Artykuł przeglądowy *Review*

Zmienność genetyczna wirusa a diagnostyka zakażeń EAV

MAGDALENA LARSKA, JERZY ROLA

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

Larska M., Rola J.

Genetic variability and diagnostics of EAV infections

Summary

Equine arteritis virus (EAV) belongs to the family Arteriviridae of the order Nidovirales. The viral genome composed by single-stranded positive sense RNA is enclosed in a icosahedral nucleocapsid and surrounded by a proteolipid envelope. The genome consists of nine open reading frames (ORFs) coding both structural and non-structural proteins. Although only one serotype of EAV is distinguished, field isolates differ in virulence and pathogenicity. The EAV infection is usually subclinical. 30-60% of stallions after infection become persistent carriers of the virus and can shed EAV with their semen during next several weeks, months or even years. Mares covered by EAV shedding stallions can result in abortions, fetus resorptions, infertility and even death of the newborn foals that lead to large losses in horse breeding. Seropositive stallions sheding the virus in their semen are the main reservoir of the virus; the control of the disease, therefore, should be based on their identification and elimination from breeding. Genetic variability of EAV can lead to the increase of virulence of the isolates and to changes in viral properties having an impact on the results of laboratory testing. Researching genetic modification of the viral genome provides important information about the changes in the nucleotide sequence of currently circulating strains and about the direction of EAV evolution. The purpose of the review is to present current data concerning molecular biology and diagnostics of equine arteritis virus infections.

Keywords: genetic variability, equine arteritis virus

Wirusowe zapalenie tętnic koni (equine viral arteritis – EVA) jest zakaźną chorobą układu oddechowego i rozrodczego koniowatych, szeroko rozpowszechnioną na całym świecie. Pierwsze opisy choroby znaleźć można w piśmiennictwie z przełomu XVIII-XIX wieku, gdzie jednostka ta określana była jako choroba różowego oka (pink-eye), epizootyczne zapalenie tkanki łącznej skóry (epizootic cellulites), influenza erysipelatosa, equine typhoid (fièvre typhoide du cheval), a w języku niemieckim jako Pferdestaupe i Rotlaufseuche. Czynnik etiologiczny wirusowego zapalenia tętnic koni rozpoznany został dopiero w latach 50. XX w. w USA, natomiast w Polsce został on wyizolowany po raz pierwszy w 1978 r. w jednej z dolnośląskich stadnin koni półkrwi angielskiej (5, 11, 12). Obecnie obowiązująca nazwa choroby pochodzi od zmian martwiczo-zapalnych występujących w błonie środkowej małych tętnic mięśniowych (6). Chorobę wywołuje wirus EAV (equine arteritis virus) należący do rodziny *Arteriviridae*, rzędu *Nidovirales*. W obrębie genomu wyróżnia się 9 otwartych ramek odczytu (ORFs) kodujących strukturalne, jak i niestrukturalne białka wirusowe.

Większość zakażeń EAV przebiega subklinicznie, niekiedy jednak może dojść do wystąpienia objawów klinicznych. U chorych zwierząt stwierdza się wówczas podwyższoną temperaturę (40-41,5°C), depresję, brak apetytu, zapalenie i surowiczy wysięk ze spojówek i nosa oraz obrzęki powiek, kończyn, podbrzusza, klatki piersiowej, moszny i napletka u ogierów, a wymienia u klaczy. U źrebiąt dochodzi do ostrego, czasem śmiertelnego zapalenia płuc, a u klaczy do resorpcji zarodków, poronień i jałowienia (9). Zakażenie szerzy się głównie drogą kropelkową przez układ oddechowy oraz drogą płciową. Ta ostatnia odgrywa najważniejszą rolę w rozprzestrzenianiu się EAV w populacji koni. Po zakażeniu ogierów u 30-60% ozdrowieńców dochodzi do ustanowienia zakażenia trwałego i siewstwa wirusa z nasieniem, które może się utrzymywać przez kilka następnych tygodni, miesięcy, a nawet lat (32). Aby ograniczyć rozprzestrzenianie się EAV opracowano programy profilaktyczne, których zasadniczym celem jest identyfikacja, a następnie wykluczenie z rozrodu ogierów siewców wirusa. Eliminacja ogierów trwale zakażonych, utrata sezonów rozrodczych przez klacze, poronienia oraz

padnięcia śmiertelne nowo narodzonych źrebiąt są przyczyną poważnych strat ekonomicznych w hodowli koni na całym świecie.

Wirus. Wirus zapalenia tętnic koni, wraz z wirusami: zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRSV), gorączki krwotocznej małp (SHFV) oraz wirusem podnoszącym poziom dehydrogenazy mleczanowej u myszy (LDV), został zaklasyfikowany do rodziny *Arteriviridae*, rząd *Nidovirales* (3). Podobieństwo sekwencji nukleotydowej RNA oraz procesów replikacji wirusów tej grupy wskazuje na ewolucyjne pokrewieństwo do koronawirusów. Wiriony EAV o średnicy 40-60 nm zawierają niesegmentowany, jednoniciowy RNA o dodatniej polarności, o długości około 12,7 tys. nukleotydów. Nić RNA od końca 5' ogranicza charakterystyczna metylowana struktura „cap", a na końcu 3' genomu znajduje się sekwencja poly(A) (10). Genom zamknięty jest w dwudziestościennym kapsydzie zbudowanym z białka nukleokapsydu (N), który otoczony jest lipidowo-proteinową otoczką. W otoczce scharakteryzowano sześć strukturalnych białek wirusowych. Dominującymi jej składnikami są: nieglikozylowane białko membranowe (M) oraz glikoproteina GP5 (określana wcześniej jako G_L). Białka te połączone mostkiem dwusiarczkowym tworzą heterodimer determinujący właściwości neutralizujące wirusa (27, 34). Ponadto w otoczce wirusa znajdują się glikoproteina GP_{2b} (wcześniej określana jako G_S), białka GP_3 i GP_4 tworzące wspólnie heterotrimer glikoprotein membranowych oraz nieglikozylowane białko otoczkowe E (35).

Cykl replikacyjny wirusa. EAV po wniknięciu do organizmu atakuje i namnaża się w komórkach makrofagów krwi, makrofagach i komórkach dendrytycznych węzłów chłonnych płucnych, komórkach nabłonkowych płuc, a także w nabłonku kanalików nerkowych i błonie środkowej naczyń krwionośnych oraz prawdopodobnie w komórkach dodatkowych gruczołów płciowych ogierów (18, 23). Pełny cykl replikacji wirusa zachodzi w cytoplazmie zakażonych komórek. Cząstki wirusa dostają się do wnętrza komórki na zasadzie endocytozy. W procesie tym cząstka wirusa łączy się z receptorami błony komórkowej, a następnie otaczana jest pęcherzykiem, wewnątrz którego wnika do światła komórki. Budowa oraz charakter komórkowych receptorów dla arterivirusów są słabo poznane. Niektórzy autorzy sugerują, że receptorem dla EAV na powierzchni komórek jest cząsteczka podobna do heparyny (25). Wykazano, że wirusy wiążą się z cząsteczkami heparyny *in vitro*, a traktowanie komórek heparynazą powoduje zahamowanie adhezji EAV.

Wewnątrz komórki wirusy opuszczają pęcherzyki endocytarne i przedostają się do przyjądrowej części cytoplazmy, gdzie zachodzi pełny cykl replikacyjny wirusa. Rozpoczyna go ekspresja genu kodującego replikazę EAV. Gen ten składa się z dwóch ramek odczytu ORF1a i 1b, które zajmują ¾ genomu od końca 5'. Produktem translacji tego genu są dwie poliproteiny – prekursory replikazy wirusowej, które następnie cięte są przez trzy wewnętrzne proteazy kodowane w fragmencie ORF1a na 12 białek niestrukturalnych (nsp). Kilka domen hydrofobowych w białkowym produkcie transkrypcji ORF1a prawdopodobnie odpowiada także za zakotwiczenie się wirusów w błonach śródplazmatycznych i tworzenie charakterystycznych pęcherzyków otoczonych podwójną błoną (DMVs) (22, 26, 29). Pęcherzyki takie są charakterystyczne dla replikacji arterivirusów i obserwowane są około 3-6 godz. po zakażeniu komórek, jednak ich pochodzenie oraz funkcja nie są wyjaśnione.

Pozostała część genomu wirusowego zawiera 7 stosunkowo mniejszych ramek odczytu (ORF-2a, 2b, 3-7) znajdujących się przy końcu 3' nici genomowego RNA. Ekspresja genów zachodzi z zestawu siedmiu subgenomowych łańcuchów mRNA (sgRNA) powstałych w procesie przypominającym rekombinację RNA, którym kierują krótkie sekwencje regulujące transkrypcję (TRS) na 3' i 5' końcu każdej ORF (21, 33). Subgenomowe łańcuchy mRNA mają wspólny koniec 3', ale także tą samą sekwencję wiodącą (leader sequence), z którą łączą się na drodze transkrypcji nieciągłej (28). Z wirusowego RNA o dodatniej polarności, po etapie transkrypcji na ujemne RNA, powstają fragmenty sg RNA, mające identyczną sekwencję z genomowym RNA. Produkcja sg RNA oraz ich translacja do białek strukturalnych jest cechą wspólną dla arteriwirusów i stanowi podstawę ich klasyfikacji do rzędu *Nidovirales*. W procesie transkrypcji sgRNA z kolejnych ORF2a-7 powstają odpowiednio cząsteczki białek strukturalnych wirusa: E (ORF2a), G2b, GP3, GP4, GP5, M i N (ORF7). Wirusy potomne otaczane są pęcherzykami gładkiej siateczki śródplazmatycznej i na drodze egzocytozy opuszczają komórkę zakażoną, powodując jej fragmentację i rozpad, co obserwowane jest w jednowarstwowych hodowlach komórkowych jako efekt cytopatyczny (CPE). Właściwość ta wykorzystywana jest do ilościowego określenia izolowanego wirusa w hodowli komórkowej w teście mianowania określającym $TCID_{50}$ oraz teście łysinkowym (20).

Zmienność genetyczna EAV. Mimo że istnieje tylko jeden serotyp EAV, izolaty terenowe różnią się wirulencją, patogennością i właściwościami neutralizującymi. Najbardziej konserwatywnymi regionami w genomie EAV są ORF6 i ORF7 kodujące odpowiednio białka M i N. Analizując filogenetyczne podobieństwo sekwencji tych genów, Chirnside i wsp. (4) wykazali jedynie niewielką zmienność w ich obrębie i pokrewieństwo na poziomie 99% pomiędzy szczepami terenowymi, jak i szczepem szczepionkowym. Największą zmiennością w genomie EAV odznacza się gen ORF5, w którego obrębie wielu autorów opisało liczne delecje i mutacje punktowe. Także dużym stopniem ewolucji charakteryzuje się gen replikazy ORF 1a kodujący potranslacyjne białko nsp2, część kom-

pleksu replikazy (1). W organizmie ogierów zakażonych trwale EAV wirus ulega ciągłym zmianom genetycznym. Hedges i wsp. określili, że EAV zmienia się w skali 1% substytucji nukleotydowej w nici o długości 2822 nukleotydów (ORF2-7) na rok, co prowadzi do powstawania wciąż nowych wariantów genotypowych i fenotypowych wirusa (14). W 1995 r. na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej najbardziej zmiennej wśród białek wirusowych glikoproteiny GP5 izolaty terenowe i szczepy laboratoryjne zostały podzielone na 4 grupy filogenetyczne, w których dwie stanowiły wirusy północnoamerykańskie (NA1 i NA2), a dwie kolejne – szczepy europejskie (E1 i E2) (2). Analizując sekwencję nukleotydową ORF5 polskich izolatów EAV Stadejek i wsp. (30) wykazali ich przynależność do grupy szczepów europejskich. Stwierdzili również, że w przypadkach, gdy pochodzenie geograficzne nie miało związku z podobieństwem genetycznym izolatów, konie, od których wirus był izolowany, transportowane były pomiędzy Europą a Ameryką Północną i na odwrót. Stwierdzono, że sekwencja genu G_L (G5) może służyć ocenie zmienności EAV, co pozwala na analizę dróg szerzenia się wirusa. Zmienność wirusa w obrębie genu ORF5 jest ważna, gdyż wpływa na zmianę właściwości neutralizujących wirusa (1). Larsen i wsp. (17) stwierdzili, że większość izolatów duńskich wykazywała pokrewieństwo do grupy szczepów europejskich, jednak były również takie, które wywodziły się z gałęzi szczepów północnoamerykańskich. Autorzy ci wysunęli zatem wniosek, iż podkreślanie związku zmienności EAV w populacji koni z pochodzeniem geograficznym może nie być słuszne, ze względu na intensywny, międzynarodowy obrót końmi. W badaniach tych stwierdzono także, że wirusy wyizolowane od poronionego płodu oraz koni z objawami klinicznymi były prawie identyczne jak krążące izolaty terenowe od bezobjawowych ogierów siewców, co wskazuje, że wirus siany przez subklinicznie zakażone ogiery może wywołać ostrą postać choroby u innych zwierząt.

Diagnostyka zakażeń EAV. Na podstawie objawów klinicznych można jedynie podejrzewać zakażenie wirusem zapalenia tętnic koni, a ostateczne rozpoznanie postawić można na podstawie wyników badań laboratoryjnych. W diagnostyce różnicowej należy wykluczyć zakażenia EHV1 i EHV-4, wirusem influenzy koni (EIV), adenowirusami, orbiwirusem afrykańskiego pomoru koni, wirusami Getah i Hendra czy paciorkowcami oraz zatrucia roślinami toksycznymi, takimi jak pyleniec pospolity (*Berteroa incana*).

Pierwszym etapem na drodze do identyfikacji koni zakażonych EAV jest badanie serologiczne. Ogiery serologicznie dodatnie bada się następnie na obecność wirusa w nasieniu w celu wykluczenia u nich nosicielstwa i siewstwa wirusa. Jeśli konieczne jest potwierdzenie zakażenia EAV u klaczy czy źrebiąt, można dokonać próby izolacji wirusa z wymazów z nosa i worka spojówkowego, a w przypadku poronień u klaczy – z tkanek poronionych płodów.

Wykrywanie przeciwciał dla EAV w surowicy. Do określania statusu immunologicznego koni najczęściej wykorzystywany jest test seroneutralizacji (SN), który wykrywa przeciwciała dla głównej determinanty neutralizującej wirusa – glikoproteiny GP5 (7). Test ten zalecany jest przez Międzynarodowy Urząd ds. Epizootii (OIE) do badania koni w obrocie międzynarodowym i wykonywany jest przy użyciu szczepu referencyjnego Bucyrus EAV w hodowli komórek RK-13 (31). Zasada testu SN polega na reakcji zobojętnienia wirusa przez swoiste przeciwciała w obecności dopełniacza i zniesienia jego właściwości patogennych. W hodowli komórkowej nie obserwuje się wtedy efektu cytopatycznego powodowanego przez EAV. Surowica uznawana jest za dodatnią, jeżeli w rozcieńczeniu 1 : 4 lub wyższym brak jest CPE.

Inne metody serologiczne, takie jak immunodyfuzja w żelu agarozowym, odczyn wiązana dopełniacza czy ELISA wykorzystująca jako antygeny całe wiriony lub rekombinowane białka wirusowe GP5, M i N, nie znalazły szerszego zastosowania w diagnostyce EAV (8, 13).

Identyfikacja ogierów trwale zakażonych wirusem. Ogiery przed sezonem rozrodczym powinny być badane w kierunku EAV. Ponieważ osobniki serododatnie siejące wirus z nasieniem stanowią główny rezerwuar zarazka, w diagnostyce kładzie się nacisk na identyfikację ogierów nosicieli wirusa. Na siewstwo wirusa z nasieniem znaczący wpływ ma poziom testosteronu u zwierzęcia (19). Stwierdzono, że androgeny mogą obniżać odporność organizmu, a tym samym ułatwiać namnażanie się wirusa w komórkach dodatkowych gruczołów płciowych. Identyfikacja ogierów siewców wirusa oparta jest na próbie izolacji EAV z nasienia w hodowli komórkowej (test zalecany przez OIE). Na zakażenie EAV *in vitro* wrażliwe są komórki pierwotnych hodowli makrofagów wywodzące się z nerek, płuc oraz jajnika. Najczęściej wykorzystywane do izolacji wirusa są linie komórkowe nerki królika (RK 13), nerki nowo narodzonych chomików syryjskich (BHK 21) oraz afrykańskiej małpy zielonej (Vero) (15, 16).

Tożsamość izolatów EAV można potwierdzić za pomocą przeciwciał specyficznych dla wirusa w teście immunoperoksydazowym lub immunofluorescencyjnym. Alternatywne metody identyfikacji EAV opierają się na wykrywaniu materiału genetycznego wirusa w badanej próbce. W diagnostyce stosowane są RT-PCR i nested PCR zwiększający wielokrotnie czułość wykrywania wirusa, a także najnowsza technika amplifikacji kwasu nukleinowego w czasie rzeczywistym – real time PCR (24). Zaletami metod PCR są: ich wysoka czułość i krótki czas badania. Stan badanej próbki oraz warunki jej transportu nie mają wpływu na wynik testu. Dodatkowo produkty PCR mogą być wykorzystane do analizy sekwencji kwasu nukleinowego, a następnie do określenia pokrewieństwa filogenetycznego izolatów, co jest podstawą do poznania rozprzestrzenienia EAV w populacji koni.

Mimo że większość zakażeń EAV przebiega subklinicznie to obecność wirusa potwierdzona jest w populacji tych zwierząt na całym świecie. Od pierwszych przypadków zachorowań na EVA w 1953 r. w Ohio stwierdzono także epizootie, między innymi, w Kanadzie, Szwecji, Austrii, Włoszech, Polsce, Szwajcarii, Holandii, Wielkiej Brytanii i Węgrzech. Przebieg subkliniczny choroby utrudnia identyfikację zakażonych zwierząt, a co za tym idzie – również eliminację EAV z populacji koni. Kluczową rolę w rozpoznaniu EAV odgrywa diagnostyka laboratoryjna, której podstawą są właściwości molekularne wirusa. Zmienność genetyczna może prowadzić do wzrostu zjadliwości izolatów oraz do różnic we właściwościach EAV, wpływając na wynik badań laboratoryjnych, co może utrudnić rozpoznanie choroby. Badanie modyfikacji genetycznych wirusowego genomu, a także pokrewieństwa filogenetycznego izolatów ułatwia właściwą diagnostykę, daje ważne informacje na temat rozprzestrzenienia się zakażeń EAV wśród koni oraz pozwala śledzić kierunki ewolucji wirusa.

Piśmiennictwo

1. *Balasuriya U. B., Hedges J. F., Smalley V. L., Navarrette A., McCollum W. J., Timoney P. J., Snijder E. J., MacLachlan N. J.*: Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. J. Gen Virol. 2004, 85, 379-390.
2. *Balasuriya U. B., 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.
3. *Cavanagh D.*: Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch. Virol. 1997, 142, 629-633.
4. *Chirnside E. D., Wearing C. M., Binns M. M., Mumford J. A.*: Comparison of M and N gene sequences. J. Gen. Virol. 1994, 75, 1491-1497.
5. *Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.*: The outbreak of abortion caused by equine arteritis virus. Cornell Vet. 1957, 47, 69-75.
6. *Ester P. C., Cheville N. F.*: The ultrastructure of vascular lesions in equine viral arteritis. Am. J. Pathol. 1970, 58, 236-237.
7. *Fukunaga Y., Matsumura T., Sugiura T., Wada R., Imagawa H., Kanemaru T., Kamada M.*: Use of the serum nautralization test for equine viral arteritis with different virus strains. Vet. Rec. 1994, 134, 574-576.
8. *Fukunaga Y., McCollum W. H.*: Complement-fixation reactions in equine viral arteritis. Am. J. Vet. Res. 1977, 38, 2043-2046.
9. *Glaser A. L., de Vries A. A., Rottier P. J., Horzinek M. C., Colenbrander B.*: Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. Vet. Q. 1996, 18, 95-99.
10. *Godeny E. K., de Vries A. A., Wang X. C., Smith S. L., de Groot R. J.*: Identification of the leader-body junctions for the viral subgenomic mRNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: evidence for gene duplication during arterivirus evolution. J. Virol. 1998, 72, 862-867.
11. *Golnik W., Michalak T.*: Przypadki wirusowego zapalenia tętnic koni (arteritis equorum) w Polsce (doniesienie wstępne). Medycyna Wet. 1979, 35, 605.
12. *Golnik W., Paweska J.*: Występowanie zakażeń wirusem zapalenia tętnic u koni z różnych stadnin. Medycyna Wet. 1991, 47, 505-506.
13. *Hedges J. F., Balasuriya U. B. R., Ahmad S., Timoney P. J., McCollum W. H., Yilma T., MacLachlan N. J.*: Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linker immunosorbant assays using GL, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. J. Virol. Methods 1998, 76, 127-134.
14. *Hedges J. F., Balasuriya U. B., Timoney P. J., McCollum W. H., McLachlan N. J.*: Genetic divergence with emergence of novel phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. J. Virol. 1999, 73, 3672-3681.
15. *Hyllseth B.*: A plaque assay of equine arteritis virus in BHK-21 cells. Arch. Gesamte Virusforsch. 1969, 28, 26-33.
16. *Inoue T., Yanagawa R., Shinagawa M., Akiyama Y.*: Immunofluorescent studies on the multiplication of equine arteritis virus in Vero and E. Derm (NBL-6) cells. Nippon Juigaku Zasshi. 1975, 37, 569-575.
17. *Larsen L. E., Storgaard T., Holm E.*: Phylogenetic characterisation of the GL sequences of equine arteritis virus isolated from semen of asymptomatic stallion and fatal cases of equine viral arteritis in Denmark. Vet. Microbiol. 2001, 80, 339-346.
18. *Lopez J. W., del Piero F., Glaser A., Finazzi M.*: Immunoperoxidase histochemistry and a diagnostic tool for detection of equine arteritis virus antigen in formalin-fixed tissues. Equine Vet. J. 1996, 28, 77-79.
19. *McCollum W. H., Little T. V., Timoney P. J., Swerczek T. W.*: Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus. J. Comp. Patol. 1994, 111, 383-388.
20. *Moore B. D., Balasuriya U. B., Nurton J. P., McCollum W. H., Timoney P. J., Guthrie A. J., MacLachlan N. J.*: Differentiation of strains of equine arteritis virus of differing virulence to horses by growth in equine endothelial cells. Am. J. Vet. Res. 2003, 64, 779-784.
21. *Pasternak A. O., Spaan W. J. M., Snijder E. J.*: Regulation of relative abundance of arteritis subgenomic mRNAs. J. Virol. 2004, 78, 8102-8113.
22. *Pedersen K. W., van der Meer Y., Roos N., Snijder E. J.*: Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. J. Virol. 1999, 73, 2016-2026.
23. *Piero F. del*: Equine arteritis virus. Vet. Patol. 2000, 37, 287-296.
24. *Rola J., Larska M., Żmudziński J. F.*: Wprowadzenie testu RT-PCR do wykrywania obecności wirusa zapalenia tętnic koni w nasieniu ogierów. Medycyna Wet. 2004, 60, 289-291.
25. *Sano Y., Inaba Y., Uwatoko K., Kubota T., Asagoe T., Kanaya J., Pan I. J., Akashi H., Fukunaga Y.*: Effect of heparin on hemagglutination by equine arteritis virus. J. Vet. Med. Sci. 1998, 60, 447-450.
26. *Snijder E. J.*: Arterivirus RNA Synthesis Dissected, [w:] Lavi E., Weiss S., Hingley S. (red.): The Nidoviruses (Coronaviruses and Arteriviruses). Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 494, Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York 2001, 241-253.
27. *Snijder E. J., Dobbe J. C., Spaan W. J. M.*: Heterodimerization of two major envelope proteins is essencial for arterivirus infectivity. J. Virol. 2003, 77, 97-104.
28. *Snijder E. J., Meulenberg J. M.*: The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol. 1998, 79, 961-979.
29. *Snijder E. J., van Tol H., Roos N., Pedersen K. W.*: Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. J. Gen. Virol. 2001, 82, 985-994.
30. *Stadejek T., Bjorklund H., Bascunana C. R., Ciabatti I. M., Scicluna M. T., Amaddeo D., McCollum W. H., Autorino G. L., Timoney P. J., Paton D. J., Klingeborn B., Belak S.*: Genetic diversity of equine arteritis virus. J. Gen. Virol. 1999, 80, 691-699.
31. *Timoney P. J.*: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Equine arteritis virus. Paryż 2004, rozdz. 2.5.10, 725-736.
32. *Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., Murphy T. W.*: Demonstration of the carrier state of naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. Res. Vet. Sci. 1986, 41, 279-280.
33. *Vries A. A. de, Chirnside E. D., Bredenbeek P. J., Gravestein L. A., Horzinek M. C., Spaan W. J.*: All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 3241-3247.
34. *Vries A. A. de, Post S. M., Raasman M. J. B., Horzinek M. C., Rottier P. J. M.*: Two major envelope proteins of Equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. J. Virol. 1995, 69, 4668-4674.
35. *Wieringa R., de Vries A. A. F., Rottier P. J. M.*: Formation of disulfide-linked complexes between the three minor envelope glycoproteins (GP_{2b}, GP_3, and GP_4) of equine arteritis virus. J. Virol. 2003, 77, 6216-6226.

Adres autora: lek. wet. Magdalena Larska, ul. Zielona 5, 24-100 Puławy; e-mail: m.larska@piwet.pulawy.pl