

# Zmiany histopatologiczne i ekspresja związanego z latencją RNA herpeswirusa koni typu 1 (EHV-1) w ośrodkowym układzie nerwowym myszy zakażonych izolatem terenowym\*)

MARCIN BAÑBURA, HANNA SENDECKA\*, ANNA CHMIELEWSKA, ANNA TUCHOLSKA

Katedra Chorób Zakaźnych, Mikrobiologii i Parazytologii

i \*Katedra Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Bañbura M., Sendeczka H., Chmielewska A., Tucholska A.

## Histopathological changes and expression of latency-related RNA in the central nervous systems of mice latently infected with a field isolate of EHV-1

### Summary

Nine inbred BALB/c (H-2<sup>d</sup>) 4-week old female mice were intranasally infected with  $2.5 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub> of EHV-1 strain isolated from an aborted foetus. Three mice died on days 3, 5 and 8. In 4 out of the 6 mice which survived, nested PCR with DNA extracted from the brains of the infected mice resulted 56 days post-infection in a single 1.29 kb band specific for EHV-1 observed after the second round of amplification. Histopathological examination of brains in PCR-positive mice showed the presence of mononuclear cells infiltration, degeneration of neurones and proliferation of glial cells. DNA/RNA in situ hybridization performed on brain sections using the biotin-labelled, purified genomic viral DNA revealed the probe bound to the nuclei of some neurones, presumably localized in the rhinencephalon.

**Keywords:** EHV-1, infection in mice, latency, LR-RNA.

Herpeswirus koni typ 1 (Equine herpesvirus type-1; EHV-1), należący do podrodziny  $\alpha$ -herpesvirinae, jest czynnikiem etiologicznym powodującym zakażenia górnych dróg oddechowych, zaburzenia neurologiczne i ronienia (1, 14, 18, 19). Podobnie jak inne  $\alpha$ -herpeswirusy, EHV-1 powoduje także zakażenia latentne (6, 9, 15), odgrywające istotną rolę w epidemiologii wirusowego zakaźnego ronienia klaczy. Latentnie zakażone zwierzę jest potencjalnym siewcą wirusa, który, reaktywowany ze stanu latencji, powodować może „endogenne” infekcje, przebiegające często bezobjawowo.

Podczas zakażenia latentnego ekspresja genów wirusowych jest ograniczona do tzw. związanego z latencją RNA (Latency-Related RNA, LR-RNA), a ostatnie prace wskazują na tkankę nerwową jako miejsce, w którym wirus ustala latentny stan zakażenia u koni (6). Wirusowy DNA stwierdzany jest też techniką zagnieżdżonej reakcji łańcuchowej polimeryzacji (nested PCR; nPCR) w neuronach zwoju trójdzielnego (6), skąd wirus może być reaktywowany (6, 15). Prócz tkanki nerwowej również leukocyty krwi obwodowej i inne komórki układu immunologicznego mogą być

miejscem latencji EHV-1 (10, 21). Badania nad produktywnymi i latentnymi zakażeniami EHV-1 u naturalnego gospodarza są jednak bardzo ograniczone, zarówno ze względów ekonomicznych, jak i z uwagi na trudności z uzyskaniem zwierząt doświadczalnych „immunologicznie niedoświadczonych”, t.j. takich, które nie miały kontaktu z wirusem. Ponadto, na wynik tego rodzaju badań, jak sugerują niektórzy autorzy, mogą mieć wpływ dość powszechnie występujące zakażenia herpeswirusem typu 2, tzw. cytomegalowirusem koni (21). Dlatego też badania nad patogenezą zakażenia EHV-1 i innymi zjawiskami związanymi z zakażeniami produktywnymi i latentnymi często wykonywane są na zwierzęciu modelowym jakim jest mysz. Model ten został dobrze poznany i wykazano, że zakażenie EHV-1 u myszy przebiega podobnie jak u naturalnego gospodarza. W fazie ostrej występuje zatem wiremia (2, 5, 11), dochodzi do replikacji wirusa w układzie oddechowym (2, 4, 5), u ciężarnych samic obserwuje się tropizm wirusa do płodów (3), a w fazie latentnej zakażenia wirus stwierdzany jest w tkance nerwowej (5, 12).

Choć w ostrej fazie zakażenia u myszy obecność DNA EHV-1 stwierdzana jest w płucach, małżowinach nosowych, mózgu, śledzionie, opuszkach węcho-

\*) Praca finansowana w ramach grantu KBN 5P06K 038 09.

wych, zwoju trójdzielnym i monocytach krwi obwodowej, to zakażenie latentne wydaje się ograniczać do opuszek węchowych, zwoju trójdzielnego i monocytów krwi obwodowej (5). Ponadto, w odróżnieniu od naturalnego gospodarza, w latentnie zakażonych neuronach myszy nie wykazano dotąd obecności LR-RNA.

Celem przeprowadzonych badań było określenie ekspresji związanego z latencją RNA EHV-1 w ośrodkowym układzie nerwowym myszy latentnie zakażonych terenowym izolatem EHV-1.

### Material i metody

Szczep wirusa użyty do zakażenia myszy izolowano z tkanek płodu poronionego wskutek zakażenia wirusem zakaźnego ronienia klaczy. W celu identyfikacji wirusa, z fragmentów wątroby płodu ekstrahowano DNA (16) i poddawano amplifikacji ze starterami specyficznymi dla EHV-1 (7). Z pozostałej próbki wykonywano 10% homogenizat, który użyto do zakażenia hodowli komórek RK13. Izolowany wirus, oznaczony symbolem Jan-E, pasażowano trzykrotnie w hodowlach komórek ED (Equine dermal cells) i w czwartym pasażu namnożono w objętości ok. 1000 ml, zagęszczono, oczyszczono przez ultrawirowanie w skokowym gradencie gęstości sacharozy (55%, 45%, 35%, 25%) i, po odwirowaniu, rozprowadzono w buforze TE i zmianowano w hodowli komórek ED. Część zawiesiny użyta została do donosowego zakażenia myszy, natomiast z pozostałej części ekstrahowano wirusowy DNA, który posłużył do sporządzenia sondy do hybrydyzacji *in situ*.

Grupę 9 myszy BALB/c (H-2<sup>d</sup>) zakażono donosowo dawką  $2,5 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub> w 25 µl płynu. Sześciu myszom kontrolnym podano 25 µl lizatu hodowli niezakażonej. W 8 tygodni po zakażeniu od zwierząt pobierano mózgi do badania histopatologicznego i hybrydyzacji *in situ*. Ponadto, z fragmentów tkanek ekstrahowano DNA i amplifikowano techniką nested PCR (7) w celu stwierdzenia obecności wirusowego DNA.

Tkanki do badania histopatologicznego utrwalano w formalinie, zatapiano w parafinie i skrawki grubości 5 µm barwiono hematoksyliną-eozyną.

Tkanki do hybrydyzacji *in situ* utrwalano w utrwalaczu nadjodanowo-lizynowo-paraformaldehydowym (17) przez 24 godziny, standardowymi metodami wykonywano skrawki parafinowe i umieszczano je na szkiełkach podstawowych przygotowanych uprzednio do tego celu przy pomocy preparatu Vectabond (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), co zapobiegało odklejaniu skrawków podczas przygotowania do hybrydyzacji. Następnie skrawki odparafinowywano ksylenem i uwadniano w stopniowanych roztworach etanolu. Przed hybrydyzacją preparaty inkubowano przez 20 min. w 0,2 M HCl w temperaturze pokojowej, 30 min. w  $2 \times$ SSC (300 mM NaCl, 30 mM cytrynian sodu, pH 7,0) w temperaturze 70°C i 15 min. w 37°C, w buforze zawierającym 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM CaCl<sub>2</sub> i 1 µg/ml proteinazy K (8). Po odwodnieniu w stopniowanych roztworach etanolu i wysuszeniu preparaty przechowywano w temperaturze pokojowej do chwili wykonania hybrydyzacji.

W celu umożliwienia obliczenia odsetka neuronów hybrydyzacyjnie pozytywnych, z tkanek utrwalanych w utrwala-

laczu nadjodanowym wykonywano, z kolejnych skrawków, po dwa preparaty. Jeden z nich barwiono hematoksyliną-eozyną, drugi natomiast służył do wykonania hybrydyzacji *in situ*.

Sondę do hybrydyzacji *in situ* stanowił genomowy DNA szczepu Jan-E znakowany fotoaktywowalną formą biotyny (Photoprobe Biotin), komercyjnym zestawem Photoprobe Biotin Labelling/Detection Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). 10 µl roztworu biotyny Photoprobe mieszano z równą objętością roztworu zawierającego 10 µg wirusowego DNA i naświetlano przez 15 min. przy pomocy lampy rtęciowej (marcury vapor bulb, HWL 250W, Osram, Germany). Następnie mieszaninę ekstrahowano 2-butanołem w celu usunięcia nie związanej biotyny, a znakowany DNA precypitowano etanolem, odwirowywano i rozpuszczano w 20 µl jałowej wody dejonizowanej.

Przed hybrydyzacją skrawki uwadniano, inkubowano przez 30 min. w 37°C w obecności DNA-zy wolnej od RNA-zy (Promega, Madison, WI, USA) i prehybrydyzowano w temp. 45°C przez 1 godz. w buforze prehybrydyzacyjnym zawierającym 50% formanidu, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 0,02% poliwinylopyrrolidonu, 0,02% Ficoll'u, 1 mg/ml albuminy bydlęcej (BSA) i 100 µg/ml DNA z jąder łososia, a następnie hybrydyzowano w tym samym buforze w obecności 10 ng sondy/skrawek (8, 17). Bezpośrednio przed hybrydyzacją sondę denaturowano przez ogrzewanie w 100°C przez 3 min., schładzano na łaźni lodowej, w objętości ok. 200 µl наносzono na skrawki i inkubowano przez 48 godzin w 45°C, w komorze wilgotnej. Po hybrydyzacji preparaty płukano trzykrotnie w buforze zawierającym 50% formamidu, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA i 600 mM NaCl, trzecią porcję płynu pozostawiając na 16 godzin.

Hybrydyzowaną sondę wykrywano przy pomocy zestawu Photoprobe Labelling/Detection Kit. Preparaty płukano trzykrotnie w buforze TTBS (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20), pokrywano odczynnikiem Vecstatin ABC-AP i inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie preparaty ponownie płukano trzykrotnie w TTBS, trzecią porcję płynu pozostawiając na 16 godzin. Reakcję barwną wywoływano przy pomocy odczynnika Alkaline Phosphatase Substrate solution w 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, preparaty płukano trzykrotnie w TTBS, trzecią porcję płynu pozostawiając na 16 godzin, odwadniano w stopniowanych roztworach etanolu, suszono i zatapiano w balsamie kanadyjskim.

Kontrolę pozytywną hybrydyzacji *in situ* stanowiła hodowla komórek ED zakażona izolatem Jan-E, z której 3 godziny po zakażeniu wykonywano preparaty cytopspino-we i wykonywano hybrydyzację w sposób opisany powyżej. Jako kontroli negatywnej używano nie zakażonej hodowli komórek ED.

Obserwacje preparatów przeprowadzano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60. Liczbę neuronów w skrawku określano w preparatach barwionych hematoksyliną-eozyną, techniką cyfrową przy pomocy programu LUCIA Screen Measurement, Ver. 4.21, Laboratory Imaging, Ltd., natomiast neurony hybrydyzacyjnie pozytywne liczono w skrawku nie barwionym.

## Wyniki i omówienie

W wyniku amplifikacji DNA ekstrahowanego z wątroby i płuc poronionego płodu uzyskano produkt amplifikacji o wielkości ok. 1,9 tys. par zasad (kpz), identyczny z obserwowanym w kontroli pozytywnej (ryc. 1, ścieżka 1). W kontroli negatywnej i kontroli specyficzności reakcji amplifikacji nie stwierdzono.

W hodowlach komórkowych inokulowanych homogenizatem z wątroby poronionego płodu, w pierwszym pasażu efekt cytopatyczny pojawiał się 4 dnia po zakażeniu, natomiast w następnych pasażach widoczny był już po 24 godzinach i przejawiał się powstawaniem ognisk litycznych otoczonych dużymi, okrągłymi, tworzącymi nitkowate wypustki komórkami. Badanie DNA ekstrahowanego z zakażonej hodowli komórkowej w 4 pasażu potwierdziło, iż wyizolowany wirus należał do typu 1 (ryc. 1, ścieżka 2).

Miano namnożonego, zagęszczonego i oczyszczonego w gradiencie gęstości wirusa wynosiło  $10^{8,8}$  CCID<sub>50</sub>/ml. Zawiesinę rozcieńczono tak, by doprowadzić do koncentracji  $10^7$  CCID<sub>50</sub>/ml, zatem 25 µl zawierało  $2,5 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub> i dawka ta została użyta do donosowego zakażenia myszy.

U myszy BALB/c zakażenie szczepem Jan-E objawiało się, w ciągu pierwszych 4-5 dni, nastroszeniem sierści i niezbornością ruchową. Ponadto, spośród 9 użytych do eksperymentu zwierząt trzy padły w 3, 4 i 8 dni po zakażeniu. Po 8 tygodniach u 4 spośród 6 myszy, które przeżyły zakażenie, techniką nested PCR wykazano obecność wirusowego DNA, przy czym specyficzny dla wirusa produkt uzyskano wyłącznie po drugiej rundzie amplifikacji (ryc. 2). U zwierząt tych stwierdzano zmiany histopatologiczne w postaci nacieków komórek jednojądrzastych infiltrujących tkankę nerwową (ryc. 3 A), degeneracji neuronów przejawiającej się w ich zaokrągleniu i nienormalnej barwności (ryc. 3 B) oraz proliferacji komórek glejowych tworzących małe guzki (ryc. 3 C). Nacieki monocytów zlokalizowane były głównie, ale nie wyłącznie, okołonaczyniowo, w warstwie korowej, podczas gdy degeneracja neuronów obserwowana była raczej w głębokich partiach półkul mózgowych.

DNA/RNA hybrydyzacja *in situ* wykazała przyłączanie sondy do jąder niektórych neuronów (ryc. 4), zlokalizowanych głównie w głębokich warstwach półkul mózgowych.

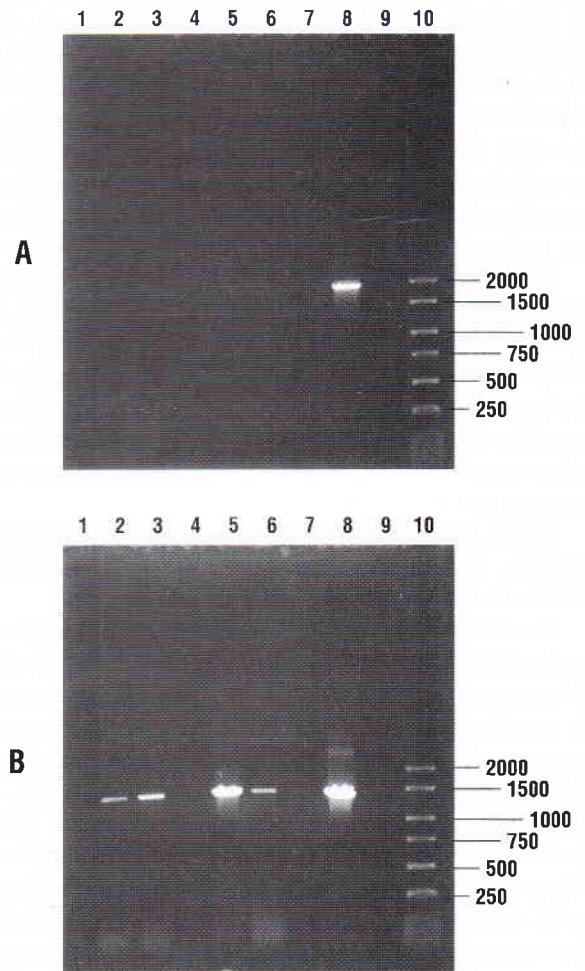
Z ogólnej liczby 65 478 neuronów, określonej na podstawie obserwacji preparatów barwionych hematoksyliną-eozyną, hybrydyzację stwierdzono w 14 komórkach, co stanowi 0,021%.

W kontroli pozytywnej stwierdzano hybrydyzację sondy do jąder większości komórek, nie obserwowano natomiast hybrydyzacji w kontroli negatywnej. U myszy kontrolnych w badaniu nPCR nie obserwowano produktów amplifikacji, jak również nie stwierdzono zmian histopatologicznych i hybrydyzacji sondy.

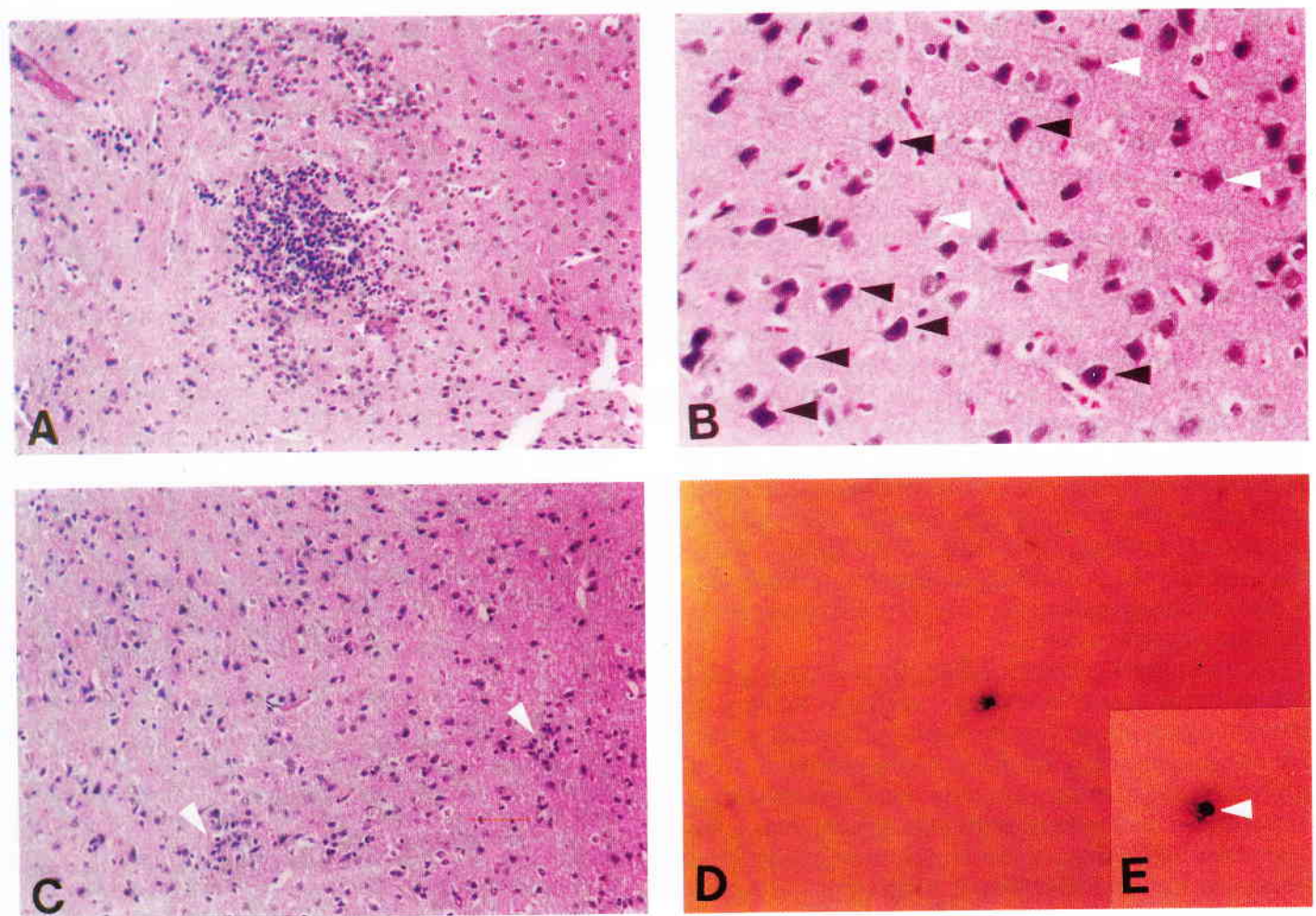
Wcześniejsze prace wskazują na tkankę nerwową jako miejsce, w którym EHV-1 ustala u myszy zaka-



**Ryc. 1. Wyniki identyfikacji izolatu Jan-E techniką PCR:** ścieżka 1 – DNA ekstrahowany z wątroby poronionego płodu; ścieżka 2 – DNA ekstrahowany z hodowli komórkowej ED zakażonej izolatem Jan-E, 4 pasaż; ścieżka 3 – kontrola negatywna, DNA nie zakażonej hodowli komórkowej ED; ścieżka 4 – kontrola specyficzności reakcji – DNA hodowli komórkowej ED zakażonej EHV-4; ścieżka 5 – kontrola pozytywna, DNA hodowli komórkowej ED zakażonej szczepem Rac-H; ścieżka 6 – wzorzec masowy DNA.



**Ryc. 2. Wyniki amplifikacji DNA izolowanego z mózgow 6 myszy, które przeżyły zakażenie – ścieżki 1-6; ścieżka 7 – kontrola negatywna, DNA izolowany z nie zakażonej hodowli komórkowej ED; ścieżka 8 – kontrola pozytywna, DNA izolowany z hodowli komórkowej zakażonej szczepem RacH EHV-1; ścieżka 9 – kontrola specyficzności reakcji, DNA izolowany z hodowli komórkowej zakażonej szczepem T252 EHV-4; ścieżka 10 – wzorzec masowy DNA; A – pierwsza runda, B – druga runda amplifikacji.**



**Ryc. 3. Zmiany histopatologiczne i wyniki hybrydyzacji *in situ* w mózgach myszy latentnie zakażonych izolatem Jan-E EHV-1.** (A) – naciek komórek jednojądrzastych (pow. 200×); (B) – degeneracja neuronów (pow. 400×), białe strzałki wskazują neurony o prawidłowej morfologii, czarne strzałki wskazują neurony o nienormalnym kształcie i barwności; (C) – proliferacja komórek glejowych (pow. 200×); (D i E) – pojedynczy neuron po DNA/RNA hybrydyzacji z biotynylowaną sondą (pow. 400 i 800×), strzałka wskazuje jądro komórkowe.

żenie latentne (5, 12). Latentny wirus wykrywano w zwojach trójdzielnych i opuszkach węchowych techniką nested PCR (5) oraz w opuszkach węchowych, techniką określaną jako „*in situ* PCR and protein synthesis” (*in situ* PS-PCR) (12). DNA wirusa stwierdzano również w mózgu, ale tylko w ostrej fazie zakażenia bądź po reaktywacji (5). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki są częściowo zgodne z publikowanymi wcześniej i potwierdzają, że tkanka nerwowa jest miejscem latencji EHV-1. Nowymi obserwacjami były natomiast: (1) występowanie wyraźnych zmian histopatologicznych w postaci degeneracji neuronów i nacieków komórek jednojądrzastych infiltrujących tkankę nerwową w latentnej fazie zakażenia; (2) obecność wirusowego DNA w mózgu myszy w 8 tygodni po zakażeniu, stwierdzana bez działania czynników reaktywujących wirus; (3) wykrywalny poziom ekspresji wirusowego RNA w latentnie zakażonych neuronach.

W opracowaniach innych autorów, u myszy zakażanych szczepem Ab4 nie wykazywano w mózgu obecności wirusa i związanego z latencją RNA, a zakaże-

nie latentne zdawało się być ograniczone do zwojów trójdzielnych i opuszek węchowych (5, 12). Ta niezgodność wyników jest trudna do wytłumaczenia, zwłaszcza, że wspomniany szczep Ab4 powodował dość wysoką, 36% śmiertelność użytych do eksperymentu zwierząt. Z drugiej jednak strony obecność latentnego wirusa w ośrodkowym układzie nerwowym myszy, nie ograniczająca się do opuszek węchowych, jest cechą spotykaną wśród  $\alpha$ -herpeswirusów i bardzo podobne zmiany obserwowano po dospojówkowym zakażeniu myszy wirusem opryszczki (*Herpes simplex virus type 1*; HSV-1) (16). Nie kwestionując wyników zakażenia myszy EHV-1 opisywanego przez innych autorów, zaznaczyć należy, że używany często do tego typu eksperymentów szczep Ab4, choć izolowany z nerwowego przypadku zakażenia EHV-1, był wielokrotnie pasażowany w hodowlach komórkowych i nie powoduje zmian histopatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym zakażonych myszy (4). Zatem brak latentnego wirusa i brak ekspresji LR-RNA w mózgu nie jest zaskakujący i można jedynie przypuszczać, co jest tego przyczyną. Nawiasem mówiąc, au-

torzy nie tylko nie próbują wyjaśniać tego fenomenu, ale nawet nie uwzględniają go w dyskusji. Wiadomo skądinąd, że wielokrotne pasażowanie EHV-1 *in vitro* nie pozostaje bez wpływu na jego właściwości, czego jaskrawym przykładem jest szczep Rac-H, określane czasem jako „pantropowy, niepatogeny” (13). Założyć zatem można, że stwierdzona niezgodność wyników może być efektem użycia do opisywanego eksperymentu „dzikiego” szczepu wirusa, po zaledwie 3 pasażach *in vitro*. Nie można również wykluczyć, że opisywana w niniejszej pracy obecność latentnego wirusa w mózgu wynika z różnic zjadliwości obserwowanych wśród różnych izolatów EHV-1 (13). Bardziej zjadliwe szczepy powodują wiremię i wirus stwierdzany jest w płucach i mózgu, podczas gdy zakażenie mniej zjadliwymi szczepami ogranicza się do opuszek węchowych. W tym świetle interesującym wydaje się pytanie, czy różne izolaty EHV-1 różnią się między sobą zdolnością do penetracji tkanki nerwowej i indukcji reakcji zapalnej w ośrodkowym układzie nerwowym myszy.

Zaprezentowane wyniki odbiegają w istotny sposób od publikowanych wcześniej – zarówno zmiany histopatologiczne, jak i wykrywalna przez hybrydyzację *in situ* ekspresja LR-RNA w ośrodkowym układzie nerwowym myszy nie były dotąd obserwowane. Nacieki komórek jednojądrzastych były zapewne efektem obecności wirusa w tkance nerwowej, jednak nie normalny kształt i barwność neuronów, nie stwierdzane u myszy kontrolnych, należy oceniać szczególnie ostrożnie. Zastosowana technika nie pozwalała bowiem na barwienie preparatów hematoksyliną-eozyną po hybrydyzacji i nie można rozstrzygnąć, czy sonda hybrydyzowała właśnie do tych zmienionych neuronów. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że efekt cytopatyczny w zakażonych komórkach wynika z uszkodzenia cytoszkieletu (20) i logicznym wydaje się założenie, że latentnie zakażone neurony mogą ulegać powolnej degeneracji wskutek ciągłej, choć ograniczonej, aktywności transkrypcyjnej wirusa. Badania mechanizmu uszkodzenia komórek przez EHV-1 dotyczyły jednak produktywności fazy zakażenia i teza ta wymagałaby potwierdzenia doświadczalnego. Zwłaszcza, że jeśli uszkodzenia neuronów miałyby wynikać z ich zakażenia wirusem, to niejasnym jest, dlaczego nie uległy one rozpadowi, względnie zniszczeniu przez komórki glikowe, w tak długim czasie po zakażeniu.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że szczep Jan-E EHV-1 zdolny jest do wywoływania zmian histopatologicznych w OUN zakażonych myszy i ekspresji, na wykrywalnym poziomie, związanego z latencją RNA, czym różni się od szczepu Ab4 używanego zwykle do tego typu doświadczeń. Wyjaśnienie tych różnic wymaga dalszych badań zmierzających do bliższego poznania biologicznych i molekularnych właściwości wirusa. Wydaje się, że szczególnie cenną w tej materii informację mogłoby wnieść określenie sekwencji genomu szczepu Jan-E i porów-

nanie jej z opublikowaną wcześniej sekwencją genomu szczepu Ab4.

## Piśmiennictwo

- Allen G. F., Yeargan M. R., Turtinen L. W., Bryans J. T., McCollum W. H.: Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 1983, 44, 263-271.
- Awan A. R., Chong Y-C., Field H. J.: The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 1131-1140.
- Awan A. R., Gibson J. S., Field H. J.: A murine model for studying EHV-1-induced abortion. *Res. in Vet. Sci.* 1991, 51, 94-99.
- Bartels T., Steintach F., Hahn G., Ludwig H., Borchers K.: In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology* 1998, 93, 329-334.
- Eaxi M. K., Borchers K., Bartels T., Schellentach A., Eaxi S., Field H. J.: Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res.* 1996, 40, 33-45.
- Eaxi M. K., Ejstathiou S., Lawrence G., Whalley J. M., Slater J. D., Field H. J.: The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 3113-3118.
- Borchers K., Slater J.: A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Meth.* 1993, 45, 331-336.
- Brahic M., Haase A. T.: Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, 75, 6125-6129.
- Eurrows R., Goodridge D.: Studies of persistent and latent equid herpesvirus 1 and herpesvirus 3 infections in the Pirbright pony herd. W: *Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine*, G. Wittman, R. M., Gaskell, H. J. Rziha (Wyd.), Martinus Nijhof, The Hague, 1984, s. 307-320.
- Chesters F. M., Allsop R., Purewal A., Edington N.: Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J. Virol.* 1997, 71, 3437-3443.
- Field H. J., Awan A. R., de la Fuente R.: Reinfection and reactivation of equine herpesvirus-1 in the mouse. *Arch. Virol.* 1992, 123, 409-419.
- Marshall K. K., Field H. J.: Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology* 1997, 229, 279-282.
- Fatel J. R., Edington N.: The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 1983, 8, 301-305.
- Satine M., Robertson G. R., Whalley J. M.: Differentiation of sub-types of equine herpesvirus by restriction endonuclease analysis. *Aust. Vet. J.* 1981, 57, 148-149.
- Slater J. D., Borchers K., Thackray A. M., Field H. J.: The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus-1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 2007-2016.
- Strauss W. M.: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. W: *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Wyd.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1992, T. 1, s. 2.2.1 - 2.2.2.
- Stoop W. G., Rock D. L., Fraser N. W.: Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory systems of the mouse central nervous system during acute and latent infections by in situ hybridization. *Lab. Invest.* 1994, 51, 27-38.
- Studdert M. J.: Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal isolates of equine herpesvirus type 1. *Arch. Virol.* 1983, 77, 249-258.
- Studdert M. J., Fitzpatrick D. R., Horner G. W., Westbury H. A., Gleeson L. J.: Molecular epidemiology and pathogenesis of some equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates. *Aust. Vet. J.* 1984, 61, 345-348.
- Walter I., Nowotny N.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection induces alterations in the cytoskeleton of Vero cells but not apoptosis. *Arch. Virol.* 1999, 144, 1827-1836.
- Welch H. M., Bridges C. G., Lyon A. M., Griffiths L., Edington N.: Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 1992, 73, 261-268.