

Występowanie wirusa enzootycznej białaczki bydła w narządach wewnętrznych zakażonych zwierząt

MICHAŁ REICHERT

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

Reichert M.

Occurrence of enzootic bovine leukaemia virus in the visceral organs of naturally infected animals

Summary

The purpose of the experiment was to explain if bovine leukaemia provirus, which is undetectable in blood, can occur in different tissues and organs of naturally infected, serologically positive animals. The following tissue samples were the source for DNA analysis: lymph nodes, spleen, kidney, the right cardiac auricle, muscles, liver, abomasum wall, small intestine, bone marrow, medulla spinalis, brain, peritoneum, orbit and udder. A total of 105 DNA samples from different visceral organs were examined using PCR technique. The presence of provirus DNA was confirmed in tissue samples from two cows. Provirus was present in tissues obtained from the right cardiac auricle, brain and spleen. There was no BLV provirus in the organs of the remaining 10 cows. The obtained results indicate that the presence of BLV in some tissues cannot be excluded. The main reason for the difficulty in detecting BLV provirus in serologically positive animals is its imperceptible amount contained in peripheral blood lymphocytes which, in turn, is caused by down regulation of transcription of BLV nucleic acids.

Keywords: enzootic bovine leukaemia virus, PCR

Czynnikiem etiologicznym enzootycznej białaczki bydła jest wirus BLV (ang. bovine leukemia virus) należący do rodziny *Retroviridae* (cyt. 19, 22). W warunkach naturalnych choroba występuje jedynie u bydła, natomiast eksperymentalnie udaje się zakażać owce, kozy, prosięta, króliki, szczury, a także kurczęta (cyt. 5). Choroba rozprzestrzeniona jest obecnie na całym świecie, do czego przyczynił się intensywny handel zwierzętami. Zakażenie bydła wirusem BLV powoduje straty ekonomiczne wynikające z obniżonej produkcji mleka, zmniejszonej odporności na inne choroby, ograniczenia eksportu zwierząt i konieczności eliminowania wartościowych pod względem hodowlanym zwierząt (3, 8, 28).

Wirus replikuje się w układzie limfatycznym i wywołuje poliklonalną limfocytozę u około 30% zakażonych zwierząt (10, 20). Zmiany nowotworowe o charakterze guzowatym z jednoczesnymi objawami klinicznymi rozwijają się powoli i stwierdza się je u ok. 5-10% zakażonego bydła (5, 11). Do niedawna uważano, iż jedyną komórką docelową wirusa białaczki jest limfocyt B (6, 14). Zakażenie wirusem powoduje wybiórczo proliferację właśnie tych komórek i prowadzi do limfocytozy. Najnowsze badania zmodyfikowały jednak ten pogląd. Technika PCR stwierdziła, iż miejscem replikacji wirusa oprócz limfocytów

B są limfocyty T, monocyty i granulocyty (17). Istnieją również nieliczne doniesienia o obecności wirusa białaczki bydłowej w komórkach śródbłonkowych oraz komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego zakażonego bydła (4, 25). Wyniki tych badań mogą sugerować, że ekspresja receptora dla wirusa białaczki nie jest ograniczona do wąskiej subpopulacji komórek, lecz dotyczy znacznie szerszego ich spektrum niż pierwotnie przypuszczano. Niedawno przeprowadzone badania mające na celu zidentyfikowanie receptora specyficznego dla wirusa białaczki doprowadziły do sklonowania genu (BLV Rcpl) kodującego 849 aminokwasów (1, 2). Gen ten poza niewielką homologią z 250-nukleotydową sekwencją nieznanego genu w mózgu człowieka nie wykazywał homologii z sekwencjami znajdującymi się w dostępnych bazach danych.

Podstawą diagnostyki enzootycznej białaczki bydła są obecnie metody serologiczne, tj. test immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID) oraz test immunoenzymatyczny ELISA (13, 16, 21, 26, 27). Coraz częściej jest stosowana w diagnostyce białaczki reakcja polimerizacji łańcuchowej (PCR). Metodę tę stosuje się dotychczas na skalę laboratoryjną, gdyż w diagnostyce rutynowej okazuje się zbyt droga, a ponadto wymaga specjalistycznej aparatury. Jej zaletą jest wysoka czułość, umożliwiająca wykrycie prowirusa BLV w

1 pg DNA ekstrahowanego z limfocytów lub guzów białaczkowych (23). Pomimo tego wykazano, że u pewnego odsetka serologicznie dodatnich zwierząt, stwierdzenie metodą PCR obecności prowirusa we krwi nie jest możliwe (9, 24). Niejasny jest mechanizm tego zjawiska, a obecny stan wiedzy z zakresu biologii BLV nie pozwala na jednoznaczne wyjaśnienie tych rozbieżności. Celem doświadczenia było zbadanie możliwości występowania prowirusa białaczki w innych tkankach i narządach serologicznie dodatnich zwierząt przy braku jego obecności we krwi.

Materiał i metody

Materiałem do badań były tkanki serologicznie dodatnich krów, u których badanie DNA uzyskanego z komórek krwi metodą PCR wypadło ujemnie. Materiał stanowiły próbki: węzłów chłonnych, śledziony, nerki, prawego uszka serca, mięśni, wątroby, ściany trawieńca, jelita cienkiego, szpiku kostnego, rdzenia kręgowego, mózgu, otrzewnej chrzewnej, oczodołu i tkanki gruczołowej wymienia, które po pobraniu transportowano w suchym lodzie, a następnie do momentu preparatyki DNA przechowywano w temp. -70°C . Do badań wybrano te narządy, o których wiadomo z piśmiennictwa, iż są miejscem szczególnie częstego rozwoju guzów nowotworowych.

Otrzymywanie komórkowego DNA. Metodyka otrzymywania komórkowego DNA była nieco zróżnicowana na etapie wstępnym, co było uwarunkowane rodzajem tkanki jako źródła komórek. W przypadku krwi wirowano próbki o objętości około 20 ml aż do uzyskania tzw. kożuszka leukocytarnego. Leukocyty zbierano pipetą pasterowską i wirowano w gradiencie Histopaque 1077 (Sigma) przy $1000\times g$ przez 20 min. Frakcję limfocytów ponownie zbierano pipetą i zawieszano w buforze TEN (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) o pH 7,4. W przypadku gdy źródłem DNA były wycinki tkanek mrożonych, rozdrabniano je w temperaturze ciekłego azotu w mrożdzierzu, a następnie zawieszano rozdrobnioną tkankę w buforze TEN. Do zawiesiny komórek dodawano następnie pronazę w stężeniu końcowym 1 mg/ml oraz SDS o stężeniu 0,5%. Mieszaninę tę inkubowano w temp. 37°C przez okres od 3 do 16 godzin. Uzyskany lizat poddawano dwukrotnej ekstrakcji fenolem, a następnie mieszaniną fenol-chloroform. DNA zawarty we frakcji wodnej po odwirowaniu przez 5 minut przy $1600\times g$ precypitowano dwukrotną objętością etanolu w obecności jonów NaCl o stężeniu 0,4 M. Precypitat płukano w 70% etanolu, a następnie suszono w temp. pokojowej przez ok. 15 min i rozpuszczano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Oznaczanie stężenia DNA przeprowadzano w spektrofotometrze UV przy dł. fali 260 nm. DNA uzyskany w ten sposób stosowano następnie do oznaczania obecności BLV metodą PCR.

Amplifikacja. Przed przystąpieniem do amplifikacji optymalizowano warunki reakcji, określając doświadczalnie najkorzystniejsze stężenie jonów magnezowych, dezoksynukleotydów (dNTP) i starterów, a także temperaturę hybrydyzacji i ilość cykli. Orientacyjnym punktem wyjścia była temp. topnienia starterów wyliczona ze wzoru na podstawie ich sekwencji, a także warunki reakcji podane

przez producenta polimerazy DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 50 μl przedstawiał się następująco: Bufor dla polimerazy PrimeZyme, 1,5 mM Mg^{2+} , 0,5 μM każdego startera, 1 mM dNTP, 2 jednostki polimerazy PrimeZyme (Biometra Ltd). Do mieszaniny reakcyjnej dodawano ok. 0,5 μg DNA i całość przykrywano 2 kroplami oleju mineralnego (Sigma). Amplifikacja rozpoczynała się od denaturacji w temp. 94°C przez 3 min. po czym następowało 25 cykli temperaturowych, z których każdy składał się kolejno z denaturacji w 94°C przez 1 min., hybrydyzacji starterów w 65°C przez 1 min. i elongacji w 72°C przez 90 sek. Amplifikacja kończyła się 7-minutowym cyklem elongacji. Amplifikację prowadzono w opisanych warunkach w sterowanym mikroprocesorem urządzeniu UnoII (Biometra Ltd, Niemcy).

Oligonukleotydy. Stosowane w pracy oligonukleotydy syntetyzowano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie przy użyciu automatycznego urządzenia Gene Assembler – plus (Pharmacia Biotech). Sekwencję oligonukleotydów OL-1 i OL-2 podano wcześniej (24).

Ocena specyficzności reakcji PCR. Przy ocenie specyficzności reakcji PCR stosowano warunki amplifikacji podane wyżej. Ujemną kontrolę reakcji stanowiły próbki DNA, wyizolowane z limfocytów krów ujemnych serologicznie i pochodzących z gospodarstwa uznanego za wolne od EBB. Dodatnią kontrolę stanowiły próbki DNA, wyizolowanego z komórek linii ciągłej FLK zakażonych permanentnie BLV oraz plazmidowy DNA rekombinowany klonem belgijskim BLV. Ponadto amplifikacji poddano DNA uzyskane z komórek hodowli pierwotnej nerki bydłowej, zakażonych wirusem parainfluenzy bydła (PI-3), DNA izolowany z komórek linii MDBK zakażonych herpeswirusem bydłowym (BHV-1 szczep IPV 468) oraz wirusem nabytego braku odporności (BIV szczep R29). Linie MDBK/BIV otrzymano od dr Van der Maatena z USA, natomiast pozostałe linie pochodziły z Zakładu Wirusologii PIWet. w Puławach.

Oznaczanie swoistych przeciwciał dla wirusa BLV w surowicach zwierząt doświadczalnych. Stosowano test AGID zgodnie z Instrukcją Nr 54 Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej z dnia 20 lutego 1983 r., dotyczącą serologicznej diagnostyki enzootycznej białaczki bydła, używając antygeny wyprodukowanego w PIWet. Puławy i badano surowice nie rozcieńczone.

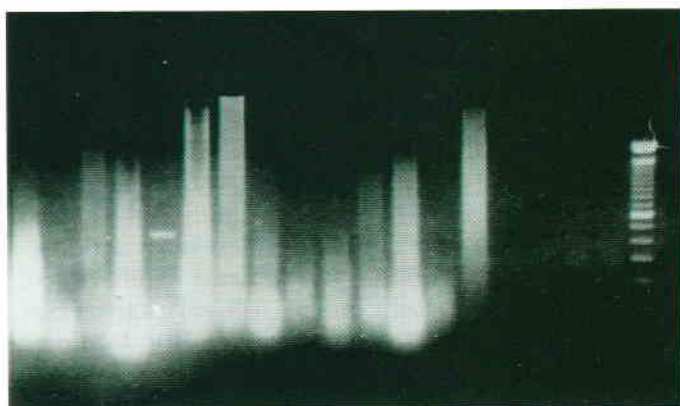
Wyniki i omówienie

Wyniki doświadczenia ujęte w tab. 1, a także częściowo na ryc. 1 uzyskano na podstawie badania DNA tkanek narządów wewnętrznych pobranych od 12 krów ubijanych w rzeźni. U wszystkich zwierząt stwierdzono przed ubojem obecność przeciwciał anty BLV w teście AGID, a jednocześnie metodą PCR brak prowirusa BLV w leukocytach uzyskanych z krwi. Ogółem przebadano techniką PCR 105 próbek DNA z różnych narządów. Obecność prowirusowego DNA stwierdzono w próbkach pochodzących od dwóch krów. Prowirus był obecny w materiale tkankowym uzyskanym z: prawego uszka serca, mózgu, oraz śledziony (tab. 1, ryc. 1). W badanych narządach od pozostałych 10 krów nie udało się stwierdzić prowirusa BLV.

Tab. 1. Badanie obecności prowirusowego DNA BLV w narządach krów serologicznie dodatnich w kierunku białaczki

Nr krowy	Węzły chłonne	Śledziona	Wątroba	Nerki	Serce	Mięśnie	Trawieniec	Wymię	Jelito	Otrzewna	Płuca	Szpic	Mózg	Oczodół	Rdzeń kręgowy
1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nb
2.	nb	-	-	nb	-	nb	-	-	-	-	-	-	-	-	nb
3.	-	nb	-	-	-	-	-	-	-	nb	-	-	-	-	-
4.	-	-	-	-	-	nb	-	nb	nb	-	-	-	-	-	nb
5.	-	-	-	-	-	-	nb	-	nb	-	-	-	-	-	nb
6.	-	-	-	-	+	-	nb	-	-	-	-	nb	+	nb	-
7.	nb	nb	-	-	-	-	-	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8.	nb	-	-	-	-	-	-	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
9.	-	nb	-	nb	-	-	-	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
10.	-	nb	-	nb	-	-	-	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
11.	-	+	nb	-	nb	nb	nb	nb	-	nb	nb	-	nb	nb	nb
12.	-	-	-	-	-	nb	-	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Objaśnienia: + lub - odpowiednio obecność lub brak obecności prowirusowego DNA, nb - nie badano.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Ryc. 1. Elektroforeza produktów amplifikacji DNA uzyskanego z różnych narządów bydła wykazującego obecność specyficznych przeciwciał w kierunku BLV i ujemnego w teście PCR. Ścieżki 1-14, odpowiednio nerki, jelito, szpic kostny, węzły chłonne krzyżowe, śledziona, tkanka gruczołowa wymienia, wątroba, rdzeń kręgowy, serce, płuca, mózg, węzły chłonne łędźwiowe, oczodół, otrzewna trzewna. Na ścieżce nr 5 widoczny produkt amplifikacji odpowiadający 440 par zasad (pz). Ścieżka 19 - wzorzec masowy.

W piśmiennictwie dotyczącym występowania prowirusa BLV we krwi i narządach wewnętrznych bydła panuje powszechnie uznawany i potwierdzony licznymi badaniami pogląd, że głównym miejscem replikacji wirusa białaczki są limfocyty B. Pomimo tego ukazało się kilka prac, informujących o występowaniu prowirusa BLV również w innych subpopulacjach leukocytów, a także komórkach śródbłonkowych oraz komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego zakażonego bydła (4, 25). Prace te, jakkolwiek nieliczne są interesujące, jeśli się weźmie pod uwagę stwierdzane przypadki dodatnich seroreagentów, u których dostępnymi i czuymi metodami (PCR, sondy molekularne) nie udało się wykazać obecności prowirusa EBB. Wyni-

ki badań własnych częściowo potwierdzają przypuszczenie, że wyjaśnienia wspomnianych przypadków można szukać między innymi w badaniu innych niż komórki krwi obwodowej miejsc egzystowania wirusa w organizmie zakażonych zwierząt. Stwierdzenie obecności prowirusowego DNA w innych niż limfocyty krwi obwodowej tkankach organizmu nie oznacza jednakże, iż tkanki te są miejscem replikacji wirusa. Aby mieć taką pewność należałoby przeprowadzić dalsze badania, celem

potwierdzenia istnienia w tych tkankach wirusowego RNA lub produktów jego translacji co wykraczało poza ramy niniejszej pracy. Można również założyć, że prowirus obecny w tych tkankach nadal pozostaje związany z DNA limfocytów nie wykazując jakiegos szczególnego tropizmu do innych komórek.

Na gromadzenie się limfocytów w pewnych narządach może mieć wpływ zmiana właściwości fizykochemicznych błony zakażonych komórek zwłaszcza domen węglowodanowych w związku z ekspresją wirusa (12). Jeśli to rozumowanie jest słuszne, to pojawia się niewiadoma w odniesieniu do mechanizmu eliminacji zakażonych komórek z krwi obwodowej przez układ immunologiczny z jednoczesnym pozostawianiem nienaruszonych komórek w oddalonych od łożyska naczyń miejscach organizmu. Sprawą bardzo istotną w tego rodzaju badaniach jest wykluczenie możliwości zanieczyszczenia badanych próbek prowirusowym DNA, pochodzącym z innych narządów lub z krwi. W przedstawionych badaniach taka ewentualność nie wchodziła w rachubę, gdyż badanie metodą PCR, DNA pochodzącego z leukocytów oraz innych narządów tych samych zwierząt, dało wynik ujemny. Uzyskane wyniki sugerują tropizm BLV do pewnych narządów niekoniecznie zbudowanych z komórek tkanki limfoidalnej. Wśród dwunastu ubijanych zwierząt, poza śledzioną prowirusowy DNA znaleziono w tkance prawego uszka serca, o którym wiadomo z piśmiennictwa, że jest miejscem predylekcyjnym rozwoju guzów nowotworowych (15), a ponadto w tkance mózgowej (tab. 1, ryc. 1). Analizując przypadek stwierdzenia prowirusa w tkance mózgowej trzeba pamiętać, że tkanka ta jest w rzeczywistości konglomeratem różnych komórek i trudno precyzyjnie określić lokalizację prowirusa na poziomie komórkowym. Warto jednak w tym miejscu zauważyć, że neurony charakteryzują się brakiem ekspresji głównego

antygeny zgodności tkankowej, a co za tym idzie w przypadku ich zakażenia wirus ma szansę przetrwania w takich komórkach, bez możliwości wykrycia przez układ immunologiczny gospodarza. Biorąc pod uwagę latentny przebieg infekcji analizowanych przypadków obecność prowirusa w tkance mózgu wydaje się być nieprzypadkowa.

Zjawisko znikania wirusa z krwi i utrzymywania się go w innych tkankach organizmu gospodarza jest znane w przypadku latentnych zakażeń wywoływanych przez inne retrowirusy np. HIV czy CAEV (wirus zapalenia stawów i mózgu u kóz). Paradoksalnie, znaczna zmienność genetyczna spotykana u lentiwirusów ułatwia immunodominację wariantów posiadających epitopy różniące się od epitopów neutralizujących, co przy względnie niskim mianie przeciwciał neutralizujących ułatwia „przeżycie” wirusa. Istnieją również prace wskazujące na istotną rolę przeciwciał innych niż neutralizujące, ale hamujących wiązanie przeciwciał neutralizujących z wirusem, a także wzmagających infekcyjność niektórych lentiwirusów poprzez wiązanie się z receptorem Fc na błonie limfocytów i makrofagów (7, 18).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą być istotne z epizootycznego punktu widzenia, jeśli się uwzględni problem infekcji latentnych i ich wpływ na akcję uwalniania stada do EBB. Nie wiadomo jednak jak długo prowirus pozostaje w tych tkankach w stanie latencji i czy dochodzi do jego uaktywnienia. Niemożność wykrycia prowirusa we krwi metodą tak czułą jak PCR sugeruje, że stwierdzana immunostymulacja i produkcja przeciwciał jest spowodowana jego obecnością w innych tkankach organizmu zwierzęcia. To z kolei zwrócić może prowadzić do eliminacji wirusa z krwi i w ten sposób utrzymuje się pewien stan równowagi pomiędzy wirusem a organizmem gospodarza. Gospodarz pozostaje w stanie zakażenia, ale wirus jest niewykrywalny. Są to jednak w dalszym ciągu spekulacje, które można by wyjaśnić poprzez jednoczesne monitorowanie miana przeciwciał oraz ilości wirusa we krwi metodą np. ilościowego PCR w dłuższym przedziale czasowym.

Reasumując przeprowadzone badania wydaje się, że nie można wykluczyć obecności prowirusa EBB w niektórych skupiskach tkanki, zwłaszcza limfoidalnej, a główną przyczyną niemożności stwierdzenia prowirusa u dodatnich seroreagentów jest jego śladowa ilość w limfocytach krwi obwodowej, spowodowana zablokowaniem transkrypcji kwasów nukleinowych BLV.

Piśmiennictwo

- Ban J., Portetelle D., Altaner C., Horion B., Milan D., Krchnak V., Burny A., Kettmann R.: Isolation and characterization of a 2,3-Kbp cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus receptor. *J. Virol.* 1993, 67, 1050-1057.
- Ban J., Truong A., Horion B., Altaner C., Burny A., Portetelle D., Kettmann R.: Isolation of the missing 5' -end of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene. *Arch. Virol.*, 1994, 138, 379-383.
- Brenner J., Van Haam M., Savir D., Trainin Z.: The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1989, 22, 299-305.
- Buehring G., Kramme P., Schultz R.: Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab. Invest.* 1994, 71, 359-365.
- Burny A., Bruck C., Chantrenne H., Cleuter Y., Dekegel D., Ghysdael J., Kettmann R., Leclercq M., Leunen J., Mammerickx M., Portetelle D.: Bovine leukemia virus, molecular biology and epidemiology. In *Viral Oncology*, Klein (ed.). Raven Press, New York. 1980, 231-289.
- Burny A., Cleuter Y., Kettman R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., Van Den Broeke A., Willems L., Thomas R.: Bovine leukemia, facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1988, 32, 149-170.
- Cheevers W. P., Mc Guire T. C., Norton L. K., Cordery-Cotter R., Knowles D. P.: Failure of neutralizing antibody to regulate CAE lentivirus expression in Vivo. *Virology* 1993, 196, 835-839.
- Da Y., Shanks R. D., Stewart J., Levin H. A.: Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90, 6538-6541.
- Eaves F., Molloy J., Dimmock C., Eaves L.: A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 1994, 3, 313-321.
- Ferrer J. F., Marshak R., Abt A., Kenyon S. L.: Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle, a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979, 175, 705.
- Ferrer J.: Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1980, 24, 1-68.
- Fossum C., Burny A., Portetelle D., Mammerickx M., Morein B.: Detection of B and T-cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1988, 18, 269-278.
- Gielkens A. L. J., Ressang A. A., Ijzerman J., Quak J.: Test protocol of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against bovine leukemia virus. *Vet. Quart.* 1981, 3, 34-37.
- Grimaldi M., Poli G., Sartoelli P., Caldora C., Oldani L., Locatelli A.: Karyotype analysis of lymphocytes from cattle at different stages of bovine leukemia virus infection. *Br. Vet. J.* 1983, 139, 240-246.
- Grundboeck M.: Rozpoznawanie i zwalczanie Enzootycznej Białaczki Bydła. 1980, PWRiL, Warszawa.
- Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: *Medycyna Wet.* 1982, 41, 19.
- Heeney J., Valli P., Jacobs R., Valli V.: Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab. Invest.* 1992, 66, 608-617.
- Homsy J., Meyer M., Tateno M., Clarkson S., Levy J. A.: The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* 1989, 244, 1357-1360.
- Johnson R., Kaneene J. B.: Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet. Bull.* 1992, 62, 287-312.
- Kenyon S., Piper C.: Cellular basis of persistent lymphocytosis in cattle infected with bovine leukemia virus. *Infect. Immunol.* 1977, 16, 891-897.
- Łosieczka K., Klimontowski S.: Uwalnianie obór wielkostadnych od enzootycznej białaczki bydła (EBB). *Medycyna Wet.* 1988, 44, 270-273.
- Miller J. M., Miller L. D., Olson C., Gillette K. G.: Virus-like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969, 43, 1297-1305.
- Naif H., Brandon R., Daniel R., Lavin M.: Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 117-129.
- Reichert M., Stec J.: Simultaneous use of two starter pairs increases the efficiency of PCR assay in the diagnosis of BLV infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, 11, 543-547.
- Rovnak J., Casey J., Boyd A., Gonda M., Cockerell G.: Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis. *Lab. Invest.* 1991, 65, 192-202.
- Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E.: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Path.* 1978, 1, 507-520.
- Wawrzkiwicz J., Dziedzic B., Koziol T.: Sensitivity and specificity of a modified agar gel precipitation test and its application to the diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Acta virologica.* 1989, 33, 143-150.
- Mu M., Shanks R., Levin A.: Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 993-996.