

Obecność wirusa BLV w pełnej krwi i mleku zakażonych krów

JAN RUŁKA, PIOTR KUBIŚ, WITOLD DEREŃ*, EWA BUZAŁA

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
*Wojewódzki Inspektorat Weterynarii ul. Wrocławska 170, 45-836 Opole

Rułka J., Kubiś P., Dereń W., Buzala E.

The presence of BLV in blood and milk of infected cattle

Summary

The aim of the study was to use the nested PCR method for diagnosing bovine leukosis. The study entailed investigating the serological control of 20 samples of blood and milk from leukotic cattle with ELISA and nested PCR. The ELISA was positive in 19 serum samples and in 18 milk samples. The titre of serum antibodies against BLV ranged from 80 to 2560. The control of DNA of BLV gave 100% positive results in nested PCR for blood samples and 80% for those of milk. The use of the nested PCR and complete blood samples allows a higher percentage of BLV infected animals to be discovered than by using ELISA. Applying this method to diagnose bovine leukosis ensures the elimination of latent infections and the eradication of this disease in farms.

Keywords: cattle, BLV, diagnosis, PCR

Enzootyczna białaczka bydła jest nadal szeroko rozpowszechnioną w Polsce jednostką chorobową bydła dorosłego. Głównym źródłem szerzenia się choroby jest zakażone zwierzę. Rozrost komórek układu limfoproliferacyjnego jest następstwem zarówno predyspozycji genetycznych bydła mlecznego, jak i bezpośredniego zakażenia wirusem BLV – Bovine Leukemia Virus type C. Szczególnie istotnym elementem nowych infekcji jest krew, siara i mleko zawierające limfocyty zakażone wirusem (2, 9, 21, 24). Potencjalnym ogniwem zakażenia może być również nasienie (20). W procesie zakażenia istotnym elementem jest droga wprowadzenia wirusa. Wysoką skuteczność infekcji stwierdzono po zakażeniu zwierząt drogą dożylną, domięśniową, śródskórną, dootrzewnową, doustną, a nawet drogą rektalną (10, 26). W komórkach zakażonego organizmu wirusowy DNA zintegrowany zostaje z genomem komórki gospodarza jako tzw. provirus (3, 8, 13, 14, 22, 25, 27, 32, 37). Wykrywanie zakażeń bydła wirusem białaczki opiera się, jak dotychczas, głównie na metodach diagnostyki serologicznej – ID i ELISA (4, 16, 29, 30, 33-36) oraz diagnostyki wirusologicznej – test rewertazowy (31), syncytialny (28). Wprawdzie metoda ELISA jest bardzo czułym testem serologicznym, to jednak nie wykrywa ona wszystkich zakażeń bydła wirusem BLV. W stadach uznanych za wolne od tych zakażeń, nadal pojawiają się niekiedy zwierzęta wykazujące obecność niskich

mian przeciwciał odpornościowych anti-BLV w surowicy krwi. Stan ten wiązać się może ze stanem fizjologicznym zwierzęcia lub działaniem wielu czynników immunosupresyjnych (3, 12, 19). Sytuacja ta ma zasadniczy wpływ na ostateczny efekt zwalczania i uwalniania gospodarstw zapowietrzonych wirusem BLV.

W ostatnich latach wiele badań w zakresie diagnostyki enzootycznej białaczki bydła przeprowadzono przy wykorzystaniu metody łańcuchowej reakcji polimerizacji PCR (1, 5-7, 15, 17, 18, 23, 27, 37). Opracowana metoda PCR spełnia wszystkie wymagania stawiane przed czułą, specyficzną i szybką metodą diagnostyczną. Ponadto daje ona możliwość specyficznej amplifikacji rzadkich i pojedynczych kopii wybranych sekwencji DNA wirusa, zawartych pomiędzy wybranymi oligonukleotydami pełniącymi rolę startów reakcji. Obecnie znanych jest wiele wariantów metody PCR, jednakże w diagnostyce białaczki bydła znalazły zastosowanie dwa ich warianty: technika pojedynczego PCR i tzw. nested PCR. W wariacie pierwszym produkt amplifikacji jest wynikiem amplifikacji oczyszczonego DNA i użyciu jednej pary primerów (sterterów), w drugim – część produktu pierwszej amplifikacji jest ponownie amplifikowana w obecności dodatkowych primerów.

Celem badań własnych było porównanie wyników kontroli serologicznej testem ID i ELISA z wynikami

reakcji PCR próbek krwi i mleka krów pochodzących z gospodarstwa zapowietrzonego wirusem białaczki (BLV).

Materiał i metody

Zwierzęta. Do badań użyto po 20 próbek krwi i mleka pobranych w sposób ogólnie znany. Próbkę krwi pobierano z żyły jarzmowej w ilości 10 ml do probówek z 0,5 ml antykoagulantu wersenu II, zaś próbki mleka (ok. 20 ml) pobierano do probówek zawierających 1 ml roztworu azydru sodu 1:10 000. Próbkę mleka do czasu wykonania badania przechowywano w temperaturze -20°C .

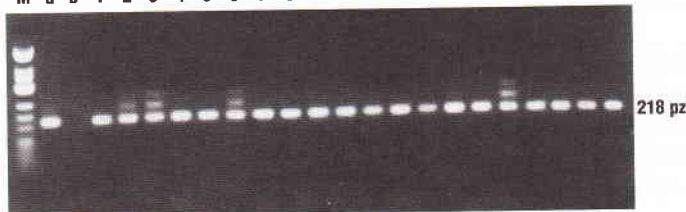
Badanie hematologiczne (Schilling). Procent poszczególnych elementów morfotycznych krwi określano w preparatach barwionych metodą Pappenheima. Liczbę limfocytów bezwzględnych obliczano w sposób ogólnie znany mnożąc procent limfocytów w obrazie Schillinga przez ogólną liczbę leukocytów.

Izolacja DNA z próbek pełnej krwi: Do badania pobierano 500 μl świeżej, pełnej krwi obwodowej, po czym postępowano wg protokołu izolacji DNA zestawu Blood DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Gdynia, Nr kat. 022).

Izolacja DNA z próbek mleka. Po rozmrożeniu próbek z temperatury -20°C , wirowano je wstępnie 3000 rpm/min., po czym pobierano 3 ml odwirowanej mieszaniny komórek i ponownie wirowano 12 000 rpm. (SIGMA, rotor 12148). Uzyskany osad komórek zawieszano w 100 μl roztworu RE, dodawano 200 μl uniwersalnego buforu lizującego LT i 20 μl proteinazy K. Całość mieszaniny inkubowano 20 min. w temperaturze 37°C , po czym postępowano wg II protokołu izolacji DNA zestawu Blood DNA Prep Plus.

PCR dla wirusa BLV: Reakcję PCR prowadzono w mieszaninie o końcowej objętości 25 μl składającej się z 10 mM Tris-HCl pH 8,8 przy 25°C , 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1% Triton X-100, 200 μM mieszaniny każdego a dNTP, 0,5 U DyNAzyme II DNA polimerazy (Finnzymes Oy), 0,2 μM primerów ZM2 ($5'$ -ctc tga tgg cta agg gca gac acg gc-3') i ZM3 ($5'$ -ctt ccc etc cct ggg etc ccg aa-3') i 3 μl

M a b 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Ryc. 1. Wynik kontroli obecności DNA wirusa BLV metodą nested PCR w próbkach pełnej krwi bydła białaczkowego: M – marker ϕ X174/Hinfl (MBJ Fermentas), a – kontrola pozytywna, b – kontrola negatywna, 1-20 próbki krwi badanych zwierząt

M a b 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Ryc. 2. Wyniki kontroli obecności DNA wirusa BLV metodą nested PCR w próbkach mleka: M – marker ϕ X174/Hinfl, a – kontrola pozytywna, 1-20 próbki mleka badanych zwierząt

DNA. Profil temperaturowy amplifikacji był następujący: 5 min. 95°C , 35 cykli 30 s. 94°C , 1 min. 70°C , 7 min. 72°C .

Nested PCR dla wirusa BLV: 1 μl produktu amplifikacji pierwszej reakcji PCR dodawano do roztworu zawierającego 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8 przy 25°C , 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1% Triton X-100, 200 μM każdego z dNTP, 0,5 U DyNAzyme II wym. polimerazy DNA, 0,2 μM każdego startera ZM4 ($5'$ -ctc gcc etc ccg gac gcc ca-3') i ZM5 ($5'$ -gct agg cct aag gtc agg gcc gc-3'). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 μl . Profil temperaturowy amplifikacji był następujący: 2 min. 95°C , 20 cykli 30 s. 94°C , 45 s. 70°C , 7 min. 72°C .

Odczyn immunodyszufji (ID). Test wykonywano zgodnie z obowiązującą instrukcją stosując znane, referencyjne surowice anti-BLV (11). Jako antygeny użyto handlowego antygeny dla testu ID, seria A1009 przygotowanego z supernatantu znad komórek FLK/BLV.

Test ELISA. Metodę testu ELISA (BIOVETA, Ivanovice na Hane, ČR) przeprowadzono ściśle wg załączonej instrukcji.

Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty przedstawiono w tab. 1 oraz na ryc. 1 i 2. Wstępny proces leukemicznej formy białaczki wykazano badaniem hematologicznym u krowy nr 3, w przypadku której stwierdzono 11 330 limfocytów krwi. Większość z nich miała charakter dużych komórek młodocianych z wyraźnym rąbkiem zasadochłonnej cytoplazmy. Potwierdzeniem stanu zakażenia zwierzęcia wirusem białaczki był dodatni wynik testu serologicznego i wysokie miano przeciwciał odpornościowych anti-BLV (ELISA – 1:5120). U pozostałych zwierząt liczba limfocytów wahała się od 2800 do 8000 w 1 μl krwi.

Kontrola serologiczna odczynem immunodyszufji próbek mleka wykazała 18 (90%) wyników dodatnich, zaś badaniem testem ELISA stwierdzono ogółem 19/20 (95%) dodatnich wyników dla próbek surowicy i 18/19 (94,7%) dla próbek mleka. Wartości liczbowe dla poszczególnych mian surowicy wynosiły od 1:80 do 1:2560. W zasadzie wszystkie uzyskane wyniki kontroli przeciwciał anti-BLV testem ELISA dla surowic, korespondowały z wynikami dla analogicznych prób mleka. Notowana różnica dotyczyła jedynie próbki nr 1, która przy dodatnim wyniku dla surowicy, wykazała ujemny wynik dla próby mleka.

Kontrola obecności wirusa BLV przy użyciu metody nested PCR wykazała 100% dodatnich wyników w przypadku próbek pełnej krwi (ryc. 1) i 16/20 (80%) dodatnich wyników dla próbek mleka (ryc. 2). Próbki nr 1, 7, 12 i 13 izolatów DNA komórek mleka dały wynik ujemny. Wielkość prążków amplifikowanego DNA wirusa białaczki wynosiła 218 pz. Mała liczba badanych zwierząt nie upoważnia wprowadzić do wyciągania ostatecznych wniosków, jednakże już na obecnym etapie badań wykazano pełną przydatność testu nested PCR do diagnostyki zakażeń bydła wirusem enzootycznej białaczki. Analogiczna kontrola próbek mleka testem nested PCR wykazała również jego przy-

Tab. 1. Wyniki kontroli obecności wirusa białaczki bydła (BLV) w próbkach krwi i mleka zakażonego bydła

Nr krowy	Liczba leukocytów	Schilling						Kontrola serologiczna				Nested PCR		
		%						liczba limfoc.	krew			mleko	krew	mleko
		B	Eo	N	Ly	Mon	ID		ELISA	(miano)	ELISA			
1	10 600	0	13	38	47	2	4980	-	+	(1280)	-	+	-	
2	11 500	0	4	48	48	0	4600	+	+	(1280)	+	+	+	
3	17 700	0	4	32	64	0	11 330	+	+	(5120)	+	+	+	
4	10 500	0	9	39	51	1	4860	+	+	(80)	+	+	+	
5	10 400	0	16	31	52	0	5400	-	-		-	+	+	
6	9800	0	5	48	45	2	4400	+	+	(160)	+	+	+	
7	9400	0	6	42	50	2	4700	+	+	(160)	+	+	-	
8	10 600	0	5	62	32	1	3390	+	+	(320)	+	+	+	
9	9000	0	3	49	46	2	4100	+	+	(160)	+	+	+	
10	5900	0	4	45	51	0	3000	+	+	(160)	+	+	+	
11	11 100	0	3	28	67	2	7400	+	+	(640)	+	+	+	
12	10 000	0	2	57	41	0	4100	+	+	(320)	+	+	-	
13	12 600	0	3	50	46	1	5790	+	+	(160)	+	+	-	
14	6800	0	5	53	42	0	2800	+	+	(320)	+	+	+	
15	9400	0	11	55	34	0	3200	+	+	(80)	+	+	+	
16	13 900	0	7	40	51	2	7080	+	+	(2560)	n.b.	+	+	
17	7600	0	12	42	45	1	6260	+	+	(1280)	+	+	+	
18	8800	1	3	41	55	0	4800	+	+	(640)	+	+	+	
19	12 500	0	1	34	64	0	8000	+	+	(320)	+	+	+	
20	10 200	0	7	47	46	0	4700	+	+	(160)	+	+	+	
% wyników dodatnich								90	95		94,7	100	80	

datność do kontroli powyższych zakażeń. Rozbieżności pomiędzy dodatnimi wynikami testu nested PCR dla próbek krwi i próbek mleka można upatrywać we wczesnym stadium zakażenia zwierząt wirusem BLV, zbyt małej jego ilości w poszczególnych komórkach gruczołu mlekowego – limfocytach i mastocytach, jak również w deponowaniu się wirusa w komórkach układu śródbłonkowo-retikularnego innych narządów limfatycznych. Sugestie takie mają swoje uzasadnienie w badaniach Klintevalla i wsp. (15). Jak wykazali autorzy obecność wirusa białaczki obserwowano w różnym stopniu w poszczególnych narządach zakażonych zwierząt. U jednych wykazano wirus w szpiku kostnym, śledzionie, grasicy, węzłach chłonnych, wątrobie, nerce, podczas gdy u innych wynik PCR był negatywny. Ciekawym jest, że w 5 przypadkach na 6 zwierząt badanych nie stwierdzono wirusa BLV zarówno w szpiku, jak i grasicy. Badania te nie obejmowały jednak komórek gruczołu mlekowego. Przydat-

ność próbek mleka do kontroli zakażeń bydła wirusem BLV metodą nested PCR i określenia wpływu okresu laktacji czy stanu zasuszenia zwierząt na ostateczny wynik reakcji wymaga dodatkowych badań. Jak się wydaje fizjologiczny stan okołoporodowy może mieć również istotny wpływ na ostateczny wynik łańcuchowej reakcji nested PCR. Kuźmak (18) porównując występowanie prowirusa w limfocytach krwi i wydzielinie przedślarowej wykazał, że DNA wirusa BLV występuje w wydzielinie przedślarowej jedynie u 6 z 17 krów (35,3%), które posiadały go w limfocytach krwi. U dwóch zwierząt obecność prowirusa w limfocytach wydzieliny przedślarowej nie została potwierdzona badaniem DNA z limfocytów krwi, mimo dodatniego wyniku odczynu serologicznego surowicy tych zwierząt. Wśród 17 krów z dodatnim wynikiem prowirusowego DNA w limfocytach krwi stwierdzono jedynie 12 (70,9%) dodatnich wyników testu ELISA. Gdy jednak badano wydzielinę przedślarową,

wszystkie zwierzęta, w limfocytach których obecny był prowirusowy DNA, posiadały również swoiste przeciwciała anty-BLV.

Interesujące wyniki uzyskali autorzy kanadyjscy (23). Badacze ci stosując reamplifikację materiału genetycznego genu gag wirusa białaczki uzyskali o 31% więcej wyników dodatnich reakcji nested PCR niż w reakcji zwykłego PCR z jedną parą primerów. Wykazali oni również ujemne wyniki reakcji nested PCR przy dodatnim wyniku odczynu ID.

Reasumując należy stwierdzić, że kontrola zakażeń bydła wirusem enzootycznej białaczki bydła przy użyciu metody nested PCR i pełnej krwi badanych zwierząt, pozwala na wykrywanie większego procentu zwierząt zakażonych niż kontrola serologiczna przy użyciu metody ELISA. Wykrywanie materiału genetycznego wirusa BLV stwarza znacznie lepsze warunki kontroli bydła zakażonego i efektywnego zwalczania choroby. Zastosowanie metod biologii molekularnej (PCR) do diagnostyki enzootycznej białaczki pozwoli na eliminację ukrytych nosicieli wirusa z gospodarstw zapowietrzonych, ograniczenie dużych wydatków finansowych na zakup bardzo drogich zagranicznych zestawów ELISA i zmniejszenie strat ekonomicznych wynikających z tytułu obniżenia wydajności produkcyjnej bydła białaczkowego. Naczelnym zadaniem stosowania metody nested PCR jest efektywne wykorzystanie jej do diagnostyki zakażeń bydła wirusem BLV i całkowita likwidacja enzootycznej białaczki bydła w Polsce.

Piśmiennictwo

1. *Belak S., Pollagy-Pordany A.*: Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnosis virology. *Vet. Res. Comm.* 1993, 17, 55-72.
2. *Buehring G., Kramme P., Schultz R.*: Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Labor. Investig.* 1994, 71, 359-365.
3. *Cornil I., Levy D.*: In vivo incubation of bovine leukemia virus (BLV) expression. *Leukemia* 1989, 3, 159-161.
4. *Cowley J., Molloy J., Dimmoch C., Walker P., Bruyeres A., Ward W.*: Infectivity of bovine leukemia virus infected cattle: an ELISA for detecting antigens expressed in situ cultured lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 1992, 30, 137-150.
5. *Fechner H., Kurg A., Blankenstein P., Mewes G., Geue L., Albrecht C., Ebner D.*: Direct use of cell lysate in PCR - based diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1996, 109, 446-450.
6. *Fechner H., Kurg A., Geue L., Blankenstein P., Mewes G., Ebner D., Bejer D.*: Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med. B.* 1996, 43, 621-630.
7. *Fechner H., Blankenstein P., Looman A., Elwert J., Geue L., Albrecht C. et al.*: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 1997, 237, 261-269.
8. *Furuta Y., Shinohara K., Sano K., Meguro M., Nagashima J.*: In situ hybridization with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of virus genomes. *J. clin. Pathol.* 1990, 43, 806-809.
9. *Gatei M., McLennan M., Levin M., Daniel R.*: Experimental infection of sheep with bovine leukemia virus infectivity of blood, nasal and saliva secretions. *J. Vet. Med. B.* 1989, 36, 652-660.
10. *Grundboeck M., Buzala E., Szczotka M., Rulka J.*: Experimental infection of sheep with bovine leukemia virus (BLV). *Pol. Arch. wet.* 1991, 31, 5-13.
11. *Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.*: Instrukcja serologicznego rozpoznawania enzootycznej białaczki bydła przy użyciu testu immunodyfuzji w żelu (ID), Nr 54, *Min. Rol. i Gospod. Żywn. Dep. Wet.* z dnia 20 lutego 1983 r.
12. *Gupta P., Kashimiri S., Ferrer J.*: Transcriptional control of the bovine leukemia virus (BLV) genome: role and characterization of a non-immunoglobulin plasma protein from BLV-infected cattle. *J. Virol.* 1984, 50, 267-270.
13. *Jacobs R., Song Z., Poon H., Henney J., Taylor A., Jefferson B., Verman W., Valli V.*: Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphosarcoma. *Com. J. Vet. Res.* 1992, 56, 339-348.
14. *Kettmann R., Deschamps J., Cleuter Y., Couez D., Bruny A., Marbaix C.*: Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. natnl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 2465-2469.
15. *Klintewall K., Ballagy-Pordany A., Naslund K., Belak S.*: Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 1994, 42, 191-204.
16. *Knapen K., Kerkhofs P., Thiry E., Mammerickx M.*: Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting antibodies against bovine leukaemia virus in serum pools. *Epidemiol. Infect.* 1994, 113, 563-569.
17. *Kubiś P., Rulka J., Kur J., Dąbrowski S.*: PCR in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Bul. Ver. Inst. Puławy*, 1996, 40, 85-89.
18. *Kuzmak J.*: Wartość diagnostyczna oznaczania prowirusowego DNA wirusa enzootycznej białaczki bydła metodą PCR. *Praca hab., PIWet. Puławy.* 1995.
19. *Lassauzet M., Thurmand M., Johnson W., Stevens F., Picauso J.*: Factors associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *Am. J. Epidem.* 1991, 133, 164-176.
20. *Lucas M., Dawson M., Chasey D., Wibberley G., Roberts D.*: Enzootic bovine leucosis virus in semen. *Vet. Rec.* 1980, 106, 128, 1980.
21. *Mammerickx M., Antoine O., Burny A., Desmecht M., Kerkhofs P. I. wsp.*: Study of the relationship between infection with BLV (bovine leukemia virus) persistent lymphocytosis and infection with other infective agents in a cattle herd. *Annls Med. Vet.* 1989, 133, 515-524.
22. *Marbaix G., Kettmann R., Cleuter Y., Burny A.*: Viral RNA content of bovine leukemia virus infected cells. *Mol. Biol. Rep.* 1981, 7, 135-138.
23. *Marsolais G., Dubuc R., Bergeron J., Morsey J., Kelly E., Jackson M.*: Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 297-301.
24. *Meiron R., Breuner J., Gluckman A., Avraham P., Trainin Z.*: Humoral and cellular response in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). *Vet. Immunol.* 1985, 9, 105-107.
25. *Molteni E., Agresti A., Meneveri R., Marozzi A., Malcovati M., Bonizzi L., Poli G., Ginelli E.*: Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukemia virus (BLV). *J. Vet. Med. B.* 1996, 43, 201-211.
26. *Müller M., Wittmann W., Liebermann H., Mowes L., Albrecht B., Meissner L., Weege H.*: Einfluß der Verfütterung von BLV-infetivierten Kolostrum und BLV freiem Ammenkolostrum auf die Leukoseinfektionsrate bei Kälben. *Mh. Vet. Med.* 1985, 40, 709-712.
27. *Naif H., Brandon R., Daniel R., Lavin M.*: Bovine leukemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 117-129.
28. *Otachel-Hawranek J.*: Przydatność odczynu syncytialnego do wczesnej diagnostyki zakażeń wirusem białaczki bydła (BLV) u cieląt. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 315-317.
29. *Platzer C., Siakkou H., Kraus G., Gröbel C., Rosenthal S.*: Use of monoclonal antibody against major internal protein p24 of bovine leukemia virus in capture ELISA. *Arch. exp. Vet. Med.* 1990, 44, 917-923.
30. *Portetelle D., Mammerickx M., Burny A.*: Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus envelope proteing gp51. *J. Vet. Methods* 1989, 23, 211-222.
31. *Reichert M., Grundboeck-Juško J.*: Badania aktywności odwrotnej transkrypcji w hodowli komórkowej linii FLK zakażonej wirusem EBB. *Medycyna Wet.* 1988, 44, 14-16.
32. *Reichert M., Grundboeck-Juško J.*: Molecular cloning of provirus DNA from bovine leukemia lymphocytes and its application as a probe for diagnosis purpose. *Acta bioch. pol.* 1991, 38, 111-114.
33. *Rulka J., Buzala E.*: Diagnostyka enzootycznej białaczki bydła przy użyciu testu seroneutralizacji. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 708-711.
34. *Rulka J., Lis M., Buzala E.*: Ocena polskiego zestawu ELISA w serologicznej diagnostyce bydła zakażonego wirusem białaczki (BLV). *Medycyna Wet.* 2000, 56, 660-664.
35. *Siakkou H., Kube D., Peters H., Otto A., Ulrich R., Rosenthal S.*: New ELISA test for detection of bovine leukemia virus infection in cattle using bacterially synthesized p24. *Arch. exp. Vet. Med.* 1990, 44, 952-930.
36. *Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.*: Oznaczanie przeciwciał dla wirusa enzootycznej białaczki bydła metodą ELISA. *Medycyna Wet.* 1985, 41, 117-119.
37. *Xie B., Oyamada T., Yoshikawa H., Oyamada T., Yoshikawa T.*: Detection of proviral DNA of bovine leukemia virus in cattle by a combination of in-situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J. comp. Path.* 1997, 116, 87-96.