

Zastosowanie testu immunoperoksydazowego pośredniego do potwierdzania tożsamości izolatów EAV

MAGDALENA LARSKA, JERZY ROLA

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

Larska M., Rola J.

Application of the indirect immunoperoxidase test to confirm the specificity EAV isolates

Summary

The purpose of the study was the elaboration and introduction of an effective method to confirm the identity of EAV isolates obtained in cell culture from the serum of persistently infected stallions. In view of the low cost, simplicity of preparation, and its high specificity, an indirect immunoperoxidase test based on rabbit polyclonal sera was introduced. After immunization of the rabbits with the EAV reference strain Bucyrus, purified by ultracentrifugation, a specific polyclonal serum in the titer of SN antibodies from 1:32 to 1:128 was obtained. Peroxidase-conjugated goat IgG antibodies against horse immunoglobulins were used as a secondary antibody and DAB as a substrate. After the optimization of the test conditions, its sensitivity and specificity was defined. The sensitivity estimated in reference to the Bucyrus strain was equal to 1 TCID₅₀. The specificity was defined at 100%. After the preliminary validation, the indirect immunoperoxidase test based on the obtained polyclonal sera was affirmed as a method to identify EAV isolates. All 68 EAV field isolates reacted positively in the immunoperoxidase test.

Keywords: equine arteritis virus, indirect immunoperoxidase test

Wirusowe zapalenie tętnic koni jest jedną z najważniejszych chorób zakaźnych koniowatych. Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus EAV (equine arteritis virus) należący do rodziny *Arteriviridae*. Choroba powoduje poważne straty ekonomiczne w hodowli koni na całym świecie. Zakażenie EAV w 40-50% przypadków może prowadzić do poronień, resorpcji zarodków i jałowienia u klaczy (5-7). Najważniejszą konsekwencją zakażeń EAV u koni jest występowanie zakażeń trwałych i siewstwo wirusa z nasieniem ogierów. Po przechorowaniu około 30-60% ogierów zostaje trwale zakażonych EAV (14, 15). Ogierzy te są rezerwuarem wirusa w populacji koni. EAV utrzymuje się w dodatkowych gruczołach płciowych ogiera, a proces siewstwa zależy prawdopodobnie od poziomu testosteronu (9). Ogierzy mogą wydalać wirusa z nasieniem nieprzerwanie przez kilka tygodni do kilku miesięcy, a nawet do końca życia (15). Nie istnieją skuteczne metody leczenia trwale zakażonych ogierów, a wysoki poziom przeciwciał u zwierząt nie chroni ich przed reinfekcją i siewstwem wirusa. Krycie pełnowrażliwych klaczy ogierem siewcą wirusa powoduje u nich serokonwersję w 85-100% przypadków. Ze względu na małą skuteczność szczepień przeciw EAV i ograniczenia w ich stosowaniu, najlepszym i najtańszym rozwiązaniem problemu strat powodowanych zakażeniami EAV w populacji koni jest badanie i eliminacja z hodowli ogierów trwale zakażonych EAV (11).

Podjęte badania miały na celu udoskonalenie metod diagnostycznych służących do identyfikacji ogierów siewców EAV z nasieniem. Do wykluczenia siewstwa wirusa z nasieniem stosowana jest metoda izolacji EAV w hodowli komórkowej (test zalecany przez OIE), jednak efekt cytopatyczny, który wywołuje wirus nie jest specyficzny (13). Dlatego też wynik testu izolacji powinien być potwierdzony przy pomocy dodatkowej metody. Do potwierdzania tożsamości izolatów EAV zastosowano test immunoperoksydazowy pośredni (IPT). Ze względu na niski koszt, łatwość w przygotowaniu i wysoką specyficzność, do testu użyto surowicy poliklonalnej króliczej.

Materiał i metody

Materiał do badań wirusologicznych stanowiło 68 próbek nasienia ogierów, które reagowały dodatnio w teście izolacji EAV w hodowli komórek RK 13.

Szczepy wirusowe i hodowla komórkowa. Do opracowania testu immunoperoksydazowego pośredniego użyto referencyjnego szczepu Bucyrus (ATCC VR-796) wirusa zapalenia tętnic koni oraz hodowli komórek nerki królika RK 13 (ATCC CCL-37), którą namnażano w płynie wzrostowym MEM Eagle'a z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej w temp. 37°C i w atmosferze 5% CO₂.

Namnażanie i oczyszczanie wirusa. Szczep referencyjny wirusa Bucyrus namnażano w hodowli komórkowej RK 13 w butelkach o powierzchni 175 cm² (NUNC). Zakażoną

hodowlę inkubowano do momentu powstania widocznego efektu cytopatycznego, mrożono w temperaturze -70°C , a następnie określano miano wirusa w TCID_{50} . Zawiesinę wirusa wirowano wstępnie przy $15\,000 \times g$ przez 30 min. w celu osadzenia elementów komórkowych. Supernatant przenoszono do czystych gilz, podwarstwiano 40% roztworem sacharozy i ultrawirovano przy $160\,000 \times g$ przez 2 godz. Peletki z wirusa zawieszano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) i mrożono w -70°C .

Ocena stopnia oczyszczenia antygeny poprzez elektroforezę białek wirusowych w żelu poliakrylamidowym. Materiałem do badań był wirus Bucyrus nieoczyszczony, oczyszczony przez ultrawirowanie, ultrawirowanie i filtrowanie przez filtr o porach o średnicy $0,2\ \mu\text{m}$ oraz supernatant zebrany po ultrawirowaniu. Jako kontroli ujemnej użyto zawiesiny niezakażonych komórek RK 13, które również poddawano ultrawirowaniu i filtrowaniu. Próbki poddawano denaturacji w temp. 96°C przez 5 min. w buforze próbkowym (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 130 mM ditiotreititol-DTT). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym (Invitrogen) w obecności SDS w warunkach redukujących w aparacie do elektroforezy pionowej (Invitrogen). Elektroforeza przebiegała w buforze elektrodowym MOPS z dodatkiem antyutleniaacza (Invitrogen) przy stałym napięciu 200 V i natężeniu około 0,8 A przez 40 min. Aby ocenić jakość rozdziału białek, żel poliakrylamidowy barwiono metodą srebrową. W pierwszym etapie żele utrwalano w roztworze 25% etanolu i 10% kwasu octowego przez 30 min. Następnie inkubowano je w roztworze barwiącym (0,2% azotan srebra, 0,05% formaldehyd) przez 30 min. i płukano wodą redetylowaną. Reakcję barwną wywoływano przy użyciu roztworu zawierającego 3% węglanu sodu, 0,001% tiosiarczanu sodu i 0,05% formaldehydu przez 10 min., a następnie hamowano 0,5% roztworem glicyny i płukano wodą. Wykonano dokumentację fotograficzną, a obraz analizowano przy użyciu programu One-Dscan (Scanalytics).

Immunitacja królików antygenem EAV. Wszystkie zabiegi na królikach wykonywano zgodnie z zasadami przyjętymi przez Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Do doświadczeń użyto 6 królików w wieku 2-3 miesięcy. Zwierzęta oznaczono numerami od 1 do 5. Jednego królika pozostawiono jako kontrolę. Przed podaniem antygeny od wszystkich zwierząt pobrano po około 2 ml krwi z żyły brzeżnej ucha, którą następnie zbadano na obecność przeciwciał dla EAV testem seroneutralizacji. Pobieranie krwi oraz szczepienia wykonywano według schematu przedstawionego w tab. 1. Oczyszczony przez ultrawirowanie szczep Bucyrus filtrowano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów $0,2\ \mu\text{m}$. Następnie za pomocą spektrofotometru określano poziom białka całkowitego w zawieszynie i przygotowywano rozcieńczenie wirusa tak, aby odpowiadało koncentracji $0,75\ \text{mg białka/ml}$ zawiesi-

ny. Przygotowany w ten sposób antygen mieszano z adjuwantem Emulsigen (MVP Laboratories Inc.) w stosunku 1 : 1 i podawano królikom podskórnie w ilości 1 ml w okolicy grzbietu. Zawiesinę podawano w kilka miejsc w ilości $0,25\ \text{ml}$ w odstępach 4-5 cm. Aby określić miano przeciwciał dla EAV w surowicy królików, pobierano od nich po 2 ml krwi, którą następnie badano testem seroneutralizacji. Przed skrwawieniem króliki premedykowano ksylazyną w dawce $10\ \text{mg/kg m.c.}$ (Sedazin, Biowet Puławy) i znieczulano ogólnie 10% ketaminą (Biowet Puławy) w dawce $35\ \text{mg/kg m.c.}$, a następnie unieruchamiano mechanicznie. Okolicę szyi strzyżono i dezynfekowano 70% etanolem. Po wypreparowaniu tętnicy szyjnej wspólnej pobierano do kolbki możliwie największą ilość krwi (ok. 70-150 ml). Zwłoki królików utylizowano. Krew do wykrzepienia inkubowano w temp. 37°C przez 2 godz., a następnie w temp. 4°C przez kilka godzin i wirowano przy $3000 \times g$ przez 10 min.

Opracowanie testu immunoperoksydazowego pośredniego. Jako przeciwciał do pierwszej fazy reakcji użyto surowicy poliklonalnej otrzymanej na królikach. Koniugat stanowiły kozie przeciwciała IgG dla immunoglobulin króliczych znakowane peroksydazą (Jackson). Substratem w reakcji był czterochlorowodorek 3,3-dwuaminobenzydyny (DAB, Sigma). Na wyrosniętą 1-2-dniową jednowarstwową hodowlę komórek RK 13 założoną na płytkach 96-dołkowych nanoszono po $100\ \mu\text{l}$ zawiesiny badanego materiału i inkubowano w temp. 37°C przez 1 godz. Następnie płyn z nad hodowli zlewano, nanoszono świeży płyn MEM z dodatkiem antybiotyków i inkubowano w temp. 37°C i w atmosferze 5% CO_2 . Po upływie 48 godz. hodowlę utrwalano 80% schłodzonym acetonem przez 10 min., a następnie suszono. Do utrwalonych komórek dodawano PBS z 1% dodatkiem albuminy bydlęcej (BSA) i 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) jako buforu blokującego i inkubowano w temp. 37°C przez 30 min. Następnie do dołków nanoszono króliczą surowicę poliklonalną rozcieńczoną 1 : 100 w 1% roztworze BSA w PBS z 10% dodatkiem dopełniacza świnki morskiej. Płytkę inkubowano 1 godz. w temp. 37°C , następnie płukano dwukrotnie PBS i nanoszono koniugat rozcieńczony 1 : 1000 w 1% BSA w PBS. Inkubowano 30 min. w temp. 37°C i płukano dwukrotnie PBS. Inkubacja z substratem (DAB) trwała 20 min., po niej płytkę płukano PBS i wodą destylowaną, a następnie suszono. Hodowlę oglądano pod mikroskopem świetlnym, pod powiększeniem $40 \times$.

Określenie czułości, swoistości i specyficzności testu. Do określenia optymalnych warunków wykonania testu immunoperoksydazowego brano pod uwagę rozcieńczenie surowicy poliklonalnej i koniugatu. W tym celu do dołków 96-dołkowej płytki z wyrosniętą hodowlą komórek RK 13 nanoszono po $100\ \mu\text{l}$ zawiesiny wirusa Bucyrus o mianie $10^3\ \text{TCID}_{50}$. Kolejne etapy wykonywano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą. Surowicę poliklonalną rozcieńczano w PBS z dodatkiem 1% BSA i 5% FBS w stosunku 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000 i nanoszono po $50\ \mu\text{l}$ na dołek, przeznaczając na każde rozcieńczenie całą kolumnę dołków płytki. Następnie przy-

Tab. 1. Plan szczepień i pobierania krwi od królików

Dzień 0.	Dzień 14.	Dzień 28.	Dzień 42.	Dzień 56.	Dzień 84.
I pobranie krwi	II pobranie krwi	III pobranie krwi	IV pobranie krwi	V pobranie krwi	VI pobranie krwi
I szczepienie	II szczepienie	III szczepienie	-	IV szczepienie	skrwawienie i eutanazja

gotowano rozcieńczenia koniugatu w PBS z dodatkiem 1% BSA i 5% FBS (1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10 000), które nanoszono w rzędach płytki. Wybierano rozcieńczenia surowicy i koniugatu, które dawały wyraźnie widoczną reakcję barwną. Do oceny testu immunoperoksydazowego pośredniego zastosowano następujące kryteria: czułość, swoistość i specyficzność. Za czułość testu immunoperoksydazowego przyjmowano najmniejszą ilość wirusa, którą wykrywano przy użyciu otrzymanej surowicy poliklonalnej. Do określenia czułości wykorzystano rozcieńczenia zmianowanego szczepu referencyjnego Bucyrus wykonane w postępie 10-krotnym. Tak rozcieńczoną zawiesinę wirusa Bucyrus nanoszono do dołków z hodowlą RK 13 i wykonywano wcześniej opisany test immunoperoksydazowy pośredni. Swoistość testu określano jako liczbę wyników ujemnych do całkowitej liczby próbek ujemnych poddanych badaniu. Do oceny swoistości IPT użyto 20 próbek nasienia po II pasażu w RK 13, które reagowały negatywnie w teście izolacji i RT-PCR. Do określenia specyficzności testu użyto następujących szczepów: szczep EAV T1329 (dr Dubuc, ADRI, Nepean, Kanada), szczep EAV Wrocław-2 i 5499/94 (prof. W. Golnik, AR, Wrocław, Polska), szczep szczepionkowy EAV MLV Arvac (Fort Dodge, USA), 10 izolatów terenowych EAV (kolekcja Zakładu Wirusologii, PIWet-PIB), 2 szczepy PRRSV: europejski (Lelystad) i amerykański (Hesse, doc. T. Stadejek, PIWet-PIB, Puławy) oraz inne szczepy, tj. 438/77 (EHV-1, ATCC VR-2229), 405/76 (EHV-4, ATCC VR-2230), Praga/56 (EIV typ A1) oraz Kentucky/8 (EIV typ A2) (kolekcja Zakładu Wirusologii, PIWet-PIB).

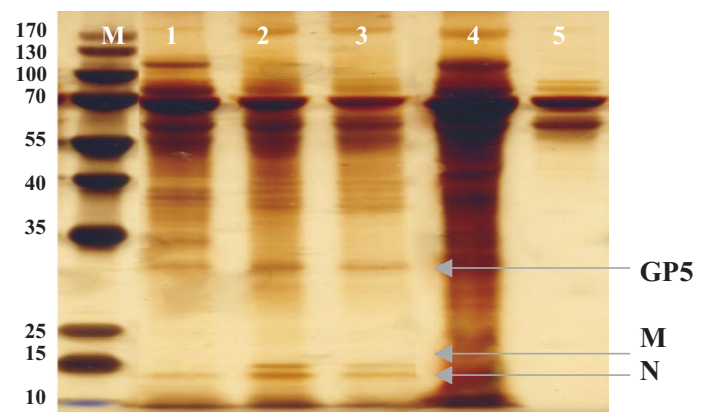
Wyniki i omówienie

W celu potwierdzenia tożsamości izolatów EAV opracowano test immunoperoksydazowy pośredni. Celem pierwszej fazy badań było uzyskanie oczyszczonego wirusa zapalenia tętnic koni, którym następnie immunizowano króliki. Stopień oczyszczenia antygeny wirusowego oceniano po rozdziale białek wirusowych w 12% żelu poliakrylamidowym i po barwieniu żelu metoda srebrową (ryc. 1). Analizując rozdziały elektroforetyczne stwierdzono wyraźne różnice w ścieżkach z produktami kolejnych etapów oczyszczania wirusa Bucyrus. W ścieżkach, na które naniesiono nieoczyszczony wirus (ryc. 1, ścieżka 1), niezakażoną hodowlę RK 13 (ryc. 1, ścieżka 4) obserwowano szereg prążków białkowych o masie od około 50 do 110 kDa, odpowiadających białkom komórkowym. W ścieżkach, na które naniesiono wirusa po ultrawiwaniu (ryc. 1, ścieżka 2) oraz po ultrawiwaniu i filtrowaniu (ryc. 1, ścieżka 3) widoczne były znacznie słabsze prążki w tym zakresie. Pozostałości białek komórkowych widoczne były również w ścieżce z supernatantem zebrany po ultrawiwaniu (ryc. 1, ścieżka 5). Zaobserwowano także, że prążki białkowe o masie cząsteczkowej odpowiadającej w przybliżeniu białkom strukturalnym wirusa były wyraźnie intensywniejsze w ścieżkach po oczyszczeniu wirusa niż przed oczyszczeniem. Były to prążki białkowe o masie 32 i 14 kDa odpowiadające glikoproteinie GP5 i białku nukleokapsydu N. W przypadku wiru-

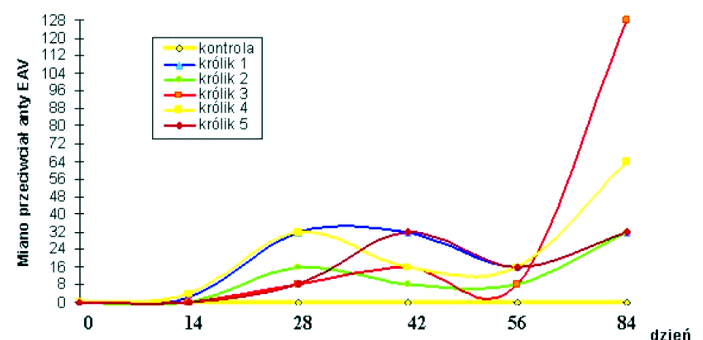
sa oczyszczonego wstępnie i filtrowanego obserwowano również prążek o masie 16 kDa odpowiadający prawdopodobnie białku membranowemu M. Prążków o masie 14, 16 i 32 kDa nie stwierdzono w ścieżkach z niezakażoną hodowlą RK 13 i z supernatantem po ultrawiwaniu.

Oczyszczonym w ten sposób szczepem referencyjnym Bucyrus immunizowano króliki. Poziom przeciwciał anty EAV w surowicy królików badano w odstępach dwutygodniowych. Wyniki monitorowania miana przeciwciał przeciw EAV przedstawiono na wykresie (ryc. 2). Poziom przeciwciał u immunizowanych królików stopniowo rósł, osiągając miano 1 : 32 (króliki 1, 2 i 5), 1 : 64 (królik 4) i 1 : 128 (królik 3) w dniu skrwawienia zwierząt. Próbkę surowicy od królika kontrolnego reagowały negatywnie w teście seroneutralizacji. Po 84 dniach od pierwszej immunizacji zwierzęta skrwawiono, a otrzymanej surowicy poliklonalnej użyto do opracowania testu immunoperoksydazowego pośredniego.

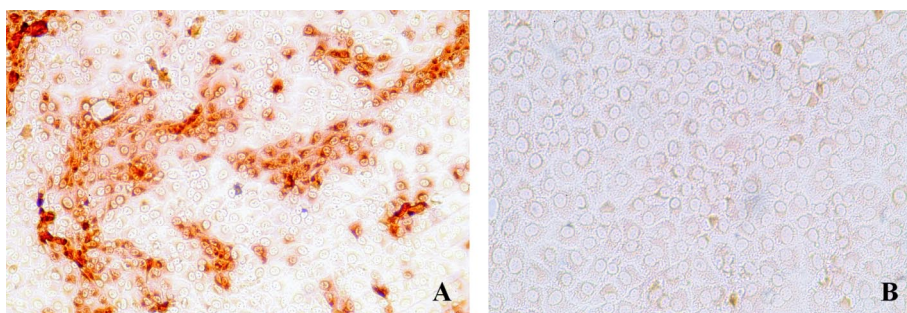
Pierwszy etap badań polegał na optymalizacji warunków przeprowadzenia testu i doborze odpowiednich rozcieńczeń surowicy poliklonalnej i koniugatu. Stwierdzono, iż optymalne rozcieńczenie surowicy króliczej



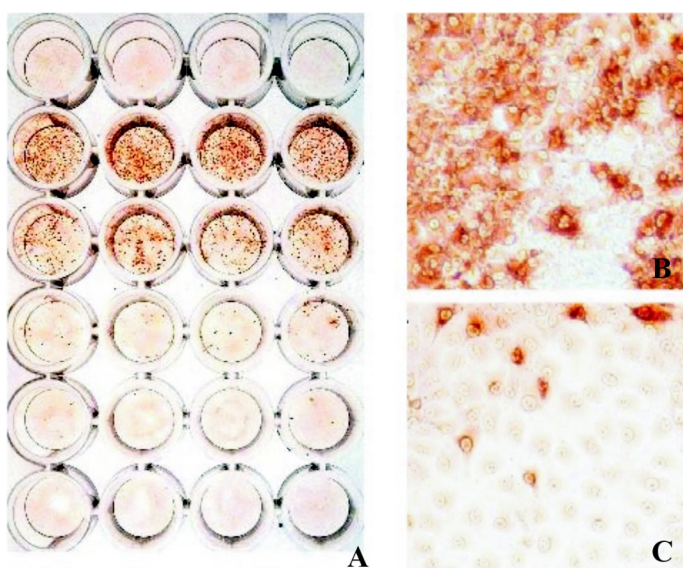
Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny białek wirusowych w SDS-Page po barwieniu metodą srebrową. Ścieżki: M – marker PageRuler 10–170 kDa (Fermentas); 1 – szczep referencyjny Bucyrus nieoczyszczony; 2 – Bucyrus po ultrawiwaniu; 3 – Bucyrus po ultrawiwaniu i filtrowaniu; 4 – niezakażona hodowla RK 13; 5 – supernatant po ultrawiwaniu



Ryc. 2. Miano przeciwciał anty EAV w surowicy królików w trakcie immunizacji



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy (powiększenie 40 ×) testu immunoperoksydazowego pośredniego. A – obraz uzyskany w teście z użyciem surowicy króliczej poliklonalnej w rozcieńczeniu 1 : 100 i koniugatu w rozcieńczeniu 1 : 1000. B – obraz testu immunoperoksydazowego z surowicą poliklonalną w rozcieńczeniu 1 : 500 i koniugatem w rozcieńczeniu 1 : 500



Ryc. 4. Czulość testu immunoperoksydazowego pośredniego (IPT). A – obraz IPT, fragment 96-dółkowej płytki, B i C – obraz mikroskopowy (powiększenie 200 ×) IPT dla komórek zakażonych wirusem Bucyrus w dawce 1000 i 1 TCID₅₀

wynosiło odpowiednio: 1 : 50 – 1 : 100, a koniugatu 1 : 1000 – 1 : 5000. Obraz mikroskopowy testu immunoperoksydazowego pośredniego uzyskany z użyciem szczepu referencyjnego Bucyrus i otrzymanej surowicy poliklonalnej przedstawia ryc. 3.

Czulość testu immunoperoksydazowego pośredniego oznaczona dla szczepu referencyjnego Bucyrus EAV wynosiła 1 TCID₅₀/100 μl (ryc. 4).

Do określenia swoistości testu IPT użyto 20 próbek nasienia po II pasażu w hodowli RK 13, które reagowały negatywnie zarówno w teście izolacji, jak i RT-PCR. Wszystkie 20 próbek dały wynik ujemny rów-

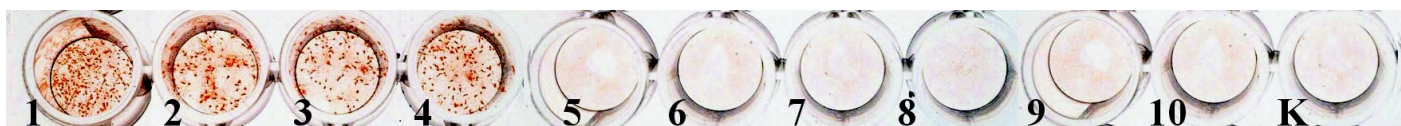
nież w teście immunoperoksydazowym, co świadczyło o 100% swoistości testu.

Specyficzność testu immunoperoksydazowego oceniano na podstawie reakcji z 14 szczepami EAV, 2 szczepami wirusa należącego do arteriowirusów wywołującego PRRS u świń oraz 6 szczepami innych wirusów, które często wywołują u koni podobne objawy kliniczne jak zakażenie wirusem zapalenia tętnic koni. Wyniki testu IPT dla wybranych wirusów przedstawia ryc. 5. Wszystkie szczepy EAV, zarówno te należące filogenetycznie

do podgrupy szczepów europejskich (Wrocław-2, 5499/94), jak i amerykańskich (T-1329, MLV Arvac) oraz wirusy wyizolowane w Polsce na przestrzeni kilku lat, w opracowanym teście immunoperoksydazowym pośrednim dały wynik dodatni. Inne wirusy końskie nie należące do Arteriviridae, jak i szczepy wirusa PRRS blisko spokrewnionego z EAV reagowały ujemnie w IPT. Oznaczało to 100% specyficzność testu.

Po optymalizacji warunków testu i ustaleniu jego czułości, swoistości i specyficzności przebadano 68 próbek nasienia ogierów, które reagowały dodatnio w teście izolacji EAV. Tożsamość wyizolowanych wirusów potwierdzono testem immunoperoksydazowym pośrednim we wszystkich 68 przypadkach.

Izolacja wirusa w hodowli komórkowej uznawana jest za złoty standard w identyfikacji ogierów siewców EAV z nasieniem i niemożliwe jest całkowite jej zastąpienie metodami szybszymi, tj. PCR czy ELISA. Jednocześnie wynik dodatni tego testu wymaga potwierdzenia. W tym celu do identyfikacji izolatów EAV wprowadzono test immunoperoksydazowy. Opracowany z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych test charakteryzował się wysoką czułością, specyficznością i swoistością. Niektórzy autorzy do identyfikacji izolatów EAV używali przeciwciał monoklonalnych (1, 4, 8). Mimo że istnieje tylko jeden serotyp EAV, izolaty terenowe różnią się wirulencją, patogennością, właściwościami biologicznymi i antygenowymi (3, 10). Dlatego też jedynie wysoce konserwatywne białka EAV, tj. białko nukleokapsydu GP7, powinny być użyte do opracowania przeciwciał monoklonalnych do badań wirusologicznych próbek terenowych (12). Duża zmienność genomu wirusa i związane z nią zmiany w antygenowości białek, szczególnie we fragmencie ektodomeny



Ryc. 5. Specyficzność testu immunoperoksydazowego pośredniego. Dolki: 1 – T1329; 2 – Wrocław-2; 3 – 5499/94; 4 – MLV Arvac; 5 – szczep europejski PRRSV; 6 – szczep amerykański PRRSV; 7 – EHV-1; 8 – EHV-4; 9 – EIV-A1; 10 – EIV-A2; K – nie zakażona hodowla komórkowa RK 13

odpowiedzialnej za właściwości neutralizujące wpływają na reakcję z przeciwciałami monoklonalnymi (2). Badania oceniające przydatność przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych do wykrywania EAV wykazały wyższą specyficzną tych pierwszych. Zatem ze względu na niski koszt, łatwość w przygotowaniu i wysoką specyficzną do potwierdzania tożsamości izolatów EAV wprowadzono test immunoperoxydazowy pośredni w oparciu o surowicę poliklonalną króliczą.

Piśmiennictwo

- Balasuriya U. B. R., Evermann J. F., Hedges J. F., McKeirnan A. J., Mitten J. Q., Beyer J. C., McCollum W. H., Timoney P. J., MacLachlan N. J.: Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 213, 1586-1589.
- Balasuriya U. B. R., Snijder E. J., van Dinten L. C., Heidner H. W., Wilson W. D., Hedges J. F., Hullinger P. J., MacLachlan N. J.: Equine arteritis virus derived from an infectious cDNA clone is attenuated and genetically stable in infected stallions. *Virology* 1999, 260, 201-208.
- Balasuriya U. B. R., Timoney P. J., McCollum W. H., MacLachlan N. J.: Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1995, 214, 690-697.
- Deregt D., de Vries A. A., Raamsman M. J., Elmgren L. D., Rottier P. J.: Monoclonal antibodies to equine arteritis virus proteins identify the GL protein as a target for virus neutralization. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 2439-2444.
- Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.: An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet.* 1957, 47, 69-75.
- Golnik W., Michalak T.: Przypadki wirusowego zapalenia tętnic koni (arteritis equorum) w Polsce. *Medycyna Wet.* 1978, 35, 605-606.
- Golnik W., Moraillon A., Golnik J.: Identification and antigenic comparison of equine arteritis virus isolated from an outbreak of epidemic abortion of mares. *J. Vet. Med. Ser. B* 1986, 33, 413-417.
- Hornyak A., Denes B., Szeredi L., Dencso L., Rusvai M.: Diagnostic application of immunoperoxidase monolayer assay using monoclonal antibodies produced against equine arteritis virus 14-kDa nucleocapsid protein. *Hybrid Hybridomics* 2004, 23, 368-372.
- Little T. V., Holyoak G. R., McCollum W. H., Timoney P. J.: Output of equine arteritis virus from persistently infected stallions is testosterone-dependent. 1992, 225, Plowright W., Rossdale P. D., Wada J. F. (red.), *Proceedings of the 6th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Cambridge 1991, R&W Publications Ltd., Newmarket.
- Murphy T. W., McCollum W. H., Timoney P. J., Klingeborn B. W., Hyllseth B., Golnik W., Erasmus B.: Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet. Microbiol.* 1992, 32, 101-115.
- Raś A., Stedlanowski T.: Badać czy nie badać? *Koń Polski* 2001, 2, 50-51.
- Starick E.: Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *Acta Virol.* 1998, 42, 333-339.
- Timoney P. J.: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Equine arteritis virus. 2004, rozdz. 2.5.10, 725-736.
- Timoney P. J., McCollum W. H., Murphy T. W., Roberts A. W., Willard A. W., Carswell J. G.: The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of transmission. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1987, 35, 95-102.
- Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., Murphy T. W.: Demonstration of the carrier state in natural acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.* 1986, 41, 279-280.

Adres autora: lek. wet. Magdalena Larska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: m.larska@piwet.pulawy.pl