

Odporność nieswoista u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem EBHS^{*)}

PIOTR NOWACZYK, WIESŁAW DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Przyrodniczych US, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Nowaczyk P., Deptuła W.

Non-specific immunity in rabbits experimentally infected with EBHS (European Brown Hare Syndrome) virus

Summary

In accordance with the lack of immunological studies concerning hares infected with EBHS virus, the aim of this study was to observe the dynamics of chosen indices of non-specific immunity altered with cidal capacity of PMN cells and the amount of lysozyme in rabbits infected with EBHS virus. The studies were conducted to show replication of EBHS virus in the immune system in rabbits. The results of the studies in these animals have shown that EBHS virus replicates in rabbit's cells, proving the brake through of the species barrier in rabbits, which during the course of this infection causes the activation of leucocytes resulting in an increased amount of LZM in serum.

Keywords: rabbit, EBHS virus

Wirus EBHS (European Brown Hare Syndrome) należy do rodziny *Caliciviridae*, do której zaliczamy także wirus RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease) (6). Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym syndromu europejskich zajęcy szaraków (3, 7), zaś wirus RHD – pomoru królików (7, 17, 18). Naturalnym gospodarzem dla wirusa EBHS są zajęce z gatunku *Lepus europeus* (zając szarak) i *Lepus timidus* (zając bielak), zaś dla wirusa RHD – króliki (6). Istotne jest i to, że obok bliskiego pokrewieństwa prezentowanych wirusów (6), również zajęce i króliki wykazują wspólne pochodzenie i należą do tej samej rodziny zającowatych (*Leporidae*) (15). Wirusy EBHS i RHD wykazują identyczną organizację genomu oraz wysoką homologię w zakresie sekwencji aminokwasów białka kapsydu bliską 80%, a różnią się jedynie delecją 4 i insercją jednego aminokwasu (2, 13). Dodatkowo choroby wywołane przez wirusy EBHS i RHD dają podobny – gwałtowny przebieg zarówno u zajęcy (3, 7), jak i królików (7, 17, 18), a śmiertelność przy obu wirusach jest bardzo wysoka i wynosi od 70% do 100% (3, 7, 17, 18). Także objawy przy tych chorobach są zbliżone i manifestują się m.in. zaburzeniami ze strony oun u zajęcy i królików (3, 7) oraz żółtaczką u zajęcy (3), jak też zmianami w układzie oddechowym u królików (17). W obrazie sekcyjnym zajęcy (3, 7) zakażonych

wirusem EBHS i królików (5, 7, 17) – wirusem RHD, obserwowano podobne zmiany m.in. wątrobie, śledzionie, oun, płucach i nerkach. Przeprowadzone badania odpornościowe u królików zakażonych eksperymentalnie wirusem RHD wykazały, że istotną rolę w przebiegu tego zakażenia pełnią mechanizmy odporności swoistej i nieswoistej, tak komórkowej, jak i humoralnej (4, 12, 17-20). Biorąc pod uwagę przytoczone fakty dotyczące podobieństwa wirusów EBHS i RHD oraz pokrewieństwa zajęcy i królików, a także przebieg i obraz kliniczny choroby, założono, że w przypadku dojścia do zakażenia królików wirusem EBHS, uzyskane zmiany w układzie odpornościowym będą swoiste dla tej infekcji, a które do tej pory nie były opisane.

Ze względu na brak w piśmiennictwie badań immunologicznych u zajęcy i zwierząt laboratoryjnych zakażonych wirusem EBHS, postanowiono w niniejszej pracy prześledzić dynamikę wybranych wskaźników nieswoistej odporności komórkowej (warunkowanej zdolnością bójczą komórek PMN określoną testem spontanicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego NBT) i humoralnej (ilość lizozymu – LZM) u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem EBHS. Kontrolę zakażenia wykonano metodą Real-Time PCR poprzez śledzenie replikacji wirusa EBHS w komórkach krwi obwodowej królików oraz poprzez zarejestrowanie objawów chorobowych.

^{*)} Badania finansowane ze środków na naukę w latach 2005-2006 jako projekt badawczy.

Material i metody

Badaniem objęto 22 zdrowe króliki – *Oryctolagus cuniculus*, mieszańce pochodzące z hodowli użytkowej pod stałym nadzorem zootechniczno-weterynaryjnym o masie 1,7-2,5 kg, zaklasyfikowane według norm krajowych jako zwierzęta grupy konwencjonalnej (1). Zwierzęta te odznaczały się ogólnie dobrym stanem zdrowia i przebywały w wivarium, gdzie warunki zoohigieniczne, ocenione na podstawie pomiaru temperatury, wilgotności i oświetlenia oraz powierzchni użytkowej, odpowiadały normom krajowym (1, 16). Króliki przetrzymywano w typowych metalowych klatkach dla królików o wymiarach 65 cm × 45 cm × 40 cm i żywiono pełnowartościową paszą LSK produkowaną przez Wytwórnę Koncentratów i Mieszanek Paszowych „Agropol” w Motyczu przy nieograniczonym dostępie do wody.

Spośród 22 zwierząt użytych w doświadczeniu, 16 zakażono wirusem EBHS, a 6 królików stanowiło grupę kontrolną. Do zakażenia użyto 20% homogenizatu wątroby, o mianie HA 126, pochodzącego od naturalnie zakażonego padłego zająca. Homogenizat otrzymano od prof. Jana Buczka z Uniwersytetu w Białymstoku. Zwierzęta zakażono domięśniowo 1 ml homogenizatu. Króliki kontrolne w liczbie 6 sztuk otrzymały analogicznie 1 ml jałowego płynu fizjologicznego. Krew do badań pobierano z żyły brzeżnej ucha królika w godzinach 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56 i 60 po zakażeniu wirusem EBHS lub podaniu jałowego płynu fizjologicznego.

Test spontanicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) wykonany został w oparciu o zmodyfikowaną metodę Parka (14), natomiast do oznaczania ilości lizozymu (LZM) w surowicy tych zwierząt wykorzystano metodę dyfuzji płytkowej według Hankiewicza (8).

Zdolność wirusa EBHS do replikacji w ogólnej puli leukocytów i puli granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej u królików zakażonych wirusem EBHS, wykazano metodą Real-Time PCR (Eurogentec, Belgia). Badania te przeprowadzono w dwóch etapach. W I etapie przeprowadzono izolację ogólnej puli leukocytów (wg A&A Biotechnology, Polska) i puli granulocytów obojętnochłonnych wg metody Zemana (21) w modyfikacji Hukowskiej-Szematowicz (10) z pełnej krwi królika, jak również ekstrakcję wirusowego RNA (wg A&A Biotechnology, Polska) z tych komórek. W II etapie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR), a następnie dokonano pomiaru ilości otrzymanego fragmentu cDNA białka VP60 wirusa EBHS metodą Real-Time PCR (Eurogentec, Belgia).

W celu otrzymania komplementarnej nici cDNA, do reakcji użyto: 1 µl startera WD (5' G T T G T G G G G T G T A T G T G G T G G C 3') o koncentracji 25 µM, zaprojektowanego na podstawie konserwatywnej sekwencji wirusa EBHS w rejonie białka VP60 przez firmę Oligo (Polska), 1 µl mieszaniny nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o koncentracji 25 µM każdy (Promega, USA); 0,5 µl inhibitora RNA-zy o koncentracji 40 u/µl (Promega, USA); 0,25 µl primera Oligo (dT)₁₈ o koncentracji 100 µM; 13 µl wody DEPC (Eppendorf, Niemcy); 2 µl buforu 5 × stężonego (Invitrogen, USA); 0,25 µl DTT o koncentracji 100 µM; 5 µl RNA uprzednio inkubowanego przez 5 mi-

nut w temperaturze 65°C oraz 1 µl M-MLV RT o koncentracji 200 u/µl (Invitrogen, USA). Reakcję przeprowadzono w końcowej objętości mieszaniny wynoszącej 25 µl w termocyklerze firmy Biometra o następującym profilu temperaturowym: 25°C przez 10 minut, 37°C przez 60 minut, 95°C przez 5 minut, 4°C przez 1 minutę, 4°C ∞. Otrzymany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA fragmentu białka VP60 wirusa EBHS wykorzystano do ilościowego pomiaru tego cDNA metodą Real – Time PCR.

Do reakcji Real-Time PCR wykorzystano startery PN (5' G T T G C A A A G T C G A T C T A C G G G G T T G C 3') i WD (5' G T T G T G G G G T G T A T G T G G T G G C 3'), zaprojektowane na podstawie konserwatywnej sekwencji wirusa EBHS w rejonie białka VP60 przez firmę Oligo (Polska), pozwalających na amplifikację fragmentu o długości 121 pz. Do ilościowego pomiaru kopii matrycy cDNA wykorzystano gotowy zestaw odczynników Smart kit for SYBR® Green I oraz 18S rRNA Control kit (FAM-TAMRA) (dla kontroli wewnętrznej) firmy Eurogentec (Belgia), a reakcję przeprowadzono według zaleceń producenta (Eurogentec, Belgia). Wszystkie powyższe reakcje prowadzono w aparacie Smart Cycler II firmy Cepheid, wykorzystując profil temperaturowy zalecany przez producenta odczynników (Eurogentec, Belgia). W celu późniejszego odczytania ilości kopii matrycy cDNA fragmentu białka VP60 wirusa EBHS, przygotowano krzywą standardową według następujących rozcieńczeń genu referencyjnego 18S rRNA (Eurogentec, USA): 100 amoli; 10 amoli; 1 amol; 0,1 amola; 0,01 amola. Po przeprowadzonych reakcjach odczytano stężenie kopii matrycy cDNA (amol) fragmentu białka VP60 wirusa EBHS, odczytano stężenie fragmentu genu referencyjnego 18S rRNA królika, wyliczono wartość stosunku stężenia kopii matrycy cDNA fragmentu białka VP60 wirusa EBHS i fragmentu genu referencyjnego 18S rRNA królika, który wyrażał rzeczywisty poziom ekspresji genu EBHS, a następnie otrzymaną wartość przeliczono na ilość kopii wirusa EBHS (× 10²³ kopii) w badanych próbach w odniesieniu do 1000 komórek.

Uzyskane wyniki badań odpornościowych poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy p = 0,05.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań z zakresu odporności nieswoistej, a także badań wirusologicznych dotyczących przedstawienia ilości zreplikowanych kopii wirusa EBHS w leukocytach i granulocytach obojętnochłonnych krwi obwodowej u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem EBHS, przedstawiono w tab. 1 i 2.

Analizując uzyskane wyniki badań immunologicznych u królików zakażonych eksperymentalnie wirusem EBHS (tab. 1), należy stwierdzić, że w teście NBT spontanicznym nie odnotowano różnic statystycznie istotnych, zaś w wartościach ilości LZM w surowicy krwi wykazano statystycznie istotny spadek w 36. i 60. godzinie po podaniu tego antygeny.

Oceniając wyniki badań wirusologicznych przeprowadzonych metodą Real-Time PCR (tab. 2) stwierdzono, że wirus EBHS wykazuje zdolność replikacji swoich cząstek zakaźnych zarówno w ogólnej puli leuko-

Tab. 1. Wskaźniki nieswoistej odporności u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem EBHS

Badane parametry		Wartości parametrów w poszczególnych godzinach																			
		0		4		8		12		24		36		48		52		56		60	
		Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)	Z (16)	K (6)
Test NBT spontaniczny (l.b.)	\bar{x} SD ±	3,7 1,5	3,0 2,8	2,0 1,2	1,0 0,0	2,6 1,1	3,5 3,5	1,4 0,8	3,5 3,5	1,9 1,1	2,0 0,0	2,6 1,8	1,5 0,7	4,0 1,8	3,0 0,0	3,1 2,1	6,0 5,7	3,9 3,0	5,0 0,0	2,6 1,9	3,5 2,1
Ilość LZM (mg/l)	\bar{x} SD ±	4,2 0,8	5,1 1,5	3,5 0,4	5,1 1,5	5,7 1,7	4,7 0,9	3,8 1,2	5,7 0,6	4,4 1,3	7,1 1,3	3,8 1,2	7,1* 1,3	4,0 1,5	5,7 0,6	4,2 1,3	5,7 0,6	5,7 1,7	7,1 1,3	3,8 1,4	9,3* 1,8

Objaśnienia: Z – zwierzęta zakażone; K – zwierzęta kontrolne; () – liczba zwierząt; * – różnice istotne statystycznie przy $p = 0,05$

cytów, jak i puli granulocytów obojętnochnych u królików zainfekowanych tym zarazkiem. W przypadku leukocytów krwi obwodowej, ilość zreplikowanych cząstek wirusa EBHS wzrastała począwszy od

8. godziny doświadczenia i trwała do jego zakończenia (godzina 60.) z niewielkim spadkiem w 52. godzinie badania. Dodać należy, że z uwagi na dużą ilość replikowanych cząstek wirusa w godzinach 56. i 60., odczyt ilości ich kopii przy zastosowaniu komercyjnej krzywej wzorcowej (Eurogentec, Belgia) był niemożliwy, jednak należy przyjąć, że ilość kopii wirusa w tych godzinach była wyższa niż $444,5 \times 10^{23}$ kopii, jaką obserwowano w 48. h badania. Oceniając ilość kopii wirusa EBHS w granulocytach obojętnochnych krwi obwodowej królików, należy stwierdzić że ich ilość wzrastała od 8. do 56. godziny doświadczenia ze spadkiem w godzinie 60.

Należy również dodać, że nie stwierdzono u królików zakażonych wirusem EBHS objawów typowych dla choroby krwotocznej zajęcy, chociaż między 4. a 60. godziną doświadczenia, zarejestrowano objawy ogólne w postaci ciężkiego i przyspieszonego oddechu, kichania, osowiałości oraz braku apetytu.

Oceniając uzyskane wyniki badań należy podać, że w przypadku wirusa EBHS porównanie otrzymanych rezultatów jest niemożliwe z uwagi na brak w piśmiennictwie jakichkolwiek badań immunologicznych dotyczących EBHS. Znane są jednakże wyniki doświadczeń u królików zakażonych eksperymentalnie różnymi szczepami wirusa RHD (tab. 3), do których nasze wyniki odnieśliśmy ze

Tab. 2. Liczba kopii wirusa EBHS w ogólnej puli leukocytów i puli granulocytów obojętnochnych krwi obwodowej u królików zakażonych eksperymentalnie wirusem EBHS

Badany parametr		Wartości w poszczególnych godzinach									
		0 (16)	4 (16)	8 (16)	12 (16)	24 (16)	36 (16)	48 (16)	52 (16)	56 (16)	60 (16)
Liczba kopii wirusa ($\times 10^{23}$ kopii) w 1000 leukocytów	\bar{x}	0,0	0,0	6,0	10,1	26,4	103,8	444,5	376,8	>	>
	SD ±	0,0	0,0	1,0	0,6	3,2	12,4	39,6	5,4	-	-
Liczba kopii wirusa ($\times 10^{23}$ kopii) w 1000 granulocytów obojętnochnych	\bar{x}	0,0	0,0	2,3	3,2	9,0	35,2	147,7	182,1	253,5	205,4
	SD ±	0,0	0,0	0,7	0,3	1,5	7,6	19,8	23,3	32,7	23,6

Objaśnienia: () – liczba zwierząt zakażonych; > – wartości powyżej 444,5

względem na podobieństwo tego wirusa do wirusa EBHS oraz pokrewieństwo zajęcy i królików.

Porównując wyniki badań własnych z zakresu wartości testu NBT spontanicznego do rezultatów uzyskanych u królików zakażonych 12 różnymi szczepami wirusa RHD (tab. 3) należy stwierdzić, że brak zmian w tym wskaźniku odpornościowym zarejestrowano także przy szczepie francuskim Fr-2 wirusa RHD. Natomiast w przypadku szczepu francuskiego Fr-1 oraz polskiego MAŁ i SGM wirusa RHD wykazano krót-

Tab. 3. Sumaryczne zestawienie wyników wartości testu redukcji błękitu nitrotrazoliowego (NBT) w teście spontanicznym i ilości lizozymu (LZM) u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem RHD

Szczep wirusa RHD	Test NBT spontaniczny	Ilość LZM (mg/l)	Piśmiennictwo
Francuski – Fr-1	↑ 12, 24	brak zmian	(17)
Francuski – Fr-2	brak zmian	↑ 4, 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56	(17)
Polski – MAŁ	↑ 52	↑ 8, 24, 36, 48, 52, 56	(17)
Polski – SGM	↑ 8, 24	↓ 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56, 60	(17)
Polski – Kr-1	↓ 36	↑ 8, 48 ↓ 52, 56	(4)
Polski – KGM	↓ 56	↓ 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56, 60	(4)
Polski – BLA	↑ 8, 12, 24, 36, 48, 52	↓ 4, 12, 48, 52	(12, 19)
Polski – PD	nie badano	↑ 12, 24, 48, 52, 60, 72 ↓ 4, 8, 36	(20)
Polski – GSK	nie badano	↑ 4, 24, 36, 48, 52, 60 ↓ 8, 12, 56	(20)
Polski – Ż	nie badano	↑ 52, 56, 60	(20)
Polski – ŻD	nie badano	brak zmian	(20)
Czeski – V-561	nie badano	↑ 4, 24, 36	(9)

Objaśnienia: ↑ ↓ – statystycznie istotny wzrost/spadek w poszczególnych godzinach doświadczenia

kotrwały wzrost wartości testu NBT, zaś w przypadku szczepu BLA, który nie posiada zdolności hemaglutynacji erytrocytów (11), wzrost ten utrzymywał się dłużej. Ponadto w przypadku królików zakażonych szczepami polskimi Kr-1 i KGM wirusa RHD zanotowano krótkotrwały spadek wartości testu NBT.

Porównując uzyskane wyniki z zakresu ilości LZM u królików badanych do analogicznych rezultatów otrzymanych przy zakażeniu królików 12 różnymi szczepami wirusa RHD (tab. 3), należy stwierdzić że zarejestrowany spadek wartości tego parametru, uzyskany u królików zakażonych wirusem EBHS, jest zbliżony do wyniku zanotowanego przy szczepach SGM, KGM, BLA, Kr-1, PD i GSK (przy tych trzech ostatnich szczepach notowano także wzrost) wirusa RHD, choć to obniżenie u nich, przypadało na nieco inne godziny po zakażeniu i ich spadek utrzymywał się dłużej (tab. 3). Inne szczepy (Fr-2, MAŁ, Ż, V-561) wirusa RHD powodowały wzrost wartości ilości LZM, który był mniej lub bardziej wydłużony w czasie (tab. 3). Ponadto odnotowano także, że szczep Fr-1 i ŻD wirusa RHD nie powodował zmian w ilości surowiczego LZM u królików, co wyraźnie odróżnia je od wirusa EBHS, przy którym w badaniach własnych takie zmiany zarejestrowano (tab. 3).

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników badań należy stwierdzić, że:

- wirus EBHS replikuje się w komórkach królików, co jest istotnym faktem biologicznym i dowodem przełamania przez ten wirus bariery gatunkowej. Czynniki ten powoduje również u królików nietypowe objawy chorobowe,

- zakażenie królików wirusem EBHS manifestuje się zmianami immunologicznymi częściowo zbliżonymi w zakresie testu NBT, do wartości uzyskanych przy szczepie Fr-2 wirusa RHD oraz w zakresie ilości surowiczego LZM przy szczepach polskich (SGM, KGM i BLA) tego wirusa,

- większość szczepów wirusa RHD (tab. 3) powodowała dłużej trwające zmiany w badanych parametrach u królików niż powodował to wirus EBHS u tych zwierząt. Świadczyłoby to, że wirus EBHS, mimo że należy podobnie jak wirus RHD do tego samego rodzaju *Lagovirus* i tej samej rodziny *Caliciviridae*, dający reakcje krzyżowe z wirusem RHD, powoduje znacznie słabiej zaznaczone i krócej trwające zmiany w badanych wskaźnikach odporności wrodzonej u królików.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Materiały konferencyjno-szkoleniowe Sekcji ds. Zwierząt Laboratoryjnych. ZG SISTR 1987, 2, 26-77.
2. Bascunana C. R., Nowotny N., Belak S.: Detection and Differentiation of Rabbit Hemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome Viruses by Amplification of VP60 Genomic Sequences from Fresh and Fixed Tissue Specimens. J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 2492-2495.
3. Deptuła W., Buczek J.: Syndrom brązowych zajęcy europejskich – nowa jednostka chorobowa. Medycyna Wet. 1993, 49, 208-210.

4. Deptuła W., Kęsy A., Tokarz-Deptuła B., Stosik M., Travnicek M.: Dynamics of selected parameters in rabbits infected with rabbit haemorrhagic disease virus. Folia Veterinaria 1999, 43, 186-190.
5. Deptuła W., Lener M., Tokarz-Deptuła B., Stosik M.: Układ odpornościowy i choroby zakaźne królików. Wyd. Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin 2003.
6. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A.: Virus Taxonomy. Wyd. Academic Press, San Diego 2005.
7. Fitzner A.: Kaliciwirusy – patogeny zwierząt i ludzi. Medycyna Wet. 2002, 58, 89-95.
8. Hankiewicz J., Świerczek E.: Wyniki własnych badań lizozymu w surowicy krwi i moczu. Pol. Arch. Med. Wewn. 1975, 51, 591-597.
9. Hukowska B., Nowaczyk P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Wskaźniki nieswoistej odporności humoralnej u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem VHD (viral haemorrhagic disease) – szczep czeski V-561. Mat. VI Konf. Nauk. Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii. Warszawa 2003, s. 90-94.
10. Hukowska-Szematowicz B.: Charakterystyka immunologiczno-genetyczna wybranych szczepów wirusa RHD (rabbit haemorrhagic disease). Praca dokt. US Szczecin 2006.
11. Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski B., Paprocka G., Walkowiak B.: A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbits virus. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 1996, 15, 1029-1035.
12. Nahurska A., Tokarz-Deptuła B., Hukowska B., Deptuła W.: Selected indices of non-specific humoral immunity in rabbits experimentally infected with non-haemagglutinating strain of VHD (viral haemorrhagic disease) virus. Pol. J. Vet. Sci. (Suppl. 3) 2003, 6, 25-27.
13. Nowotny N., Bascunana C. R., Pordany-Ballagi A., Gavier-Widen D., Uhlen M., Belak S.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. Arch. Virol. 1997, 142, 657-673.
14. Park B. H., Fihring S. M., Smithowiak E. M.: Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils A diagnostic A i D. Lancet 1968, 2, 532-538.
15. Pucek Z.: Klucz do oznaczania ssaków polskich. Wyd. PWN, Warszawa 1984.
16. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 marca 2006 r. w sprawie szczegółowych warunków utrzymywania zwierząt laboratoryjnych w jednostkach doświadczalnych, jednostkach hodowlanych i u dostawców. Dz. U. 2006, nr 50, poz. 368.
17. Tokarz-Deptuła B.: Kształtowanie się wybranych wskaźników odporności nieswoistej u królików po zakażeniu wirusem VHD (viral haemorrhagic disease). Praca dokt., PIW Puławy 1998.
18. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W., Kęsy A.: Pomór królików ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk odpornościowych. Medycyna Wet. 2002, 58, 497-500.
19. Tokarz-Deptuła B., Hukowska B., Deptuła W.: Dynamic alterations in selected indices of non-specific cell-mediated immunity in rabbits experimentally infected with VHD (viral haemorrhagic disease) virus. Pol. J. Vet. Sci. (Suppl. 3) 2003, 6, 70-73.
20. Tokarz-Deptuła B., Niedźwiedzka P., Deptuła W.: Surowiczy lizozym (LZM) u królików eksperymentalnie zakażonych czterema polskimi szczepami RHDV (rabbit haemorrhagic disease virus). Mat. VIII Konf. Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii. Warszawa 2005, s. 132-136.
21. Zeman K.: Metody izolacji i oceny funkcji granulocytów obojętnochłonnych. Immunol. Pol. 1995, 15, 157-170.

Adres autora: mgr Piotr Nowaczyk, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin;
e-mail: kurp13@sus.univ.szczecin.pl