recognition of alphaherpesvirus DNA. Vol 92. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015.
37. Li Y, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Babiuk LA, Liang X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of GB. *J Virol*. 1995.
38. Liang X, Babiuk LA, Zamb TJ. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology*. 1992;189(2):629-639.
39. Liang XP, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Fitzpatrick DR, Zamb TJ. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *J Virol*. 1991;65(3):1124-1132.
40. Okazaki K, Honda E, Kono Y. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIII by a recombinant baculovirus in insect cells. *J Gen Virol*. 1994.
41. Okazaki K, Honda E, Kono Y. Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. *Arch Virol*. 1994;134(3-4):413-419.
42. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol*. 10(5):305-319.
43. Liang X, Pyne C, Li Y, Babiuk LA, Kowalski J. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology*. 1995;207(2):429-441.
44. Ligas MW, Johnson DC. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol*. 1988;62(5):1486-1494.
45. Gerdts V, Beyer J, Lomniczi B, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol*. 2000;74(2):817-827.
46. Thiry E, Hanon E, Pastoret PP, Meyer G, Georlette D. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol*.

- 1998;79(8):1983-1987.
47. Döhner K, Wolfstein A, Prank U, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*. 2002;13(8):2795-2809.
 48. Reynolds AE, Liang L, Baines JD. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U L 31 and U L 34. *J Virol*. 2004;78(11):5564-5575.
 49. Antinone SE, Shubeita GT, Coller KE, et al. The herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol*. 2006;72(9):7563-7568.
 50. Carpenter DE, Misra V. The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *J Gen Virol*. 1991;72(12):3077-3084.
 51. Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Garzon S, Van Den Hurk JV, Babiuk LA, Tijssen P. The role of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. *Virology*. 1995;206(1):413-425.
 52. Zheng C, Brownlie R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. *Virology*. 2004;324(2):327-339.
 53. Hinkley S, Ambagala APN, Jones CJ, Srikumaran S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch Virol*. 2000;1(10):2027-2046.
 54. Koppers-Lalic D, Rijsewijk FAM, Verschuren SBE, et al. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol*. 2001;82(9):2071-2081.
 55. Garber DA, Beverley SM, Coen DM. Demonstration of Circularization of Herpes Simplex Virus DNA Following infection Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Virology*. 1993;197(1):459-462.
 56. Jean JH, Ben-Porat T. Appearance in vivo of single-stranded complementary ends on parental herpesvirus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(8):2674-2678.
 57. Misra V, Walker S, Hayes S, O'Hare P. The bovine herpesvirus alpha gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. *J Virol*. 1995;69(9):5209-5216.
 58. Misra V, Bratanich AC, Carpenter D, O'Hare P. Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus (BHV) 1 IE-1 transcription unit by the BHV alpha gene trans-inducing factor. *J Virol*. 1994;68(8):4898-4909.
 59. Wirth U V, Fraefel C, Vogt B, Vlcek C, Paces V, Schwyzer M. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *J Virol*. 1992;66(5):2763-2772.
 60. Wirth U V, Vogt B, Schwyzer M. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J Virol*. 1991;65(1):195-205.
 61. Jones C, Geiser V, Henderson G, et al. Functional analysis of bovine herpesvirus 1

- (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4):199-210.
62. Geiser V, Zhang Y, Jones C. Analysis of a bovine herpesvirus 1 recombinant virus that does not express the bICP0 protein. *J Gen Virol.* 2005;86(7):1987-1996.
 63. Saydam O, Steiner F, Vogt B, Schwyzer M. Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4):185-192.
 64. Saydam O, Abril C, Vogt B, Ackermann M, Schwyzer M. Transactivator protein BICP0 of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is blocked by prostaglandin D2 (PGD2), which points to a mechanism for PGD2-mediated inhibition of BHV-1 replication. *J Virol.* 2004;78(8):3805-3810.
 65. Chew DSH, Choi KP, Leung M-Y. Scoring schemes of palindrome clusters for more sensitive prediction of replication origins in herpesviruses. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(15):e134.
 66. Thiry E, Meurens F, Muylkens B, et al. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol.* 2005;15(2):89-103.
 67. Schynts F, McVoy MA, Meurens F, Detry B, Epstein AL, Thiry E. The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: Implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology.* 2003;314(1):326-335.
 68. Schynts F, et al. Study of recombination and DNA replicative forms of bovine herpesvirus 1. 2002.
 69. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002;76(4):1537-1547.
 70. Mettenleiter TC, Minson T, Wild P. Egress of alphaherpesviruses. *J Virol.* 2006;80(3):1610-1612.
 71. Mettenleiter TC. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4):163-169.
 72. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):423-429.
 73. Wild P, Engels M, Senn C, et al. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol.* 2005;79(2):1071-1083.
 74. Leuzinger H, Ziegler U, Schraner EM, et al. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol.* 2005;79(20):13047-13059.
 75. Miller JM, Whetstone CA, Van der Maaten MJ. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res.* 1991;52(3):458-461.
 76. Whetstone CA, Miller JM, Seal BS, Bello LJ, Lawrence WC. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol.* 1992;122(1-2):207-214.
 77. Whetstone CA, Miller JM. Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol.* 1989;107(1-2):27-34.
 78. Fuchs M, Hübert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in

- blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2498-2507.
79. Mweene AS, Okazaki K, Kida H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn J Vet Res.* 1996;44(3):165-174.
 80. Crook T, Benavides J, Russell G, Gilray J, Maley M, Willoughby K. Bovine herpesvirus 1 abortion: Current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. *J Vet Diagnostic Investig.* 2012;24(4):662-670.
 81. Rodger SM, Murray J, Underwood C, Buxton D. Microscopical lesions and antigen distribution in bovine fetal tissues and placentae following experimental infection with bovine herpesvirus-1 during pregnancy. *J Comp Pathol.* 2007;137(2-3):94-101.
 82. Roels S, Charlier G, Letellier C, et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet Rec.* 2000;146(20):586-588.
 83. Horiuchi M, Yamazaki N, Furuoka H, et al. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J Vet Med Sci.* 1995;57(3):577-580.
 84. d'Offay JM, Mock RE, Fulton RW. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am J Vet Res.* 1993;54(4):534-539.
 85. Meyer G, Lemaire M, Ros C, et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol.* 2001;146(4):633-652.
 86. Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol.* 2000;74(11):5337-5346.
 87. Henderson G, Perng G-C, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol.* 2004;10(1):64-70.
 88. Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med.* 2000;191(9):1459-1466.
 89. Mikloska Z, Cunningham AL. Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. *J Virol.* 2001;75(23):11821-11826.
 90. Thiry E, Saliki J, Bublot M, Pastoret PP. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1987;10(1):59-63.
 91. Thiry E, Saliki J, Schwers A, Pastoret PP. Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *Vet Rec.* 1985;116(22):599-600.
 92. Sheffy BE, Davies DH. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972;140(3):974-976.

93. Otsuka H, Qavi H, Kit S. Inhibition by interferon of biochemical transformation induced by cloned herpesvirus thymidine kinase genes. *Antiviral Res.* 1982;2(5):301-311.
94. Palmer LD, Leary TP. Bovine natural killer-like cell responses against cell lines expressing recombinant bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *J Immunol.* 1990; 145:1009–1014.
95. Babiuk LA, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 1996;53(1-2):31-42.
96. Heidenreich S, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Macrophage activation by granulocyte / macrophage colony-stimulating factor . Priming for enhanced release of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol.* 1989;143:1198–1205.
97. Deshpande MS, Ambagala TC, Hegde NR, Hariharan MJ, Navaratnam M, Srikumaran S. Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization. *Vaccine.* 2002;20(31-32):3744-3751.
98. Denis M, Keil MSG, Babiuk LA, Ernst E, Pastoret P, Thiry E. Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. 1993.
99. Turin L, Russo S, Poli G. BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med.* 1999;5(5):261-284.
100. Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, et al. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1885-1894.
101. Madic J, Magdalena J, Quak J, van Oirschot JT. Isotype-specific antibody responses to bovine herpesvirus 1 in sera and mucosal secretions of calves after experimental reinfection and after reactivation. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;47(1-2):81-92.
102. Papp Z, Babiuk LA, Baca-Estrada ME. Induction of immunity in the respiratory tract and protection from bovine herpesvirus type 1 infection by different routes of immunization with recombinant adenovirus. *Viral Immunol.* 1998;11(2):79-91.
103. Henderson G, Zhang Y, Jones C. The bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. *J Gen Virol.* 2005;86(10):2697-2702.
104. Saira K, Zhou Y, Jones C. The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 and, consequently, inhibits beta interferon promoter activity. *J Virol.* 2007;81(7):3077-3086.
105. Huemer HP, Larcher C, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA. Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the “unspecific” immune system of the host. *Arch Virol.* 1993;130(3-4):353-364.
106. Winkler MTC, Doster A, Jones C. Bovine Herpesvirus 1 Can Infect CD4+ T Lymphocytes and Induce Programmed Cell Death during Acute Infection of Cattle. *J Virol.* 1999;73(10):8657-8668.
107. Srikumaran S, Kelling CL, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Heal Res Rev.* 2007;8(2):215-229.

108. Koppers-Lalic D, Reits EAJ, Rensing ME, et al. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(14):5144-5149.
109. Četkauskaitė A. Imunotoksikologija bei cheminių medžiagų ir patogenų sukkelto streso biožymenys. 2005;7:1-55.
110. Bryant NA, Davis-Poynter N, Vanderplasschen A, Alcami A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J*. 2003;22(4):833-846.
111. Hanon E, Meyer G, Vanderplasschen A, Dessy-Doize C, Thiry E, Pastoret PP. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *J Virol*. 1998;72(9):7638-7641.
112. Hanon E, Keil G, Van Drunen Littel-van Den Hurk S, et al. Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: Role of glycoprotein D. *Virology*. 1999;257(1):191-197.
113. Hanon E, Vanderplasschen a, Lyaku S, Keil G, Denis M, Pastoret PP. Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*. 1996;70(6):4116-4120.
114. Brown TT, Ananaba G. Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. *Am J Vet Res*. 1988;49(9):1447-1451.
115. Warren LM, Babiuk LA, Campos M. Effects of BHV-1 on PMN adhesion to bovine lung endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;55(1-3):73-82.
116. Trapp S, Osterrieder N, Keil GM, Beer M. Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: Analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J Gen Virol*. 2003;84(2):301-306.
117. Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J Virol*. 1999;73(12):9734-9740.
118. Nettleton P, Russell G. Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In Pract*. 2017;39(6):255-272.
119. Beer M, Dastjerdi A. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *OIE Terr Man*. 2017.
120. Madin SH, Mckercher DG, York CJ. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*. 1956;124(3225):721-722.
121. Varela APM, Holz CL, Cibulski SP, et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet Microbiol*. 2010;142(3-4):254-260.
122. Das Neves CG, Roger M, Yoccoz NG, Rimstad E, Tryland M. Evaluation of three commercial bovine ELISA kits for detection of antibodies against Alphaherpesviruses in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Acta Vet Scand*. 2009;51(1):1-10.
123. Kramps JA, Banks M, Beer M, et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol*. 2004;102(3-4):169-181.

124. Kaashoek MJ, Moerman A, Madić J, et al. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*. 1995;13(4):342-346.
125. Spilki FR, Esteves PA, Da Silva ADÁ, Franco AC, Rijsewijk FAM, Roehle PM. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J Virol Methods*. 2005;129(2):191-193.
126. Vilcek S, Nettleton PF, Herring JA, Herring AJ. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 1994;42(1):53-64.
127. Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res Vet Sci*. 2005;79(1):85-88.
128. Mweene AS, Okazaki K, Kida H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 1996;44(3):165–174.
129. De-Giuli L, Magnino S, Vigo PG, Labalestra I, Fabbi M. Development of a polymerase chain reaction and restriction typing assay for the diagnosis of bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 2, and bovine herpesvirus 4 infections. *J Vet Diagn Invest*. 2002;14(4):353-356.
130. Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart Á V, Wosiacki SR, Médici KC, Alfieri AA. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods*. 2005;128(1-2):183-188.
131. Mackay, I. M.; Arden, K.E.; Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(6):1292-1305. doi:10.1093/nar/30.6.1292
132. Dieter Klein. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002;8(6):257-260.
133. Niesters HGM. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 2001;25(4):419-429.
134. Wang J, O’Keefe J, Orr D, et al. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *J Virol Methods*. 2007;144(1-2):103-108.
135. Wang J, O’Keefe J, Orr D, et al. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet Microbiol*. 2008;126(1-3):11-19.
136. Thonur L, Maley M, Gilray J, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet Res*. 2012;8(1):37.
137. NOAH Compendium [Žiūrēta 2019-01-28]. Prieiga internetu: <http://www.noahcompendium.co.uk/home>.
138. O’Toole D, Chase CCL, Miller MM, Van Campen H. Kennedy, the Early Sixties, and Visitation by the Angel of Death. *Vet Pathol*. 2014;51(6):1051-1062.
139. Radostits OM, Done SH. *Veterinary Medicine : A Textbook of the Diseases of Cattle*,

- Sheep, Pigs, Goats, and Horses. Elsevier Saunders; 2007.
140. Chase CCL, Fulton RW, O'Toole D, et al. Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Vet Microbiol.* 2017;206(2016):69-77.
 141. Makoschey B, Beer M. A live Bovine Herpesvirus-1 marker vaccine is not shed after intramuscular vaccination. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2007;120(11-12):480-481.
 142. Jillian Bohlen. Impact of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) on Reproduction in Cattle. UGA Cooperative Extension. 2013.
 143. McFeely RA, Merritt AM, Steraly EL. Abortion in a dairy herd vaccinated for infectious bovine rhinotracheitis. *J Am Vet Med Assoc.* 1968;153(6):657-661.
 144. Su W, Wang W. Evaluating an Inactivated Infectious Bovine Rhinotracheitis Vaccine for Safety and Efficacy. *Acta Scientific Microbiology.* 2018;1(6):9-12.
 145. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol.* 1996;53(1-2):43-54.
 146. Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Herbert JM, et al. in Pregnant Heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;231(9):3-6.
 147. Strube W, Auer S, Block W, et al. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet Microbiol.* 1996;53(1-2):181-189.
 148. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Stegeman JA. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J Biotechnol.* 1996;44(1-3):75-81.
 149. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4 SPEC. ISS.):293-302.
 150. Van Drunen Littel-Van Den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4 SPEC. ISS.):275-282.
 151. Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J.* 2014;201(3):249-256.
 152. De Wit JJ, Hage JJ, Brinkhof J, Westenbrink F. A comparative study of serological tests for use in the bovine Herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. *Vet Microbiol.* 1998;61(3):153-163.
 153. Schroeder C, Horner S, Bürger N, et al. Improving the sensitivity of the IBR-gE ELISA for testing IBR marker vaccinated cows from bulk milk. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 125(7-8):290-296.
 154. Bertolotti L, Muratore E, Nogarol C, et al. Development and validation of an indirect ELISA as a confirmatory test for surveillance of infectious bovine rhinotracheitis in vaccinated herds. *BMC Vet Res.* 2015;11(1):5-11.
 155. Kalthoff D, König P, Trapp S, Beer M. Immunization and challenge experiments with a new modified live bovine herpesvirus type 1 marker vaccine prototype adjuvanted with a co-polymer. *Vaccine.* 2010;28(36):5871-5877.

156. Gupta PK, Saini M, Gupta LK, et al. Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol.* 2001;78(4):293-305.
157. Loehr BI, Willson P, Babiuk L a., van Drunen Littel-van den Hurk S. Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle. *J Virol.* 2000;74(13):6077-6086.
158. Oliveira SC, Harms JS, Rosinha GMS, Rodarte RS, Rech EL, Splitter GA. Biolistic-mediated gene transfer using the bovine herpesvirus-1 glycoprotein D is an effective delivery system to induce neutralizing antibodies in its natural host. *J Immunol Methods.* 2000;245(1-2):109-118.
159. Toussaint JF, Letellier C, Paquet D, Dispas M, Kerkhofs P. Prime-boost strategies combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. *Vaccine.* 2005;23(43):5073-5081.
160. Toussaint J-F, Coen L, Letellier C, et al. Genetic immunisation of cattle against Bovine herpesvirus 1: glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8. *Vet Res.* 2005;36(4):529-544.
161. Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol.* 2002;76(18):9002-9010.
162. Kydd JH, Townsend HGG, Hannant D. The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;111(1-2):15-30.
163. Kydd JH, Watrang E, Hannant D. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;96(3-4):207-217.
164. Van Drunen Littel-van den Hurk S, Van Donkersgoed J, Kowalski J, et al. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine.* 1994;12(14):1295-1302.
165. Hurk SVDL den, Tikoo SK, Liang X, Babiuk LA. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol.* 1993;71(5):405-420.
166. Gogev S, Vanderheijden N, Lemaire M, et al. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine.* 2002;20(9-10):1451-1465.
167. Gogev S, Georgin J-P, Schynts F, Vanderplasschen A, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet Res.* 2004;35:715-721.
168. Papp Z, Pyne C, Griebel P, et al. Mucosal immunization of calves with recombinant bovine adenovirus-3: induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1. *J Gen Virol.* 1999;80(5):1263-1269.
169. Reddy PS, Idamakanti N, Chen Y, et al. Replication-defective bovine adenovirus type

- 3 as an expression vector. *J Virol.* 1999;73(11):9137-9144.
170. Pérez Filgueira DM, Zamorano PI, Domínguez MG, et al. Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine.* 2003;21(27-30):4201-4209.
 171. Gogev S, De Fays K, Versali MF, Gautier S, Thiry E. Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administered replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine.* 2004;22(15-16):1946-1953.
 172. Nichani A, Mena A, Kaushik R. Stimulation of innate immune responses by CpG oligodeoxynucleotide in newborn lambs can reduce bovine herpesvirus-1 shedding. *Oligonucleotides.* 2006;16(1):58-67.
 173. Richens IF, Hobson-West P, Brennan ML, et al. Factors influencing veterinary surgeons' decision-making about dairy cattle vaccination. *Vet Rec.* 2016;179(16).
 174. Cattle Health Certification Standards. Incorporating Rules for Cattle Health Schemes. 2015;(Liepa) [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: <http://www.checs.co.uk/wp-content/uploads/2015/08/CHeCS-Technical-Document-final-2015.pdf>.
 175. Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiäinen M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet Scand.* 2007;49(1):1-6.
 176. Lazić S, Petrović T, Bugarski D, et al. Prospectives and Necessity of Eradication of Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis. *Arch Vet Med.* 2016;9(1):3-12.
 177. Ackermann M, Müller HK, Bruckner L, Kihm U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet Microbiol.* 1990;23(1-4):365-370.
 178. Corkish JD. An attempt to establish a herd serologically negative for infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Rec.* 1988;122(23):552-554.
 179. Komisijos Sprendimas 2004 m. Liepos 15 d. Dėl Tarybos Drektyvos 64/432/EEB Dėl Papildomų Bendrijos Galvijų Vidaus Prekybos Garantijų, Susijusių Su Infekciniu Galvijų Rinotracheitu, Ir Infekcijos Likvidavimo Programų, Pateiktų Atitinkamų Valstybių Narių, Patvirtinimo Įgyvendinimo. 2014 [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004D0558-20141010&from=EN>.
 180. Komisijos Įgyvendinimo Sprendimas 2014 m. Spalio 8 d. Dėl Infekcinio Galvijų Rinotracheito Likvidavimo Belgijoje Kontrolės Programos Patvirtinimo Ir Dėl Vokietijos Tiuringijos Federalinės Žemės Statuso Kaip Neužkrėstos Infekciniu Galvijų Rinotracheitu Iš Dalies Keičiami Sprendimo 2004/558/EB I Ir II Priedai. 2014 [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014D0703&from=EN>.
 181. Bovine and Swine Diseases, Situation 2016. 2016 [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/la_annual-situation_2016.pdf.
 182. OIE. Access online: OIE - World Organisation for Animal Health. 2018 [Žiūrėta 2019-

- 01-29]. Prieiga internetu: <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/>.
183. OIE. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. 2018 [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_ibr_ipv.htm.
184. Algirdas Šalomska et al. Galvijų infekcinio rinotracheito ir virusinės diarėjos diagnostikos ir prevencijos problemos. 2006;33(55).
185. Žinynas gyvulių pienininkystei - augintojams [Žiūrėta 2019-01-29]. Prieiga internetu: https://www.vxa.se/globalassets/dokument/fordjupningar/info-pa-flera-sprak/manual_for_livestock_keepers_lithuanian.pdf.
186. Jamieson A. Vadovas Mėsinių Galvijų Augintojui. Lietuvos gamtos fondas; 2013.
187. Ezzi A, Hatami A, Bakhshesh M, Shoukri MR, Gharaghozloyan M. Serological study of bovine herpesvirus type 1 and parainfluenza type 3 in cow farms of Qazvin province based on different ages and seasons. *Arch Razi Inst.* 2013;68(1):53-57.