

program szczepień ochronnych na fermach drobiu. Od 3 miesięcy, licząc od maja 1993 r. choroba w Holandii nie jest notowana. ND stwierdzono w państwowej fermie (20 000 ptaków) w Uzbekistanie.

W latach 1992 i 1993 liczne kraje europejskie (m.in. Niemcy, Francja, Austria, Węgry), które prowadzą dostne szczepienia lisów przeciw wścieklicznie, co najmniej raz w ciągu roku wykonały tę akcję na całym obszarze stref zakażonych.

W Meksyku zanotowano ponownie pojawienie się larwy określonej jako screwworm (robak korkociągowy).

Po 22 latach zwalczania gruźlicy bydła Australia oświadczyła, że od 31 grudnia 1992 r. należy ją uznać za kraj wolny od tej choroby.

W 1992 r. stwierdzono ponad 35 000 przypadków gąbczastej encefalopatii bydła (bovine spongiform encephalopathy – BSE) w Wielkiej Brytanii; w Irlandii zanotowano 18, a w Szwajcarii 15 zachorowań. W Wielkiej Brytanii w porównaniu do 1991 r. stwierdza się w latach 1992-1993 spadek liczby zachorowań, zwłaszcza u zwierząt urodzonych po dacie, kiedy wprowadzono zakaz karmienia bydła paszami zawierającymi białko pochodzące od przeżuwaczy. Jak dotąd nie wykazano, by transmisja wirusa następowała bezpośrednio od matki na potomstwo.

W czerwcu 1992 r. Meksyk zgłosił uwolnienie się od wenezuelskiego zapalenia mózgu i rdzenia u koni.

Do państw, na terenie których stwierdzono rozrodzco-oddechowy zespół chorobowy świń (PRRS), dołączyła Dania i Malta. Jednak restrykcje nałożone przez EWG, dotyczące tej choroby, zostały anulowane, gdyż nie uważa się

jej za typową chorobę zaraźliwą, a raczej schorzenie produkcyjne o etiologii wirusowej. Nie są zatem, zdaniem EWG, uzasadnione daleko idące ograniczenia w obrocie zwierzętami.

Wielka Brytania informowała o wystąpieniu krwiotocznej choroby wirusowej królików; pierwsze ognisko stwierdzono w kwietniu 1992 r. Podobną informację, odnoszącą się do jej terenu, przekazała Libia. Omawiana jednostka chorobowa została zlikwidowana w Meksyku po wybiceniu 121 000 królików.

Na Cyprze występowała bruceloza u małych przeżuwaczy. Warrozę zanotowano po raz pierwszy w Chile, na Malcie, w Meksyku i Wielkiej Brytanii.

Reasumując, z przedstawionej charakterystyki sytuacji epizootologicznej wynika, że choroby zaraźliwe nadal stanowią poważne zagrożenie dla produkcji zwierzęcej, powodują znaczne straty bezpośrednie i oprócz tego są czynnikiem obniżającym zyski w związku z restrykcjami w obrocie zwierząt. Szczególne znaczenie nadal mają pryszczycza i klasyczny pomór świń. Dotyczy to również kontynentu europejskiego. Biorąc to pod uwagę – uzasadnione jest utrzymywanie możliwie wysokiej sprawności państwowej służby weterynaryjnej. Niezbędne jest też łożenie znacznych kwot na unowocześnienie działalności naukowej i usługowej wydziałów weterynaryjnych wyższych uczelni, Instytutu Weterynarii i zakładów higieny weterynaryjnej.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Truszczyński, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

ANDRZEJ LIPOWSKI, GRAŻYNA KOCHAN*, ZYGMUNT PEJSAK, BOGUSŁAW SZEWCZYK*

Opracowanie biotynylowanej sondy genetycznej wirusa choroby Aujeszkyego^{*)}

Zakład Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Katedra Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Summary

Construction of a biotinylated genetic probe of Aujeszky's disease virus (ADV)

A simple and quick method of viral DNA purification from RK 13 infected with NIA-3 strain of ADV cell culture yielded DNA which was easily digested with its enzyme restriction. Moreover, it was of a sufficient purity for a restriction pattern (RFP) analysis. The purified DNA was labelled with photobiotin to obtain a biotinylated genetic probe. The full length DNA probe that was developed was found to be very sensitive and specific when it was used for hybridization with ADV DNA. Furthermore, the forenamed biotinylated probe greatly enhanced the detection limits of restriction fragments compared to RFP analysis in ethidium bromide stained agarose gel. These results indicate that the described probe can be used for analysis and characterization of ADV genomes even if only minute amounts of viral DNA are available.

^{*)}Praca została wykonana w ramach realizacji projektu PL-ARS-155, we współpracy z National Animal Disease Center, Ames Iowa, USA, finansowanego przez II Polsko-Amerykański Wspólny Fundusz im. M. Skłodowskiej-Curie.

Choroba Aujeszkyego (chA) wywoływana jest przez typowego przedstawiciela rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae*, rodzaju *Varicellovirus* – *Herpesvirus suis* 1 (3). W epidemiologii chA największe znaczenie ma trzoda chlewna. Zwierzęta tego gatunku ulegają bowiem zakażeniu niezależnie od wieku i statusu immunologicznego, a występujące jednocześnie zjawisko latencji powoduje, że świnie, stając się dożywotnimi nośicielami i siewcami wirusa, są jego jedynym rezerwuarem (17, 23, 24, 25, 30, 31).

Gwałtowny wzrost liczby ognisk chA w początkach lat 70. (26) wymusił niejako intensyfikację badań nad chorobą oraz nad samym wirusem choroby Aujeszkyego (Aujeszky's Disease Virus – ADV).

Jedną z podstawowych technik w tym zakresie jest, oparta na wykorzystaniu endonukleaz (enzymów restrykcyjnych, restryktaz), analiza restrykcyjna DNA wirusa (7, 12, 13, 19, 20). Zastosowana w celach diagnostycznych, umożliwiła m.in. odróżnienie szczepów szczepionkowych ADV od dzikich, terenowych. Wykazano również

istnienie różnic w budowie genomu tak wśród szczepów stosowanych do uodporniania zwierząt, jak i wśród szczepów terenowych (4, 5, 7, 8, 10, 13, 19, 27, 28).

Czułość analizy restrykcyjnej zwiększono znacznie poprzez wykorzystanie hybrydyzacji kwasów nukleinowych (7, 12, 21). Technika ta jest w tej chwili nieodzowna w biologii molekularnej przy wykrywaniu specyficznych, komplementarnych sekwencji kwasów nukleinowych. Stosowane w tych badaniach sondy genetyczne znakowane izotopami (tzw. "gorące") ustępują coraz częściej miejsca sondom nieradioaktywnym (tzw. "zimnym") ze względu na ich stabilność i bezpieczeństwo. Wśród nich rosnącym zainteresowaniem cieszą się ostatnio sondy znakowane biotyną (12, 14, 16, 18, 29).

Celem prezentowanej pracy było opracowanie biotynolowanej sondy genetycznej przydatnej w wykrywaniu DNA wirusa choroby Aujeszkyego.

Materiał i metody

Oczyszczanie wirusowego DNA. Użyty do badań referencyjny, zjadliwy szczep NIA-3^{**}) wirusa chA namnażano w komórkach linii ciągłej nerki królika RK 13 metodą hodowli rotacyjnej. Zbiór wymienionego szczepu dokonywano po 36-48 godzinach inkubacji, przy efekcie cytopatycznym obejmującym 85-95% zakażonej tkanki. Źródło wirusa stanowiły komórki, które wstępnie odwirowywano przez 15 minut przy 5000 obr./min. w temperaturze 4°C. Po odlaniu płynu hodowlanego osadzone komórki zawieszano w 1 ml buforu lizującego (50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 15mM NaCl, 0,5% Nonidet Np-40). Po 10 min. inkubacji w 37°C resztki komórkowe usuwano poprzez krótkie wirowanie (5 min., 15 000 obr./min.) w wirówce Eppendorf. Supernatant, zawierający wirus, przenoszono do nowej probówki, a peletkę resztek komórkowych poddawano lizie po raz drugi, w uprzednio podanych warunkach. Po zakończeniu inkubacji i ponownym wirowaniu zbierano supernatant i mieszało z uzyskanym w pierwszej reakcji. Zawarte w otrzymanej zawieszynie cząstki wirusowe DNA i RNA pochodzenia komórkowego usuwano poprzez inkubację z DNazą i RNazą (100 µg/ml) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Oczyszczony wirusowy DNA uzyskano drogą 2 kolejnych ekstrakcji przy użyciu mieszanki fenol-chloroform (1:1). Resztki fenolu usuwano mieszaniną chloroform-alkohol izoamylowy (24:1). Następnie DNA precypitowano dodając 2 objętości etanolu do próbki zawierającej 1/10 objętości 2M octanu sodu i przetrzymując ją w -20°C przez noc lub w -70°C przez 30 min. Wytracone DNA osadzono przez wirowanie w ciągu 15 min. przy 15 000 obr./min. w 4°C, po czym 2-krotnie przemywano 70% etanolem. W końcu, po bardzo dokładnym zebraniu resztek alkoholu, oczyszczony w ten sposób DNA szczepu NIA-3 zawieszano w małej objętości buforu TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA).

W przypadkach, kiedy wymagana była duża ilość DNA, po odwirowaniu komórek, zbierano supernatant, wirus osadzano przez wirowanie (28 000 obr./min., 90 min., 4°C), a następnie oczyszczano w gradiencie sacharozy (30%, warunki wirowania j.w.). Kolejne, dalsze etapy pracy zgodne były z opisanymi poprzednio.

Czystość i stężenie uzyskanego DNA ADV określano metodą elektroforezy agarozowej wobec markera, którym był DNA faga λ trawionego restryktazą HindIII, o znanym stężeniu. W tym celu wirusowy DNA szczepu NIA-3 trawiono przez 1-3 godzin w temperaturze 37°C sześci-

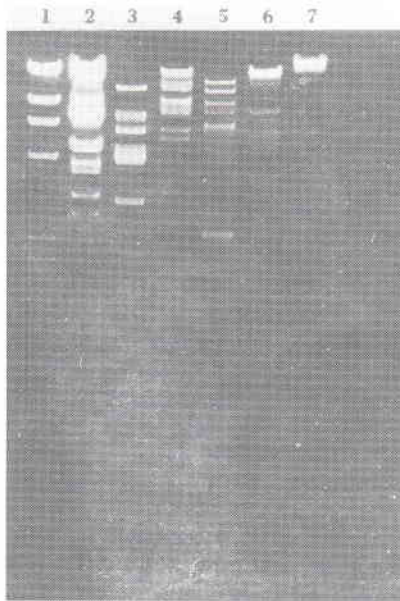
ma różnymi endonukleazami (15). Po zakończeniu tej reakcji wykonywano elektroforezę w 0,6% żelu agarozowym, stosując bufor TAE (40mM Tris, 20mM kwas octowy lodowaty, 1mM EDTA pH 8,0), a następnie przeprowadzano barwienie bromkiem etydyny.

Przygotowanie biotynolowanej sondy genetycznej. Użytkany wirusowy DNA, w ilości ok. 10 µg, poddawano wstępnie trawieniu enzymem restrykcyjnym PstI (w celu otrzymania fragmentów o małej masie cząsteczkowej), po czym precypitowano etanolem. Następnie DNA zawieszano w 0,1M EDTA (końcowa koncentracja 0,2-1,0 µg/µl) i mieszało z równą objętością wodnego roztworu fotobiotyny (1 µg/µl). Mieszaninę umieszczano w łaźni lodowej i naświetlano 20 min. zwykłą żarówką (500 W) umiejscowioną ok. 15-20 cm od otworu probówki. Następnie do probówki dodawano Tris-HCl pH 9,0 do końcowej koncentracji 50mM, po czym, w celu usunięcia nadmiaru fotobiotyny, całość ekstrahowano dwukrotnie nasyconym, wodnym roztworem butanolu. Zawarte w fazie wodnej DNA, znakowane biotyną, precypitowano dwoma objętościami etanolu i pozostawiano w -20°C przez noc. Uzyskany precypitat przemywano w końcu dwukrotnie 70% etanolem i zawieszano w buforze TE.

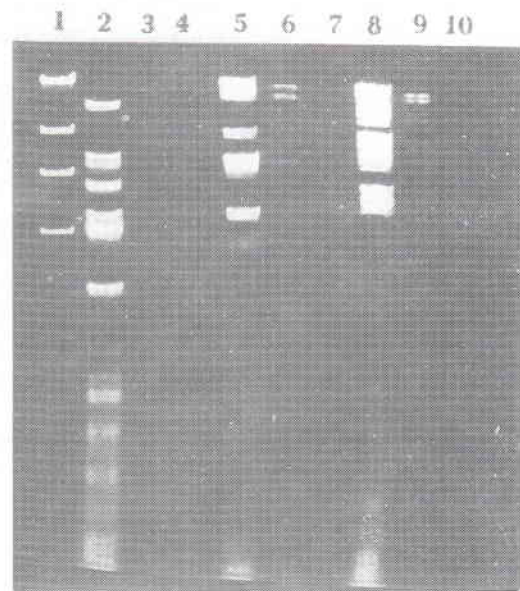
Sprawdzenie czułości wykrywania biotynolowanego DNA metodą dot blot. W tym celu przygotowywano w buforze TE kolejne, 10-krotnie wzrastające, rozcieńczenia (10^0 - 10^{-6}) uzyskanej sondy, które nanoszono następnie, w objętości po 1 µl każde, na błonę nitrocelulozową (Schleicher-Schuell, BAS 85, 0,45 µm). Po jej zapieczeniu w temperaturze 60°C przez noc (18 godz.), zanurzano ją w buforze TBS (50mM Tris-HCl pH 7,0, 0,5M NaCl), po czym przenoszono do roztworu blokującego (bufor TBS, 1% albuminy surowicy bydlęcej) na 1 godzinę. Po tym czasie nitrocelulozę umieszczano w roztworze koniugatu (streptawidyna-alkaliczna fosfataza) i inkubowano przez 30 minut. Nadmiar koniugatu usuwano przez 3-krotne płukanie w buforze TBS. W celu uwidocznienia reakcji błonę nitrocelulozową zanurzano w roztworze substratu (NBT/BCIP w 100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl). Po 10-30 minutach inkubacji nitrocelulozę przenoszono na 30 min. do wody, po czym suszono.

Hybrydyzacja. Oczyszczony DNA wirusowy ze szczepu NIA-3 podzielono na trzy części i każdą z nich oddzielnie trawiono enzymami restrykcyjnymi, odpowiednio: PstI, BamHI i KpnI. Po zakończeniu reakcji wykonywano rozcieńczenia wymienionych próbek tak, aby zawierały 1 µg, 0,1 µg i 0,01 µg DNA, a następnie poddawano elektroforezie w 0,6% żelu agarozowym, stosując bufor TAE. Po jej zakończeniu żel barwiono bromkiem etydyny i fotografowano w świetle UV. Następnie przenoszono DNA z agarozy na błonę nitrocelulozową metodą Southerna (15). Po wykonaniu repliki, nitrocelulozę zapiekano w temperaturze 60°C przez noc, po czym nasączano w roztworze 6XSSC (20XSSC - 3M NaCl, 0,3M cytrynian sodu, pH 7,0). Kolejnym etapem było umieszczenie błony w woreczku plastikowym, do którego wprowadzano roztwór prehybrydyzacyjny (50% dejonizowanego formamidu, 5XSSC, 5x roztwór Denhardta, 50mM fosforan sodu pH 6,5, 250 µg/ml zdenaturowanego DNA spermy łososia). Po zgrzaniu woreczka prowadzono prehybrydyzację w 42°C przez 12 godzin delikatnie mieszając. Po zakończeniu tego procesu usuwano wym. roztwór i do woreczka wprowadzano roztwór hybrydyzacyjny o składzie: 50% dejonizowanego formamidu, 5XSSC, 1x roztwór Denhardta, 20mM fosforan sodu pH 6,5, 10% siarczan deksoranu, 5 mM EDTA, 50 µg/ml zdenaturowanego DNA spermy łososia i zawierający co najmniej 200 ng/ml biotynolowanej sondy, uzyskanej w poprzednim etapie pracy. Hybrydyzację prowadzono w tych samych warunkach i przez ten sam okres czasu, jak prehybryzację. Po za-

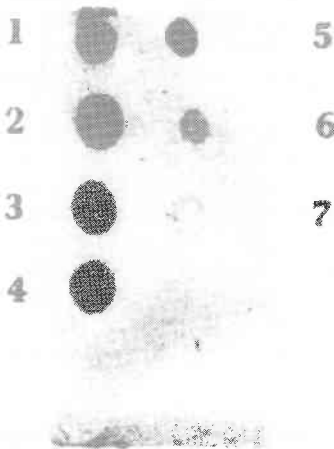
^{**})Szczep NIA-3 otrzymano od dr J.T. van Oirschot'a z Central Veterinary Institute, Lelystad, Holandia



Ryc. 1. Elektroforetyczny profil fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA szczepu NIA-3 wirusa chA. Ścieżka 1 – marker: DNA faga λ trawiony HindIII; ścieżki 2 – 7 wirusowy DNA trawiony kolejno: BamHI, PstI, KpnI, Sall, PvuII, HindIII



Ryc. 3. Elektroforetyczny profil fragmentów restrykcyjnych różnych ilości genomowego DNA szczepu NIA-3 wirusa chA. Ścieżka 1 – marker: DNA faga λ trawiony HindIII; ścieżki 2, 3, 4 DNA wirusowy trawiony PstI; ścieżki 5, 6, 7 – BamHI; ścieżki 8, 9, 10 – KpnI

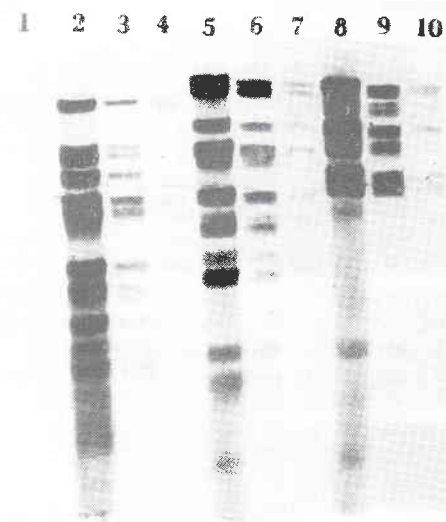


Ryc. 2. Analiza metodą dot blot czułości wykrywania biotynylowanego DNA. Dotsy od 1 do 7 przedstawiają kolejne rozcieńczenia ($10^0 - 10^{-6}$) biotynylowanego DNA. Dot nr 1 odpowiada $1 \mu\text{g}$ DNA

kończeniu hybrydizacji odplukiwano z nitrocelulozy nadmiar sondy, stosując kolejno: 1-krotnie roztwór 2XSSC z 0,1% SDS (15 min. w temperaturze pokojowej), 3-krotnie roztwór 0,1XSSC z 0,1% SDS (po 20 min. w temperaturze 65°C), 1-krotnie bufor TBS (15 min. w temperaturze pokojowej). Następnie przenoszono błonę do buforu blokującego, inkubując przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. Dalsze etapy wykrywania produktów hybrydizacji były identyczne, jak opisano przy sprawdzaniu czułości wykrywania biotynylowanego DNA.

Wyniki i omówienie

Oczyszczanie wirusowego DNA. Opracowana we własnym zakresie szybka metoda uzyskiwania wirusowego DNA opierała się na wykorzystaniu zakażonych szczepem NIA-3 komórek linii ciągłej nerki królika RK 13. Przedstawiona oryginalna metodyka pozwalała na otrzymanie kwasu nukleinowego o odpowiedniej czystości i koncentracji. Na ryc. 1 przedstawiono profil elektroforetyczny fragmentów całego, tj. pełnej długości DNA, uzy-



Ryc. 4. Replika profilu elektroforetycznego z ryc. 3 wykonana na nitrocelulozie i poddana następnie hybrydizacji z biotynylowaną sondą. Opis ścieżek – tak jak na ryc. 3

skanych w wyniku trawienia enzymami, odpowiednio: BamHI, PstI, KpnI, Sall, PvuII i HindIII. Brak plam (ang. smear) oraz ostre prążki są wskazówką dużej czystości otrzymanego DNA i jego znacznej koncentracji.

Przygotowanie biotynylowanej sondy genetycznej oraz sprawdzenie czułości wykrywania biotynylowanego DNA.

W prezentowanych badaniach własnych do znakowania genomowego DNA szczepu NIA-3 używano fotobiotyny. Związek ten łączy się z kwasem nukleinowym pod wpływem kilkunastominutowego naświetlania silnym promieniem światła widzialnego, dając w efekcie biotynylowany kwas nukleinowy. Reakcja ta, opisana po raz pierwszy przez Forstera i wsp. (6), jest więc prosta, szybka i nie wymaga specjalnego wyposażenia. Wymienione zalety opisaney metody miały decydujący wpływ na jej wykorzystanie w niniejszych badaniach. Otrzymany w ich wyniku produkt badano w celu określenia, jaką najmniejszą ilość biotynylowanego DNA sondy można wykryć. Jak wyka-

zuje to ryc. 2, nawet w przypadku rozcieńczenia 10^6 sonda jest wykrywalna. Ponieważ w punkcie nr 1 naniesiono $1 \mu\text{g}$ DNA, to można stwierdzić, iż czułość metody z zastosowaniem biotynylowanego DNA wynosi 10-100 pg. Ta wysoka wartość jest porównywalna do uzyskiwanych przez sondy znakowane radioaktywnym fosforem (1, 2, 14, 16, 29).

Zastosowanie uzyskanej biotynylowanej sondy genetycznej w hybrydyzacji DNA. Na ryc. 3 przedstawiono rozkład elektroforetyczny genomowego DNA szczepu NIA-3 wirusa chA, trawionego trzema różnymi enzymami, w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Rycina 4 obrazuje wykonaną na błonie nitrocelulozowej replikę tego rozdziału po wykonaniu hybrydyzacji z przygotowaną uprzednio biotynylowaną sondą. Porównanie ryc. 3 z ryc. 4 wyraźnie wskazuje, że hybrydyzacja z opracowaną sondą, pozwalająca na jednoznaczny analizę DNA wirusa chA, winna być metodą z wyboru w sytuacjach, kiedy ilość wirusowego DNA jest ograniczona. Uzyskany rezultat dowodzi jednak przede wszystkim, że przygotowana w oparciu o genomowy DNA ADV, sonda biotynylowana jest wysoce czuła oraz specyficzna, co potwierdzono brakiem jej hybrydyzacji do DNA faga λ (ryc. 4, ścieżka 1). Ponadto sonda tego rodzaju, ze względu na swą stabilność i bezpieczeństwo stosowania, może być używana wielokrotnie przez długi okres czasu. Z badań własnych wynika, że w ciągu co najmniej 1 roku nie straciła ona swej aktywności, czułości i specyficzności. Podobne spostrzeżenia zawarte są również w pracach Knowlesa i Gorhama (12) oraz Maesa i wsp. (14).

Wymienione cechy sond biotynylowanych są przyczyną coraz powszechniejszego ich stosowania. Stanowią one jedną z odmian dużej grupy sond "zimnych", których opis i zakres stosowania przedstawiono w pracach przeglądowych Norvala i Bingham (16) oraz Wilcheka i Bayera (29). Z kolei Knowles i Gorham (12) oraz Paul (18) przytaczają możliwości wykorzystania sond "zimnych" w badaniach nad chorobami zakaźnymi zwierząt, w tym również i nad chorobą Aujeszkyego. Jednymi z pierwszych prac z tego zakresu były próby zastosowania sond biotynylowanych do rozpoznawania chA. Opracowane w ich wyniku szybkie metody diagnostyczne polegały na wykrywaniu wirusowego DNA w komórkach uzyskanych z wymazów z nosa lub migdałków (2), względnie – metodą hybrydyzacji *in situ* – w skrawkach parafinowanych narządów wewnętrznych zwierząt podejrzanych o zakażenie ADV (1). Sondy omawianego typu pozwoliły również na śledzenie morfogenezy i szerzenia się zakażenia trzema różnymi szczepami ADV w eksplantatach śluzówki nosa świń (22). Ostatnio sondy biotynylowane zostały wykorzystane także w analizie restrykcyjnej DNA ADV (9, 11). Badania te wykazały, że zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* dochodzi do rekombinacji między dwoma różnymi, użytymi do jednoczesnego zakażenia, szczepami wirusa chA. Zastosowanie sond biotynylowanych pozwoliło na stwierdzenie, że powstałe w wyniku rekombinacji wirusowe cząstki potomne posiadają częściowo cechy rodzicielskie (np. delecje pewnych genów) oraz odtworzone cechy zjadliwości (9, 11). Wyniki te mają ogromne znaczenie zwłaszcza w odniesieniu do stosowanych obecnie programów zwalczania chA z wykorzystaniem szczepionek delecyjnych.

Wnioski

1. Opracowana szybka metoda otrzymywania DNA ADV z zakażonych komórek RK 13 pozwala na uzyskiwanie kwasu nukleinowego o znacznej czystości i koncentracji.
2. Zastosowanie fotobiotyny do znakowania DNA ADV umożliwia uzyskanie w prosty i szybki sposób, czulej i specyficznej sondy biotynylowanej.
3. Opracowana sonda biotynylowana może być użyta do analizy restrykcyjnej genomowego DNA różnych szczepów ADV metodą hybrydyzacji.

Piśmiennictwo

1. Belak K., Funa K., Kelly R., Belak S.: J. Vet. Med. B 36, 10, 1989.
2. Belak S., Rockborn G., Wierup M., Belak K., Berg M., Linne T.: J. Vet. Med. B 34, 519, 1987.
3. Brown F.: Intervirology 30, 181, 1989.
4. Christensen L.S.: Arch. Virol. 102, 39, 1988.
5. Christensen L.S., Soerensen K.J., Lei J.C.: Arch. Virol. 97, 215, 1987.
6. Forster A.C., McInnes J.L., Skingle D.C., Symons R.H.: Nucleic Acid Res. 13, 745, 1985.
7. Gielkens A.L.J., Berns A.J.M.: Differentiation of Aujeszky's disease virus strains by restriction endonuclease analysis of the viral DNA's, w: Aujeszky's Disease, red. G. Wittmann, S.A. Hall, Martinus Nijhoff Publ., The Hague, 1982.
8. Gielkens A.L.J., van Oirschot J.T., Berns A.J.M.: J. gen. Virol. 66, 69, 1985.
9. Henderson L.M., Katz J.B., Erickson G.A., Mayfield J.E.: Am. J. vet. Res. 51, 1656, 1990.
10. Jestin A., Blanchard P., Garbar-Chenon A., Vannier P., Nicolas J.C.: Arch. Virol. 112, 149, 1990.
11. Katz J.B., Henderson L.M., Erickson G.A.: Vaccine 8, 286, 1990.
12. Knowles D.R., Jr., Gorham J.R.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 9, 733, 1990.
13. Ludwig H., Heppner B., Herrmann S.: The genomes of different field isolates of Aujeszky's disease virus, w: Aujeszky's Disease, red. G. Wittmann, S.A. Hall, Martinus Nijhoff Publ., The Hague, 1982.
14. Maes R., Spatz S., Thacker B.: Proc. IPVS Congr. Rio de Janeiro, Brazil, 1988, s. 169.
15. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
16. Norval M., Bingham R.W.: Arch. Virol. 97, 151, 1987.
17. Ohlinger V.F., Vogt A., Saalmuller A.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus, St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 83.
18. Paul P.S.: Vet. Microbiol. 24, 409, 1990.
19. Paul P.S., Mengeling W.L., Pirtle E.C.: Arch. Virol. 73, 193, 1982.
20. Pejsak Z.: Medycyna Wet. 46, 129, 1990.
21. Pirtle E.C., Whaten M.W., Paul P.S., Menegeling W.L., Sacks J.M.: Am. J. vet. Res. 45, 1906, 1984.
22. Pol J.M.A., Quint W.G.V., Kok G.L., Broekhuysen-Davies J.M.: Res. vet. Sci. 50, 45, 1991.
23. Sabo A.: Aujeszkeho choroba. VEDA, Vydavatel'stvo Slovenskej akademie vied, Bratislava, 1981.
24. Ursache R., Meurier C., Perpere L.: Proc. 11th Conf. OIE Reg. Comm. Eur., Vienna, Austria, 1984, s. 105.
25. Vannier P.: Proc. 11th Conf. OIE Reg. Comm. Eur., Vienna, Austria, 1984, s. 85.
26. Van Oirschot J.T.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus, St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 85.
27. Van Oirschot J.T., Gielkens A.L.J.: Vet. Quart. 6, 225, 1984.
28. Van Oirschot J.T., Gielkens A.L.J.: Vet. Quart. 9, 37, 1987.
29. Wilchek M., Bayer E.A.: Analyt. Biochem. 171, 1, 1988.
30. Wittmann G.: Tierarztl. Umsch. 37, 535, 1982.
31. Wittmann G.: Proc. 11th Conf. OIE Reg. Comm. Eur., Vienna, Austria, 1984, s. 3.