

Występowanie przeciwciał dla wirusa nabytego braku odporności (BIV) u bydła w Polsce^{*)}

JACEK KUŹMAK, LEOKADIA BICKA

Zakład Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kuźmak J., Bicka L.

Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) in cattle from Poland

Summary

Serum samples from dairy cattle were analysed for the presence of Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) antibodies using a western blot method with a recombinant BIV p26 gag protein synthesized by *E. coli*. When the oldest animals from 53 different dairy herds were tested, out of 1165 cattle 91 (7.8%) from 14 herds were seropositive. Amongst 555 cattle from 22 herds with a high prevalence of Bovine leukemia Virus (BLV), 380 (68.5%) were BLV seropositive and 49 (8.8%) of cattle were seropositive for BIV, while 36 (6.5%) of the animals were seropositive for both BIV and BLV. In order to estimate the extent of BIV infection in dairy herds serum samples from all the animals from 9 herds where BIV seropositive cattle had been detected were tested. Out of 1085 serum samples serology revealed 35 (3.2%) incidents of infection and BIV seroprevalence increased with the increasing age of the animals. The first report confirms that BIV infection occurs in cattle from Poland in a similar prevalence to that reported from other countries.

Keywords: bovine immunodeficiency virus, cattle, seroprevalence.

W 1969 r. w trakcie badań nad etiologią enzoptycznej białaczki bydła badacze amerykańscy Van der Maaten i wsp. (24) wyizolowali wirus wywołujący u zakażonych zwierząt przewlekłą limfocytozę, a w hodowli komórkowej *in vitro* zmiany o charakterze syncytiów. Wirus ten określony jako izolat R29 różnił się antygenowo od wirusa BSV (Bovine Syncytial Virus) i BLV (Bovine Leukemia Virus), natomiast strukturalnie podobny był do wirusa choroby maedi-visna. Badanie sekwencji kwasu nukleinowego wirusa, przeprowadzone pod koniec lat 80-tych, wykazało duże podobieństwo do wirusa HIV i pozwoliło na zakwalifikowanie go do rodzaju *Lentiviridae* i nadanie nazwy Bovine Immunodeficiency Virus – BIV (wirus nabytego braku odporności bydła) (8). Wpływ zakażenia tym wirusem na zdrowie zwierząt nie został do tej pory jednoznacznie określony. Po doświadczalnym zakażeniu cieląt notowano zmiany ilościowe subpopulacji limfocytów CD4 i CD8, umiarkowaną limfocytozę oraz opóźnioną odpowiedź immunologiczną na obcy antygen, a w badaniach *in vitro* zwiększoną proliferację limfocytów po stymulacji PHA oraz zaburzenia funkcji monocytów/makrofagów i neutrofilii (3, 7). Do 6 tyg. po zakażeniu u wszystkich cieląt wykazano serokonwersję i możliwa była również izolacja wirusa. W węzłach chłonnych i śledzionie obserwowano rozrost grudek chłonnych, a w mózgu okołonaczyniowe nacieki komórek jednojądrzastych. Taki charakter zmian podobny jest do zmian histopatologicznych we wczesnej fazie zakażenia wirusem HIV u ludzi i FIV

u kotów. U bydła naturalnie zakażonego wirusem BIV obserwowano limfocytozę, powiększenie węzłów chłonnych oraz istotne obniżenie produkcji mleka (15, 22). Badania Snidera i wsp. (19) mogą wskazywać, że współinfekcja wirusem białaczki bydła (BLV) może wzmacniać patogenny potencjał wirusa BIV.

Badania serologiczne przeprowadzone w wielu krajach wykazały, że występowanie wirusa BIV ma zasięg światowy. W Stanach Zjednoczonych odsetek zwierząt zakażonych wahał się od 11% u bydła mlecznego (1) do 40% u ras mięsnych (9). U bydła w Japonii obecność przeciwciał zanotowano u 11,7% osobników, a w Kanadzie u 5,5% (14, 16). Badania przeprowadzone w ostatnich latach potwierdziły również występowanie zakażeń wirusem BIV w krajach europejskich, we Francji, Włoszech, Niemczech oraz w Holandii (4, 12, 17, 18). Przypadki zwierząt serologicznie dodatnich notowano ponadto w Nowej Zelandii (11), Wielkiej Brytanii (13), Wenezueli (21) i Kostaryce (10).

Celem pracy było potwierdzenie występowania przeciwciał dla wirusa BIV w surowicy krwi bydła mlecznego w Polsce. W tym celu wykorzystano metodę western blot i rekombinowane białko p26 wirusa BIV, jako antygen. W wybranych próbach surowicy krwi obecność przeciwciał dla BIV porównywano z występowaniem przeciwciał dla wirusa BLV.

Materiał i metody

Surowica krwi. Do badań użyto 2250 prób surowicy krwi wykorzystywanych do rutynowych badań serologicznych w kierunku białaczki bydła. Krew pobierano w latach 1997-99 od bydła rasy ncb, w różnym wieku, pochodzące

^{*)} Badania wykonane w ramach Grantu KBN, nr 5PO6K 00611.

go ze stad wielkotowarowych zlokalizowanych na terenie całego kraju. Badania serologiczne w kierunku BLV przeprowadzono w oparciu o metodę immunodyfuzji w żelu lub metodę ELISA, przy użyciu komercyjnych zestawów diagnostycznych (Serelisa, ChEKIT, Platelia S) stosowanych w Polsce, zgodnie z zaleceniami producentów.

Otrzymywanie rekombinowanego białka p26. Rekombinowane białko p26 wirusa BIV uzyskane, przez ekspresję genu *gag* w komórkach *E. coli* (klon *gag-3*) otrzymanych od Dr Wooda (Lincoln, USA), preparowano i oczyszczano wg metody podanej przez Atkinsona i wsp. (2). W komórkach *E. coli* klonu *gag-3* białko p26 syntetyzowane jest jako białko fuzyjne, z fuzją *trpE*, wykazujące ciężar cząsteczkowy 65 kD. W celu uzyskania ekspresji tego białka komórki *E. coli* hodowano przez noc w 400 ml podłoża M9 uzupełnionego 2 µg/ml tryptofanu i 100 µg/ml ampicyliny. 5 ml wyrośniętej nocnej hodowli przenoszono do 200 ml świeżego podłoża M9, bez tryptofanu uzupełnionego ampicyliną i hodowano przez 1 godz. w 37°C. Następnie dodawano 1 ml 25% roztworu kwasu β-indoloakrylowego i prowadzono hodowlę przez następne 2,5-3 godz. W celu oczyszczenia białka fuzyjnego taką hodowlę wirowano przy 10 000 g przez 15 min., płukano osad bakterii w 10 mM buforze Tris-HCl pH 7,5 i zawieszano go w 20 ml 50 mM buforu Tris-HCl pH 7,5 uzupełnionego 5 mM EDTA i 2 mg/ml lizozymu. Po dodaniu 1,5 ml 10% Nonidet-P40 i 1,4 ml 5 M NaCl całość łagodnie mieszano i inkubowano na lodzie 2 godz. W celu usunięcia komórkowego DNA roztwór sonifikowano i wirowano przy 10 000 g przez 15 min. Uzyskany osad białek płukano dwa razy w 10 mM buforze Tris-HCl pH 7,5 i 1 M NaCl i zawieszano w 0,5 ml 0,5% roztworu SDS. Zawartość białka określano spektrofotometrycznie.

Metoda western blot. Uzyskane białko rozdzielano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym przy użyciu SE 280 Small Slab Unit (Hoefer), najpierw na 3% żelu koncentrującym przy 15 mA, a następnie na 10% żelu migracyjnym przy 20 mA w buforze (20 mM Tris, 152 mM glicyny, 0,1% SDS) o pH 8,5. Rozdzielone białka były następnie przenoszone na nitrocelulozę (Hybond-C, Amersham) przy użyciu Mighty Small Transfer Unit (Hoefer) przy 60V przez 90 min. w buforze (20 mM Tris, 152 mM glicyny, 20% metanolu) o pH 8,3. W celu immunoenzymatycznego wykrywania przeciwciał nitrocelulozę cięto na paski i inkubowano kolejno z: **A.** buforem TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl) pH 7,2 zawierającym 20% surowicy końskiej, 2 razy po 20 min. **B.** surowicą bydlęcą rozcieńczoną buforem TBS 1:100, przez 1,5 godz. **C.** Biotynylowaną króliczą antyimmunoglobuliną IgG przeciw bydlęcym IgG (Sigma), w rozcieńczeniu 1:5000, przez 1 godz. **D.** koniugatem peroksydaza-streptawidyna (Amersham), w rozcieńczeniu 1:300, przez 1 godz. **E.** roztworem substratu – 60 µg 4-chloro-naftolu (Sigma), 60 µl H₂O₂, 20 ml metanolu, 100 ml buforu TBS przez 15 min. Każda inkubacja poprzedzona była trzema płukaniem po 10 min. w buforze TBS z 0,05% Tween 20. Dodatnią kontrolą reakcji były: surowica krwi cielęcia doświadczalnie zakażonego wirusem BIV (szcep R29), uzyskana od Dr Horzinka (Utrecht), surowica krwi bydła zakażonego naturalnie BIV, uzyskana od Dr Leviego (Alfort) oraz monoklonalne przeciwciała

przeciw białku p26 (klon 104), uzyskane od Dr Carpenter (Aimes). Surowice kontrolne rozcieńczano buforem TBS 1:200, a monoklonalne przeciwciała 1:1000.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań serologicznych w kierunku zakażeń wirusem BIV przedstawiono w tab. 1, 2 i 3. W celu optymalizacji możliwości zlokalizowania zwierząt zakażonych BIV początkowo do badań użyto surowicę krwi uzyskaną od wybranych losowo 15-40 najstarszych krów, w wieku 4-11 lat, pochodzących z 53 stad, o liczebności od 50 do 210 zwierząt. Łącznie od takich zwierząt uzyskano 1165 prób surowicy krwi. 610 prób uzyskano od zwierząt z 31 stad, w których nie stwierdzano dodatnich odczynów serologicznych w kierunku białaczki bydła. 555 prób uzyskano od krów

Tab. 1. Wyniki serologicznych badań monitoringowych w kierunku zakażeń wirusem BIV

Liczba stad		Liczba zwierząt	
badanych	dodatnich (%)	badanych	dodatnich (%)
31	5 (16,1)	610	42 (6,8)
22*	9 (40,9)	555	49 (8,8)
53	14 (26,4)	1165	91 (7,8)

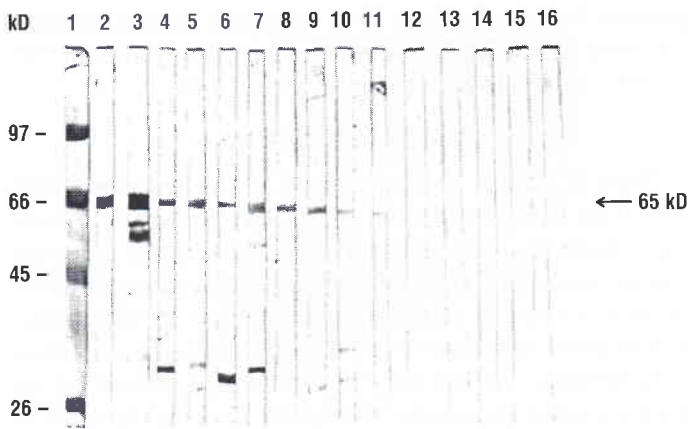
Objaśnienie: * stada, w których stwierdzono zwierzęta zakażone wirusem BIV.

Tab. 2. Wyniki badań serologicznych w kierunku zakażeń wirusami BIV i BLV

badanych ogółem	Liczba zwierząt (%)					
	BIV (+)	BIV (+) BLV (+)	BIV (+) BLV (-)	BIV (-) BLV (+)	BIV (-) BLV (-)	BLV (+)
555	49 (8,8)	36 (6,5)	13 (2,3)	344 (62)	162 (29,2)	380 (68,5)

Tab. 3. Wyniki badań serologicznych w kierunku zakażeń wirusem BIV z uwzględnieniem wieku zwierząt

Stado	Liczba zwierząt				
	badanych	dodatnich (%)	< 2 lat	2-4 lata	> 4 lat
A	114	3 (2,6)		1	2
B	90	6 (6,6)		1	5
C	105	3 (2,9)	1	1	1
D	106	9 (8,5)		3	6
E	148	3 (2,0)	1	2	
F	201	3 (1,5)		1	2
G	148	3 (2,0)		1	2
H	60	1 (1,7)			1
I	113	4 (3,5)	1	1	2
Razem	1085	35 (3,2)	3 (8,6)	11 (31,4)	21 (60,0)



Ryc. 1. Wykrywanie przeciwciał dla białka p26 wirusa BIV metodą western blot

Objaśnienia: 1 – marker ciężaru cząsteczkowego, 2 – przeciwciała monoklonalne/p26, 3 – surowica cielęcia zakażonego BIV R29, 4-11 – surowice terenowe dodatnie, 12-14 – surowice terenowe ujemne, 15-16 – surowice kontrolne ujemne.

pochodzących z 22 stad, w których stwierdzano różny odsetek zwierząt reagujących dodatnio w kierunku BLV, wahający się od 4% do 45% w stadzie. W tab. 1 przedstawiono występowanie przeciwciał dla BIV u zwierząt z tych dwóch kategorii stad. Analiza surowicy krwi zwierząt ze stad wolnych od BLV wykazała obecność przeciwciał u 42 (6,8%) krów, pochodzących z 8 stad. Analogiczne badanie surowicy krwi uzyskanej od 555 krów ze stad zakażonych BLV potwierdziło obecność przeciwciał u 49 (8,8%) zwierząt, w 9 stadach. Ogółem, biorąc pod uwagę powyższe wyniki, występowanie przeciwciał dla wirusa BIV potwierdzono w 17 (32%) stadach u 91 krów co stanowi 7,8% badanych zwierząt.

W badaniach o charakterze epizootycznym występowanie przeciwciał dla wirusa BIV analizowano często na tle występowania przeciwciał dla wirusa białaczki bydła. W prezentowanych badaniach taka analiza występowania przeciwciał możliwa była w grupie 555 zwierząt losowo wybranych z 22 stad, w których stwierdzono zakażenie wirusem BLV. W tab. 2 zestawiono wyniki oznaczania przeciwciał dla obydwu wirusów u tych zwierząt. Występowanie przeciwciał dla BLV zanotowano u 380 (68,5%) zwierząt. W tej grupie krów obecność przeciwciał dla BIV potwierdzono u 36 (6,5%) zwierząt, podczas gdy u pozostałych 175 zwierząt, wolnych od BLV, przeciwciała dla wirusa BIV stwierdzono u 13 (2,3%) krów.

Na ryc. 1 przedstawiono wyniki oznaczania przeciwciał dla białka p26 wirusa BIV metodą western blot. Obecność wyraźnego prążka odpowiadającego ciężarowi 65 kD, będącego rezultatem reakcji rekombinowanego białka p26 ze swoistymi przeciwciałami, obserwowano na blotach po inkubacji z monoklonalnymi przeciwciałami dla białka p26 oraz inkubacji z kontrolną surowicą krwi uzyskaną od cielęcia zakażonego doświadczalnie wirusem BIV, izolatem R29. Obecność prążka odpowiadającego identycznemu ciężarowi cząsteczkowemu zanotowano również na blotach

inkubowanych z surowicą bydła naturalnie zakażonego BIV, pochodzącego z Francji oraz blotach inkubowanych z wybranymi próbkami surowicy krwi uzyskanymi od bydła w Polsce. Warty podkreślenia jest fakt, że intensywność reakcji surowic terenowych różniła się między sobą i była słabsza od reakcji uzyskanej z surowicą cielęcia, doświadczalnie zakażonego BIV-R29.

W celu bardziej precyzyjnej analizy występowania przeciwciał dla wirusa BIV w stadach bydła mlecznego dalsze badania przeprowadzono w 9 stadach, w których badając uprzednio losowo wybrane najstarsze zwierzęta, potwierdzono obecność osobników z dodatnią reakcją serologiczną. Surowicę krwi uzyskano od 1085 zwierząt, pobierając krew od wszystkich zwierząt w stadzie. W tab. 3 przedstawiono analizę występowania przeciwciał dla wirusa BIV u tych zwierząt, uwzględniając podział na grupy wiekowe: zwierzęta młode poniżej 2 lat, w wieku 2-4 lat i najstarsze w wieku od 4 do 11 lat. Około 2/3 z całej populacji stanowiły zwierzęta z dwóch pierwszych grup. Obecność przeciwciał zanotowano w surowicy krwi 35 (3,2%) zwierząt, przy czym częstotliwość ich występowania była różna w poszczególnych stadach i wahała się od 1,5% do 8,5%. Analiza występowania dodatnich odczynów serologicznych w poszczególnych grupach wiekowych wykazała obecność pojedynczych odczynów w grupie zwierząt poniżej 2 lat. Zupełnie inną sytuację epizootyczną zaobserwowano w grupach zwierząt starszych. U najstarszych krów, w wieku powyżej 4 lat odsetek zwierząt z obecnością przeciwciał wynosił 60,0% i był prawie dwukrotnie wyższy niż u krów w wieku 2-4 lata, u których przeciwciała stwierdzono u 31,4% zwierząt.

Prezentowane badania są pierwszymi potwierdzającymi występowanie zakażeń wirusem nabytego braku odporności u bydła w Polsce. Występowanie swoistych przeciwciał zanotowano w 26% badanych stad, u 7,8% krów. Nie są to jednak wyniki potwierdzające faktyczny stan zakażenia wirusem BIV, ponieważ badania te ograniczono do części stad, w których stwierdzano zakażenia wirusem białaczki bydła oraz do wybranych, najstarszych zwierząt w stadzie. Bardziej miarodajne wydają się wyniki potwierdzające występowanie swoistych przeciwciał u 3,2% krów, kiedy badano wszystkie zwierzęta w 9 wybranych stadach. Są to wyniki zbliżone do rezultatów uzyskanych w innych krajach potwierdzających występowanie przeciwciał u 4% bydła we Francji (18), 5,5% w Kanadzie (14), 2,5% we Włoszech (4) oraz 6,6% w Niemczech (17).

W badaniach seroepidemiologicznych kluczowe znaczenie ma dobór testu diagnostycznego. Dla wykrywania przeciwciał dla BIV najczęściej stosowano metodę immunofluorescencji i western blot (22, 23). Testy te przy badaniu surowicy krwi zwierząt doświadczalnie i naturalnie zakażonych wykazywały porównywalną czułość, jakkolwiek wyniki badań Horzinka i wsp. (12) wskazują, że test immunofluorescencji może dawać wyniki fałszywie dodatnie. Trudne do wyjaśnienia wyniki badań serologicznych przy stoso-

waniu korpuskularnego wirusa BIV lub jego białek jako antygeny mogą wynikać także z występowania wariantów antygenowych wirusa BIV, co obserwowali Suarez i wsp. (20). Dlatego w omawianych badaniach wykorzystano rekombinowane białko p26 BIV, produkowane przez *E. coli*. Ma to szczególne znaczenie, biorąc pod uwagę fakt, że większość dostępnych klonów izolatu R29 jest zakażona wirusem BVDV. Białko to zostało tak skonstruowane, że zawiera epitopy antygenowe zlokalizowane w obrębie konserwatywnego fragmentu białka p26 (2). Jednak najnowsze dane dotyczące sekwencjonowania fragmentów DNA izolatów terenowych BIV wskazują na zmienność niektórych genów, w tym fragmentu kodującego białko p26. Fakt ten wyjaśniałby słabszą reakcję z surowicami terenowymi, obserwowaną w odniesieniu do surowicy cielęcia zakażonego BIV R29 i potwierdzał istnienie terenowych wariantów antygenowych wirusa BIV, różnych od R29.

Biorąc pod uwagę wybitnie przewlekły charakter zakażeń wywoływanych przez *Lentiviruses* niektórzy autorzy podkreślają wiek jako czynnik usposabiający do częstszych zakażeń wirusem BIV. Cyr Coats i wsp. (6) u krów w wieku powyżej 7 lat notowali trzy razy więcej odczynów dodatnich niż u zwierząt poniżej 3 lat. Zależność ta została wyraźnie podkreślona w prezentowanych badaniach, w których liczba wyników dodatnich w grupie zwierząt powyżej 4 lat była siedmiokrotnie wyższa niż u bydła młodego, w wieku poniżej 2 lat.

W opinii niektórych badaczy współinfekcja wirusem białaczki bydła (BLV) może być czynnikiem zwiększającym patogeny potencjał wirusa BIV. W omawianych badaniach przy stosunkowo wysokim odsetku zwierząt BLV (+), fakt współinfekcji wirusem BIV obserwowano jedynie u 6,5% zwierząt. Podobne były wyniki badań Jacobsa i wsp. oraz Measa i wsp. (14, 16). Autorzy ci u zwierząt zakażonych obydwoma wirusami notowali przewlekłą limfocytozę, powiększenie węzłów chłonnych, obniżenie wagi ciała, postępujące wyniszczenie. Snider i wsp. (19) pośród problemów zdrowotnych związanych z zakażeniem BLV/BIV wyróżniają na pierwszym miejscu *mastitis*, wtórne zakażenia bakteryjne mięśni i skóry oraz stany zapalne płuc, a w obrazie anatomo-patologicznym ograniczony rozrost lub zanik grudek chłonnych w węzłach chłonnych i śledzionie oraz okołonaczyniowe nacieki komórek jednojądrzastych i makrofagów w mózgu. Ten pierwszy charakter zmian mógłby być powodowany zwiększoną apoptozą komórek limfocytarnych, indukowaną przez wirus BIV. Według tych autorów stale utrzymujące się zakażenie wirusem BIV (*viral persistence*) stwarza na poziomie komórkowym dogodne środowisko do nowych zakażeń patogenami normalnie niechorobotwórczymi lub warunkowo chorobotwórczymi. Fakt, na ile jednak wirus BIV jest czynnikiem immunosupresyjnym pozostaje do wyjaśnienia. Ostatnio w badaniach mających określić wpływ wirusa BIV na układ immunologiczny i interakcję z innymi wirusami Zhang i wsp. (25) u doświadczalnie

zakażonych cieląt wykazali zmiany ilościowe subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 oraz obniżoną i opóźnioną odpowiedź serologiczną w stosunku do wirusa BHV-1 i BVDV.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że zakażenia wirusem BIV notowane są również w Polsce, a odsetek zwierząt serologicznie dodatnich porównywalny jest z wartościami notowanymi w innych krajach europejskich. W opinii wielu autorów nie określony definitywnie patogeny potencjał tego wirusa wynika z faktu, że do badań wykorzystywany jest jedyny znany izolat wirusa, R29, który w wyniku wielu pasażów w systemie komórkowym *in vitro* uległ atenuacji. Dlatego istnieje potrzeba izolacji i molekularnej charakterystyki nowych, terenowych izolatów wirusa. Dane z Wenezueli potwierdzające istnienie neurotropowego szczepu wirusa BIV, odpowiedzialnego za syndrom paraplegiczny u bydła (19) oraz duży stopień homologii pomiędzy BIV R29 i Jembrana Disease Virus (JDV) (5), który jest nowo poznany lentivirus o znacznej patogenności dla bydła, potwierdzają potrzebę takich badań.

Piśmiennictwo

1. Amborski G. C., Lo J. L., Seger C. L.: Vet. Microbiol. 20, 247, 1989.
2. Atkinson B., Liu S. Q., Wood C.: J. Virol. Methods 36, 35, 1992.
3. Carpenter S., Miller L. D., Alexandersen S., Whetstone C. A., Van der Maaten M. J., Vuuff B., Wammemuehler Y., Miller J. M., Roth J. A.: J. Virol. 66, 1074, 1992.
4. Cavirani S., Donofrio G., Chiocco D., Foni E., Martelli P., Allegri G., Cabassi C. S., De Iaco B., Flammini C. F.: Prev. Vet. Med. 37, 147, 1998.
5. Chadwick B. J., Coelen R. J., Sammels L. M., Kertayadnya G., Wilcox G. E.: J. Gen. Virol. 76, 2027, 1995.
6. Cyr Coats S., Pruett S. B., Nash J. W., Cooper C. R.: Vet. Microbiol. 42, 181, 1994.
7. Flaming K., Van der Maaten M. J., Whetstone C., Carpenter S., Frank D., Rath J.: Vet. Immunol. Immunopathol. 36, 91, 1993.
8. Gonda M. A., Braun M. J., Carter S. G., Kost T. A., Bess J. W., Arthur L. O., Van der Maaten M. J.: Nature 330, 388, 1987.
9. Gonda M. A.: AIDS 6, 759, 1992.
10. Hidalgo G., Flores M., Bonilla J. A.: J. Vet. Med. B. 42, 155, 1995.
11. Horner G. W.: New Zealand Surveillance 18, 9, 1991.
12. Horzinek M., Keldermans L., Stuurman T., Black J., Herrewegh A., Sillekens P., Koolen M.: J. Gen. Virol. 72, 2923, 1991.
13. Howie N. M., McKay I. G., Davies A. B., Brownlie J.: Vet. Rec. 134, 310, 1994.
14. Jacobs R. M., Pollari F. L., McNab W. B., Jefferson B.: Can. Vet. J. 59, 271, 1995.
15. McNab W. B., Jacobs R. M., Smith H. E.: Can. J. Vet. Res. 58, 36, 1994.
16. Meas S., Kabeya H., Yoshihara S., Ohashi K., Matsuki S., Mikami Y., Sugimoto C., Onuma M.: J. Vet. Med. Sci. 60, 1195, 1998.
17. Mulumeh A.: J. Vet. Med. B. 41, 679, 1994.
18. Polack B., Schwartz J., Berthelemy M., Belloc C., Manet G., Vuillaume A., Baron T., Gonda M. A., Levy D.: Vet. Microbiol. 48, 165, 1996.
19. Snider T. G., Luther D. G., Jenny B. F., Hoyt P. G., Battles J. K., Ennis W. H., Balady J., Blas-Machado U., Lemarchand T. X., Gonda M. A.: Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 19, 117, 1996.
20. Suarez D. L., Whetstone C. A.: Virology 67, 5051, 1993.
21. Walder R., Kalvatchev Z., Tobin G. J., Barrios M. N., Garzaro D. J., Gonda M. A.: Res. Virol. 146, 313, 1995.
22. Whetstone C. A., Van der Maaten M. J., Black J. W.: J. Virol. 64, 3557, 1990.
23. Whetstone C. A., Van der Maaten M. J., Miller J. M.: Arch. Virol. 116, 119, 1991.
24. Van der Maaten M. J., Boothe A. D., Seger C. L.: J. Natl. Cancer Inst. 49, 1649, 1992.
25. Zhang S., Wood C., Xue W., Krukenberg S., Chen Q., Mlnocha H.: Clin. Diag. Lab. Immunol. 4, 232, 1997.