

Otrzymywanie i wstępna charakterystyka przeciwciał monoklonalnych dla wirusa białaczki bydła

BOŻENNA KOZACZYŃSKA, JACEK KUŹMAK

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

Kozaczyńska B., Kuźmak J.

Production and evaluation of the specific nature of monoclonal antibodies against bovine leukaemia virus

Summary

The aim of this study was to prepare monoclonal antibodies (mabs) directed against major immuno-dominant epitope of BLV antigens. Myeloma cells Sp2/0 and spleen cells of BLV immunised BALB/c mice were used to prepare hybridoma cell clones by the usual hybridoma technology. Out of the 13 resultant clones, the supernatants of 11 showed a strong secretory activity in the ELISA assay, with intact BLV virus as the antigen. After the re-cloning procedure, 22 new clones were selected by the use of the limited cloning method. Supernatants from these clones were examined by ELISA for their secretory activity. Nineteen positive supernatants were collected and then examined for the specificity of mabs. Three methods were employed to achieve this: western blot with saccharose purified BLV antigens, immunoperoxidase mono-layer assay (IPMA) with FLK cells infected with BLV and immuno-peroxidase infectivity assay (IPIA) with CC81 indicatory cells, co-cultivated with FLK cells. The mabs from the examined supernatants reacted with gp51 protein and were classified as being IgG₁ isotype. Two clones, specific for gp51 by the western blot, produced distinct colour reactions on micro-plates coated with FLK or CC81/FLK cells. The resulted mabs will be useful for further developing diagnostic methods for BLV infection.

Keywords: bovine leukaemia virus, monoclonal antibody, envelope protein gp51.

Enzootyczna białaczka bydła (ebb) jest chorobą nowotworową, którą cechuje rozwój zmian limfoproliferacyjnych układu limfatycznego prowadzący do przewlekłej limfocytozy i zmian guzowatych w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych. Wywoływana jest przez wirus – Bovine Leukemia Virus – BLV – wykazujący typowe cechy dla retrowirusów (11). Walka z chorobą polega na izolowaniu i bezwzględny eliminowaniu z hodowli wszystkich nosicieli wirusa. Zarówno swoiste przeciwciała jak i mechanizmy odporności komórkowej nie eliminują wirusa i zwierzę raz zakażone, pozostaje jego nosicielem na całe życie. Dlatego tak dużą wagę przywiązuje się do wczesnej, czulej i swoistej diagnostyki zakażeń wirusem białaczki bydła. W Polsce podobnie jak w większości krajów opracowano programy walki z białaczką, które oparte są na wykorzystaniu metod serologicznych, głównie testu ELISA (6). Jednak pewną niedoskonałością tej techniki jest możliwość otrzymywania odczynów nieswoistych. Ograniczenie występowania tego typu reakcji możliwe jest poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (małs) (9, 12). Ze względu na latentny charakter zakażenia wirusem BLV, charakteryzujący się brakiem obecności przeciwciał w surowicy krwi, istnieje czasami konieczność wykrywania w komórkach krwi zakażonych zwierząt cząstek wirusa lub jego

białek antygenowych (4). Przydatne w tym zakresie okazały się test syncytialny (5) i metoda western blot (7). W opinii wielu badaczy swoisty charakter takich reakcji powinien być potwierdzony przy użyciu przeciwciał monoklonalnych dla antygenów wirusa BLV.

Celem prezentowanej pracy było otrzymanie monoklonalnych przeciwciał dla głównych antygenów wirusa BLV oraz wstępna ocena swoistości.

Material i metody

Zwierzęta. Do badań użyto 15 myszy szczepu wsobnego BALB/c, w wieku 8-10 tygodni otrzymanych z Instytutu Onkologii w Warszawie.

Hodowle komórkowe. Do namnażania wirusa BLV użyto hodowlę ciągłą nerki płodu owcy (FLK) zakażoną permanentnie wirusem BLV. Do hybrydyzacji stosowano linię ciągłą komórek szpiczaka Sp 2/0 otrzymaną z Instytutu Genetyki Molekularnej CSAV, Praga. Linia ta nie wytwarza własnych immunoglobulin i wykazuje defekt enzymatyczny dotyczący wytwarzania enzymów: hypoksantynoguaninofosforybozyl transferazy (HGPRT) oraz kinazy tymidylanowej (TK).

Podłoże. Podłoże wzrostowe do hodowli FLK/BLV, hybridom i komórek szpiczaka składało się z podłoża RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej, L-glutaminy (300 µg/ml), 1% kwasu pirogronowego,

0,2% 2-mercaptoetanolu i antybiotyków (penicylina 100 j.m/ml, streptomycyna 100 µg/ml, fungizon 50 µg/ml). Dla selektywnego wzrostu komórek hybrydowych po fuzji użyto podłoża RPMI 1640 z dodatkiem 1% hypoksantyny (Sigma) i 0,1% azaseryny (Sigma) (podłoże Aza-Hx).

Otrzymywanie antygenu do immunizacji myszy i do testu ELISA. Antygen uzyskiwano z supernatantu z hodowli FLK/BLV metodą ultrawirowania i oczyszczania na 20% sacharozie (ultrawirówka Beckman L7-65, 30000 rpm przez 2 godz.). Peletkę wirusa zawieszano w PBS i rozbiłano ultradźwiękami (2 razy po 10 sek.).

Immunizacja myszy. Do immunizacji użyto 5 myszek. Schemat immunizacji składał się z następujących cykli: I – 50 µg antygenu zemulgowanego z 0,1 ml kompletnego adiuwantu Freund'a podawano dootrzewnowo; II – po 21 dniach podano identyczną dawkę antygenu z niekompletnym adiuwantem Freund'a; III – trzy tygodnie po ostatniej iniekcji i cztery dni przed planowanym dniem fuzji myszy poddano ostatniej immunizacji podając dożylnie 100 µg antygenu.

Test immunoenzymatyczny ELISA. Testem tym oznaczano obecność przeciwciał dla wirusa ebb w surowicy krwi immunizowanych myszy oraz w supernatantach znad hodowli hybrydoma. Zastosowano metodę pośrednią testu ELISA opracowaną w ramach badań własnych. Test wykonywano na mikropłytkach opłaszczonych antygenami BLV identycznymi jakich użyto do immunizacji myszy. Do wykrywania związanych przeciwciał wykorzystano koniugat anty-mysie IgG znakowane peroksydazą chrzanową (Sigma), a jako substrat kwas 5-aminosalicylowy. Wynik reakcji enzymatycznej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 490 nm.

Hybrydyzacja. Do fuzji użyto komórki śledziony pobranej od myszy charakteryzującej się najwyższym mianem przeciwciał w teście ELISA i komórki linii Sp 2/0. Zawiesinę takich komórek mieszano w proporcji 1 komórka szpiczaka na 5 splenocytów w próbówce wirówkowej o pojemności 50 ml. Następnie wirowano 800 obr/min, przez 5 min. i po usunięciu supernatantu do osadu dodawano kroplami w ciągu 1 min. 1 ml 50% glikolu polietylenowego 1450 (PEG) (Sigma). Komórki pozostawiono przez 1 min. w kontakcie z PEG, po czym kolejno dodawano kroplami: 1 ml podłoża wzrostowego (przez 1 min), 7 ml podłoża wzrostowego (przez 3 min.) i na końcu 10 ml tego samego podłoża. Po dokładnym wymieszaniu zawiesinę komórek pozostawiano w termostacie (37°C, 5% CO₂) przez 1 godz. Następnie określano w hodowli liczbę żywych komórek i sporządzano zawiesinę o gęstości 2×10⁵ komórek w 1 ml podłoża wzrostowego. Przygotowaną zawiesinę rozlewano po 0,05 ml do dołków mikropłytek Nunc. Następnie do każdego dołka dodawano po 1 ml podłoża selektywnego. Płytki inkubowano w temp. 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂. Wzrost komórek hybrydoma obserwowano wizualnie i w mikroskopie określając stan i liczbę klonów. Z chwilą pokrycia przez klon prawie całej powierzchni dna dołka, pobierano supernatant znad hodowli.

Identyfikacja klonów sekrecyjnych. W celu wyselekcjonowania klonów sekrecyjnych produkujących do podłoża hodowlanego przeciwciała o żądanej swoistości badano supernatanty znad hodowli testem ELISA.

Klonowanie. W celu uzyskania rosnącego klonu-kolonii wywodzącej się z pojedynczej komórki otrzymane hybrydomy, których supernatanty były dodatkowo w teście ELISA poddano klonowaniu. Klonowanie wykonywano metodą granicznych rozcieńczeń komórek klonu. Wychodząc z populacji komórek hybrydowych o gęstości 10⁵ w 1 ml hodowli, sporządzano szereg 10-krotnych rozcieńczeń. Następnie do 1 ml rozcieńczenia zawierającego 10² komórek dodawano 49 ml podłoża wzrostowego. Po 0,2 ml uzyskanej zawiesiny komórek rozlewano do dołków mikropłytki i inkubowano w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂. Około 7 dnia inkubacji rozpoczynano obserwację mikroskopową wzrostu klonów. Hodowlę komórek w dołkach płytki, gdzie rozwijało się więcej niż jeden klon komórek eliminowano z dalszych badań. Klony rozwijające się z pojedynczej komórki, po rozmnożeniu badano w kierunku sekrecyjności metodą stosowaną przy analizie pierwotnej hodowli hybrydom po fuzji.

Charakterystyka otrzymanych mabs. Swoistość monoklonalnych przeciwciał produkowanych przez klony sekrecyjne określano za pomocą metody western blot oraz testów IPMA i IPIA.

Metoda western blot. W pierwszym etapie białka wirusa BLV otrzymane na drodze ultrawirowania i oczyszczania na warstwie sacharozie poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu na żelu poliakrylamidowym (PACE-SDS). Najpierw na 3% żelu koncentrującym przy 15 mA, 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 przenoszone na nitrocelulozę (Hybond-C, Amersham) przy użyciu Mighty Small Transfor Unit (Hofer) przy 60 V przez 1,5 godz. w buforze (20 mM Tris, 152 mM glicyny, 20% metanolu) o pH 8,5. Nitrocelulozę po wysuszeniu cięto na paski i inkubowano kolejno z: A – 10% roztworem surowicy końskiej w buforze TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl) o pH 7,5; 2 razy po 20 min.; B – supernatantami znad hodowli hybrydom oraz z surowicą bydlęcą zawierającą przeciwciała dla BLV przez 1,5 godz.; C – koniugatem (anty mysie IgG znakowane peroksydazą chrzanową) przez 1 godz.; D – roztworem substratu (4-chloro-1 naphtol) przez 10-15 min. Po około 1-2 godz. paski płukano w TBS z surowicą końską. Każdą inkubację poprzedzało trzykrotne płukanie po 5 min. buforem TBS z 0,05% Tween 20.

Test immunoperoxydazowy – immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). W płytkach Nunc zakładano hodowlę komórek FLK/BLV o koncentracji 35×10⁴ komórek/ml w podłożu RPMI. Po 36 godz. inkubacji w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂ zlewano płyn znad komórek i utrwalano je zimnym 40% acetonem w PBS-Tween 20 (PBS-T) przez 15 min. Po utrwaleniu komórki suszono i przechowywano w temp. -20°C do chwili użycia. W dniu wykonywania odczynu IPMA płytki ogrzewano 20 min. w temp. 37°C, płukano w roztworze PBS-T, następnie dodawano do dołków testowane supernatanty. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez 1,5 godz., po czym płukano je 3-krotnie. Następnie do baseników dodawano koniugat (anty mysie IgG znakowane peroksydazą chrzanową) i ponownie inkubowano przez 1,5 godz. w 37°C. Po wypłukaniu, dodawano roztwór substratu tj. 3-amino-9-etylokarbazolu (AEC) w buforze octanowym pH 5,0. Po 15-20 min. inku-

bacji zatrzymywano reakcję przez przepłukanie płytki buforem PBS-T. Rezultaty testu IMPA odczytywano przy użyciu mikroskopu odwróconego przy powiększeniu 100×.

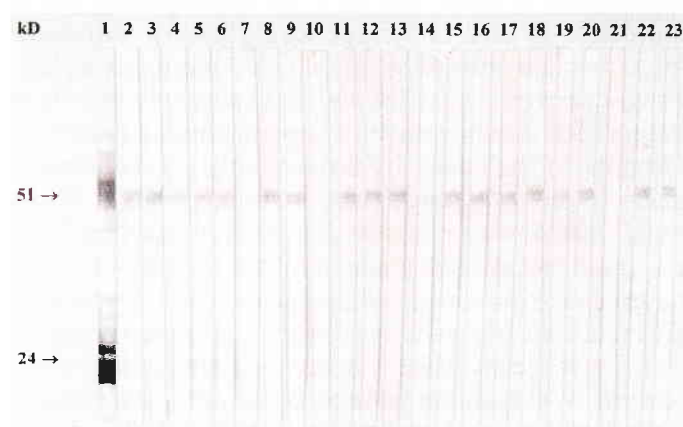
Test immunoperoksydazowy – immunoperoxidase infectivity assay (IPIA). W płytkach Nunc z 24 basenikami zakładano mieszaną hodowlę komórek FLK zakażonych wirusem BLV i komórek wskaźnikowych (linia CC81) o łącznej koncentracji 4×10^4 komórek/ml w podłożu RPMI. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂ zlewano płyn z nad komórek, po czym utrwalano je zimnym 40% acetonem w PBS-Tween przez 15 min. W przygotowanych w ten sposób płytkach wykonywano poszczególne etapy testu identyczne jak w metodzie IPMA wykorzystując te same odczynniki tj. koniugat, substrat i bufor.

Test immunoenzymatyczny – immunocapture ELISA. Test ten wykorzystano do określania przynależności uzyskanych przeciwciał monoklonalnych do poszczególnych izotypów immunoglobulin. Wykonano go przy użyciu handlowego zestawu Mouse Monoclonal Antibody Isotyping (Sigma) zgodnie z podaną instrukcją.

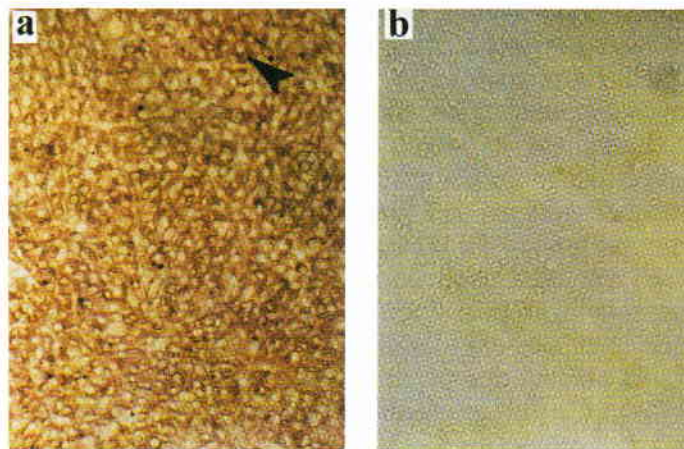
Wyniki i omówienie

W pierwszym etapie postępowania immunizowano myszy BALB/c wirusem BLV. Ocenę stopnia uodpornienia oparto na określaniu poziomu swoistych przeciwciał w teście ELISA. Przyjęty schemat uodpornienia pozwolił na indukcję wysokiego miana przeciwciał w surowicy krwi (miano 3200-6400). Dawką immunocytów śledzionowych do hybrydyzacji była mysz, której surowica krwi wykazała miano 6400. W wyniku przeprowadzenia fuzji splenocytów z komórkami szpiczaka uzyskano 249 skupisk komórek hybrydowych. Po 7-10 dniach, pobierano supernatanty z tych hodowli i badano je testem ELISA. W ten sposób wyselekcjonowano 13 (5,2%) klonów sekrecyjnych, z których 11 charakteryzowało się wysoką wartością OD (> 1,0), a 2 uznano za wątpliwe. W trakcie dalszej hodowli klony te utraciły zdolności sekrecyjne natomiast pozostałe 11 klonów zachowało zdolność wytwarzania przeciwciał. W dalszym etapie pracy klony sekrecyjne charakteryzujące się szybkim wzrostem oraz dobrą żywotnością poddano klonowaniu. Spośród 412 mikrohodowli wybrano 22 (5,3%), które wywodziły się z pojedynczej komórki. Zdolność sekrecyjna uzyskanych klonów kontrolowana testem ELISA wykazała, że 19 (4,6%) klonów reagowało dodatnio (OD 1,000-1,500), a 3 (0,7%) były ujemne. Przeciwciała w supernatantach ze wszystkich 22 klonów poddano ocenie swoistości. W pierwszym etapie ocenę taką przeprowadzano metodą western blot. Na ryc. 1 przedstawiono wyniki oznaczania przeciwciał w badanych supernatantach z białkami wirusa BLV. Jako kontroli użyto surowicy krwi bydła naturalnie zakażonego BLV (blot 1). Wykazano, że spośród 22 supernatantów, 19 reagowało z białkami wirusa tworząc ostry, pojedynczy prążek odpowiadający ciężarowi 51 kD. W trzech supernatantach (blot 7, 10, 21) nie stwierdzono obecności przeciwciał. Drugi etap oceny swoistości uwzględniał reakcję mabs z białkami wirusa BLV w zakażo-

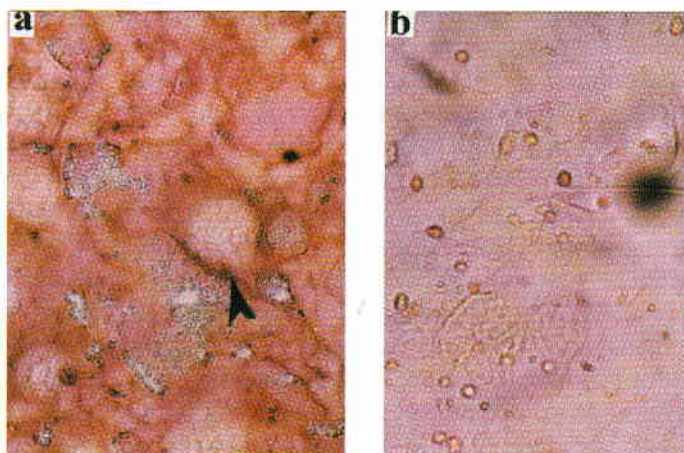
nych komórkach FLK. Jako kontroli użyto supernatantu z klonu, który był ujemny w teście ELISA. Ryc. 2 przedstawia wyniki testu IPMA uwzględniającego reakcję z supernatantem dodatnim 45E8-8E3 (2a) i ujemnym (2b). Brązowo-czerwone precypitaty w cytoplazmie komórek świadczące o obecności kompleksów antygen – przeciwciało monoklonalne widoczne były tylko w reakcji z dodatnim supernatantem. Trzeci etap oceny uwzględniał reakcję mabs z białkami wirusa BLV w hodowli komórek CC81 kokultuwo-



Ryc. 1. Wykrywanie obecności monoklonalnych przeciwciał w supernatantach z hodowli hybrydoma metodą western blot



Ryc. 2. Wyniki testu IPMA przy użyciu supernatantu z klonu sekrecyjnego 45E8-8E3 (a) i niesekrecyjnego (b)



Ryc. 3. Wyniki testu IPIA przy użyciu supernatantu z klonu sekrecyjnego 45E8-8E3 (a) i niesekrecyjnego (b)

wanych komórkami BLV. Kokultywacja taka indukuje powstawanie licznych komórek wielojądrzastych (syncytiów) w hodowli komórek CC81. Biorąc pod uwagę, że białko gp51 jest głównym antygenem odpowiedzialnym za zakaźny charakter wirusa *in vivo* i tworzenie efektu cytopatycznego (syncytiów) *in vitro*, dodatnia reakcja mabs z tym białkiem może potwierdzić ich swoisty charakter. Na ryc. 3 przedstawiono wyniki testu IPIA, w którym użyto komórek CC81/FLK i supernatantu z klonu dodatniego 45E8-8E3 (3a) i ujemnego w teście ELISA (3b). Analogicznie jak w metodzie IPMA obecność kompleksów antygen-przeciwciała monoklonalne, charakteryzująca się brązowo-czerwonym zabarwieniem obserwowana była w komórkach inkubowanych z supernatantem dodatnim. Ostatnią formą oceny było określenie przynależności mabs do poszczególnych klas immunoglobulin. Większość zastosowań mabs w diagnostyce zakażeń BLV związana jest ze stosowaniem metod immunoenzymatycznych lub immunocytochemicznych, w których przeciwciała takie używane są jako tzw. „pierwsze przeciwciała” wysoce swoiście wiążące się z antygenem wirusowym. Wykrywanie takiego kompleksu uzależnione jest od użycia drugiego przeciwciała tj. poliklonalnych anti-mysich immunoglobulin znakowanych znacznikiem, użytych jako koniugat. Dlatego ważne jest określenie przynależności otrzymanych przeciwciał monoklonalnych do poszczególnych izotypów immunoglobulin. Immunoglobuliny obecne we wszystkich badanych supernatantach należały do klasy IgG.

Badanie uzyskanych supernatantów na obecność i swoistość mabs dla wirusa BLV wykazało, że 19 wyselekcjonowanych klonów produkuje przeciwciała monoklonalne dla białka otoczki gp51. Jakkolwiek w tego typu badaniach nie oceniono charakteru epitopów, przeciwko którym skierowane są te przeciwciała, wyniki testu western blot, IPMA oraz IPIA potwierdzają, że są skierowane przeciw epitopom na białku gp51. W obrębie glikoproteidu gp51 wirusa BLV zlokalizowano 8 epitopów A – H (2), z czego trzy F, G i H są epitopami konformacyjnymi (3, 13), warunkującymi zakaźny charakter wirusa. Neutralizujące działanie przeciwciał w surowicy krwi zwierząt zakażonych BLV skierowane jest przeciw tym właśnie epitopom. W warunkach metody western blot, kiedy następuje denaturacja białek antygenowych na PAGE-SDS, epitopy F, G i H ulegają całkowitej lub częściowej destrukcji (10, 14). Fakt ten może wyjaśnić różną intensywność reakcji gp51 z poszczególnymi przeciwciałami monoklonalnymi. Zdolność wiązania się otrzymanych mabs z białkiem gp51 obserwowano także w dwóch testach IPMA i IPIA przy użyciu komórek zakażonych wirusem BLV. Mając na uwadze, że *in vitro* zarówno namnażanie wirusa jak i wywoływanie efektu cytopatycznego związane jest z ekspresją białka gp51, obecność barwnych kompleksów antygen-przeciwciała w cytoplazmie i na błonie tych komórek potwierdza swoisty charakter przeciwciał monoklonalnych. Oprócz

badan serologicznych potencjalne wykorzystanie takich przeciwciał w diagnostyce ebb związane może być z ich użyciem w niektórych testach wirusologicznych. Wyniki badań wskazują, że w szczególnych przypadkach bezpośrednie stwierdzenie obecności wirusa ma większą wartość diagnostyczną niż badanie serologiczne czy oznaczanie prowirusowego DNA metodą PCR. Ze względu na to, iż inne znane retrowirusy bydła – wirus braku odporności (BIV) i wirus syncytialny (BSV) są spotykane u znacznego odsetka zwierząt zakażonych BLV (1) i wywołują identyczny efekt cytopatyczny w postaci syncytiów w hodowli komórkowej *in vitro* (8, 15) konieczne jest potwierdzenie swoistego charakteru zmian indukowanych w komórkach wskaźnikowych. Przydatne w tym celu mogą okazać się przeciwciała monoklonalne.

Piśmiennictwo

1. Amborsky G. F., Lo J. L., Seger C. L.: Serological detection of multiple retroviral infections in cattle: bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine wisna virus. *Vet. Microbiol.* 1989, 20, 247-253.
2. Bruck C., Mathot S., Portetelle D., Berte Ch., Franssen J. D., Herion P., Burny A.: Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 1982, 122, 342-352.
3. Bruck C., Portetelle D., Burny A., Zavada J.: Topographical analysis by monoclonal antibodies of B1V-gp51 epitopes involved in viral functions. *Virology*, 1982, 122, 353-362.
4. Cockerell G. L., Rovnak J.: The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. *Leukemia Res.* 1988, 6, 465-469.
5. Grundboeck M., Buzala E.: Detection of bovine leukemia virus (BLV) by means of the syncytium assay. *Bull. vet. Inst. Puławy*, 1992, 35, 19-24.
6. Instrukcja Nr 1/93 Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej Departamentu Weterynarii z dnia 3 listopada 1993.
7. Kuźmak J., Bicka L., Grundboeck-Juško J., Buzala E., Kozaczyńska B.: Zastosowanie metody western blot do wykrywania antygenów wirusa białaczki bydła (BLV) w limfocytach zakażonych zwierząt. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 471-472.
8. Malmquist W. A., Van Der Maaten M. J., Boothe A. D.: Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* 1969, 29, 188-200.
9. Mammerickx M., Portetelle D., Bruck C., Burny A.: Use of an ELISA involving monoclonal antibody for the detection of antibodies against bovine leukemia virus in a herd with a high incidence of enzootic bovine leukosis. *Zbl. Vet. Med. B.*, 1984, 31, 210-218.
10. Mamoun R. Z., Morisson M., Rebeyrotten N., Busetta B., Couez D., Kettmann R., Hospital M., Gullemin B.: Sequence variability of bovine leukemia virus env gene its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.*, 1990, 64, 4180-4188.
11. Miller J., Miller L., Olson C., Gillette K.: Virus like particles in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte culture with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1969, 43, 1297-1305.
12. Portetelle D., Bruck C., Mammerickx M., Burny A.: Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *J. Virol. Methods*, 1983, 6, 19-29.
13. Portetelle D., Couez D., Bruck C., Kettmann R., Mammerickx M., Van Der Maaten M., Brasseur R., Burny A.: Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology*, 1989, 169, 27-33.
14. Walker P. J., Molloy J. B., Rodwell B. J.: A protein immunoblot test for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. *J. Virol. Methods*, 1987, 15, 201-211.
15. Van Der Maaten M. J., Boothe A. D., Seger C. L.: Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1972, 49, 1649-1657.