

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE ET INNOCUITE D'UN VACCIN RECOMBINANT DELETE TK-, GX- (TOLVID®) CONTRE LA MALADIE D'AUJESZKY.

Arlette LAVAL(1), S. LENS(2), J. STEFFAN(2)

(1) Ecole Nationale Vétérinaire, 7, Avenue Charles de Gaulle, 94704 MAISONS ALFORT.

(2) Laboratoire UPJOHN, Tour Franklin, 92081 PARIS LA DEFENSE.

INTRODUCTION

La Maladie d'Aujeszky, connue depuis des décennies, a pris une extension inquiétante depuis une vingtaine d'années dans la plupart des pays du monde qui ont intensifié leur production porcine. Cette progression est liée à la fois à la multiplication des foyers, rendue plus facile dans les grandes zones de production, et à l'apparition de souches virales paraissant plus pathogènes que celles qui sévissaient autrefois. La nécessité d'un programme sérieux de prophylaxie est devenue évidente, tout particulièrement dans le contexte européen. La solution purement sanitaire adoptée par les anglais dont les élevages étaient initialement peu infectés est trop onéreuse pour faire école dans un pays comme la France où le virus est plus répandu, du moins dans les grands bassins de production. La vaccination de tous les porcs reste dans ces zones et dans un premier temps, la seule solution raisonnable (VANNIER et al. 1986, VANNIER 1987).

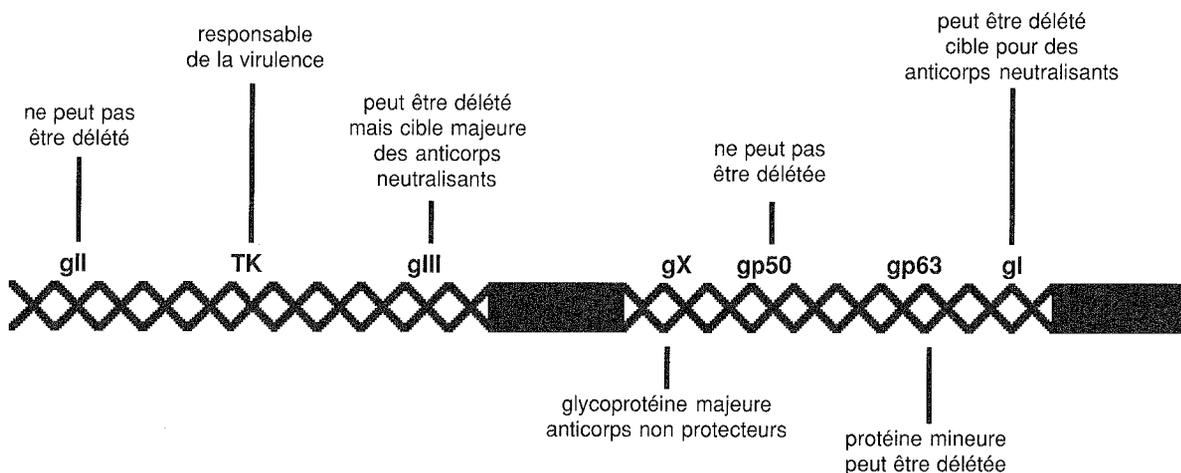
L'utilisation du génie génétique permet de concevoir des vaccins totalement dépourvus de pouvoir pathogène, en supprimant la fraction du DNA viral qui code pour la virulence. Ce procédé est beaucoup plus efficace que les passages en série sur culture cellulaire utilisés pour obtenir les souches des

vaccins classiques. Dans ce cas en effet, on obtient des souches dépourvues de pouvoir pathogène au prix de modifications importantes des propriétés antigéniques, qui peuvent s'accompagner d'une altération du pouvoir immunogène (LOMNICZI et al. 1984) En outre, le génie génétique permet de supprimer un gène codant pour un antigène non impliqué dans le pouvoir immunogène, mais induisant une forte réponse en anticorps témoins de l'infection virale (MARCHIOLI et al. 1987) Ceci permet de discriminer animaux infectés et animaux vaccinés. C'est tout l'enjeu des vaccins recombinants qui font actuellement l'objet de recherches actives dans plusieurs pays (VAN OIRSCHOT et al. 1986). Nous décrivons ici le développement d'un nouveau vaccin obtenu par génie génétique et ses propriétés.

1. CHOIX D'UN RECOMBINANT TK-, GX-

La structure du virus, rappelée dans la figure 1 permet de comprendre les possibilités qui s'offrent au généticien désireux de construire une souche de virus de la Maladie d'Aujeszky.

FIGURE 1
REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ADN VIRAL DU VIRUS D'AUJESZKY



Le choix de la délétion TK (thymidine kinase) est très classique, car on sait depuis les années 60, avec les travaux de TATAROV (1968) que les mutations du virus de la Maladie d'Aujeszky qui portent sur cet antigène rendent celui-ci pratiquement avirulent. En retirant au milieu du gène TK un fragment d'ADN connu, identifiable et suffisamment important, on obtient une souche de virus dépourvue de pouvoir pathogène et pratiquement incapable de retrouver sa structure initiale (KIT et al. 1985, MCGREGOR et al. 1985). La modification du virion est en effet trop importante pour qu'une réversion au virus initial soit vraiment possible.

Le choix de la seconde délétion offre un éventail plus large. Elle doit concerner l'une des glycoprotéines toujours présentes sur les souches sauvages, et constituant une cible majeure de la réponse immunitaire. Ce choix se limite en fait aux antigènes qui ne sont impliqués ni dans la réplication virale, ni dans la protection contre l'infection, et qui induisent une séroconversion solide, capable d'être facilement détectée sur les animaux infectés par le virus sauvage. On connaît bien en particulier six gènes différents qui codent pour les glycoprotéines, ainsi que leurs séquences et leur localisation exacte sur la molécule de DNA.

Deux de ces gènes sont absolument essentiels à la réplication du virus : ce sont ceux correspondant aux glycoprotéines **G2** et **GP50**. Il n'est pas possible de les déléter. Il en va différemment pour la glycoprotéine **G3**, que l'on sait déléter, mais qui est une cible majeure pour la réponse en anticorps neutralisants. Bien qu'on ne puisse pas toujours corrélérer titres neutralisants et résistance à l'infection, en particulier lorsque les animaux sont vaccinés avec des virus vivants (BRUN et al. 1988), il est préférable de conserver dans le vaccin un antigène aussi directement impliqué dans cette réponse. Il est également possible de déléter **GP63**. C'est une glycoprotéine mineure qui n'intervient pas dans la protection contre l'infection. Mais elle n'induit pas une réponse sérologique prononcée, et l'utiliser comme marqueur épidémiologique peut conduire ultérieurement à des problèmes de sensibilité lors du titrage des anticorps.

La délétion du gène **G1** est possible. Elle est largement pratiquée avec l'usage de la souche Bartha, naturellement délétée et de ses dérivés (VAN OIRSCHOT et GIELKENS, 1984). Comme **G3**, cette glycoprotéine est impliquée dans la réponse en anticorps neutralisants. Mais son rôle dans l'induction de la protection est controversé, bien que certains travaux aient montré que des anticorps monoclonaux antiG1 ont effectivement un effet protecteur.

La délétion **gX** répond aux objectifs initialement définis du marquage épidémiologique sans perte du pouvoir immunogène : c'est une glycoprotéine majeure, sécrétée en grande quantité dans les cellules infectées. Elle provoque l'apparition d'anticorps, mais comme ce n'est pas une protéine structurale, ceux-ci ne neutralisent pas le virus et ne sont pas protecteurs. La délétion n'altère donc pas l'immunogénicité du vaccin, mais elle permet par contre de différencier dans de bonnes conditions animaux infectés par le virus sauvage et animaux vaccinés. La présence de **gX** a été démontrée sur toutes les souches de virus sauvage testées en France et en Europe (plus de 200 souches).

La double délétion **TK gX** permet donc d'obtenir un virus dépourvu de pouvoir pathogène, suffisamment proche du virus sauvage pour qu'il garantisse une protection efficace. Ce virus modifié est toutefois incapable de retrouver sa structure ini-

tiale. La délétion de la seule glycoprotéine **gX** ne modifie pas les antigènes qui pourraient avoir un rôle protecteur, tout en présentant les qualités nécessaires à un bon marquage épidémiologique.

2. ACTIVITE DU VACCIN TOLVID®.

L'activité du vaccin TOLVID chez le porc et la souris a été abondamment démontrée (MARCHIOLI et al., 1987). Protégeant contre une épreuve virulente sévère à partir d'une dose de 10^3 PFU, la souche vaccinale est très active. Par mesure de sécurité, la dose vaccinale préconisée chez le porc est cependant supérieure à 10^4 PFU.

2.1. Effet protecteur de la vaccination lors d'une épreuve virulente.

Dans les conditions françaises, le vaccin est essentiellement destiné à être utilisé chez le porc issu de mère vaccinée, à l'entrée en engraissement. La cible est donc un animal porteur d'anticorps maternels, âgé de 10 à 12 semaines. Deux essais ont été réalisés en vue de rechercher l'éventuel effet négatif des anticorps maternels sur la vaccination.

Le premier essai a été réalisé sur des porcs issus de mères vaccinées avec deux vaccins inactivés en adjuvant huileux différents (GESKYVAC® : Rhone Mérieux ou NOBIVAC® : Intervet) (NAUWYNCK et PENSART, résultats non publiés). Les animaux, ainsi répartis, ont reçu une injection unique de vaccin par voie intramusculaire, sous un volume de 2 ml :

*porcs issus de mères vaccinées GESKYVAC :	
vaccinés :	9 porcs de 12 semaines 19 porcs de 14 semaines
non vaccinés :	3 porcs de 12 semaines 6 porcs de 14 semaines
*porcs issus de mères vaccinées NOBIVAC :	
vaccinés :	10 porcs de 9 semaines 7 porcs de 11 semaines
non vaccinés :	4 porcs de 9 semaines 3 porcs de 11 semaines.

La séroconversion a été suivie par séroneutralisation 4, 12 et 16 semaines après la vaccination (tableau 1). A la fin de la période d'engraissement, soit 16 semaines après la vaccination, tous les porcs ont été éprouvés par inoculation intranasale et orale de 10^8 PFU de virus, souche 75V19.

L'activité du vaccin a été appréciée par l'examen clinique du 5ème au 14ème jour suivant l'épreuve, et l'intensité de l'excrétion virale dans le mucus nasal, à partir de prélèvements réalisés 3, 5 et 9 jours après l'épreuve.

TABLEAU 1
COMPARAISON DES SÉROCONVERSIONS OBTENUES CHEZ LE PORC ISSU DE MÈRE VACCINÉE AVEC GESKYVAC ET NOBIVAC

Vaccin utilisé chez la truie	Age de la vaccination	Titre neutralisant moyen			
		J0	J28	J84	J112
Geskyvac	12 sem.	<2	2	7	6,5
	14 sem.	≤2	3,5	17	13
	témoins	≤2	<2	<2	<2
Nobivac	9 sem.	3,7	≤2	5,1	2,2
	11 sem.	2	3,4	6	4
	témoins	5	<2	<2	<2

La présence des anticorps maternels dont les titres sont encore assez élevés peut perturber la séroconversion sur les porcs vaccinés à 9 et 11 semaines. Par contre, la réponse est satisfaisante chez les porcs vaccinés à partir de la 12ème semaine. Cependant, la relation entre les titres neutralisants et la résistance à l'épreuve n'est pas évidente. En effet, alors que l'épreuve est très virulente, puisqu'elle tue 50% des porcs témoins à 90kg, aucun cas de mortalité n'a été observé sur les porcs vaccinés. Il est donc vraisemblable que la protection n'est pas uniquement liée à la présence des anticorps neutralisants, et que l'immunité à médiation cellulaire est également impliquée (WAWRZKIEWICZ et al. 1981).

L'excrétion du virus d'épreuve par les porcs vaccinés (13 écouvillons positifs sur 36) est significativement inférieure à celle des témoins (10 écouvillons positifs sur 12). Elle est en particulier raccourcie, puisqu'aucun des 12 sujets vaccinés n'excrète plus de virus à J9, alors que 2 des 4 témoins suivis sont encore excréteurs.

Ces résultats sont confirmés par un deuxième essai, beaucoup plus large, réalisé sur les porcelets nés de 58 mères vaccinées à 4 différents stades de la gestation (WARDLEY et BERLINSKI, 1988):

- A : avant la saillie
- B : au cours du 1er tiers de la gestation
- C : au cours du 2ème tiers de la gestation
- D : au cours du 3ème tiers de la gestation

Leurs titres en anticorps neutralisants à l'âge de 3 jours étaient :

- très élevés dans le groupe A (moyenne : 30)
- moyens dans les groupes B et C (moyennes : 16 et 12 respectivement)
- faibles dans le groupe D (moyenne : 8)

Les porcelets issus des 4 groupes de truies (A, B, C ou D) ont subi l'un des 4 traitements suivants :

- vaccination soit à 3-4 semaines, soit à 10-12 semaines,
 - puis épreuve soit 3 semaines plus tard soit à la fin de la période d'engraissement,
- des porcelets non vaccinés étant parallèlement conservés comme témoins.

La vaccination a été pratiquée dans tous les cas par injection intramusculaire d'une dose unique de vaccin (10^4 PFU). L'épreuve a été réalisée par injection intranasale de 10^4 PFU de virus par porc, souche Rice.

La résistance à l'épreuve a été appréciée par la mortalité.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

TABLEAU 2
INCIDENCE DES ANTICORPS MATERNELS SUR LA RÉSISTANCE A L'ÉPREUVE.

Témoins			Vaccinés			
Groupe maternel	Moment de l'épreuve (semaines)	% de mortalité	Groupe maternel	Moment de la vaccination (semaines)	Moment de l'épreuve (semaines)	% de mortalité
A	4	17	A	4	7	6
B	4	43	B	4	7	0
C	4	8	C	4	7	6
D	4	11	D	4	7	0
A	7	46	A	10	13	5
B	7	38	B	10	13	0
C	7	27	C	10	13	0
D	7	28	D	10	13	0
A	10	43	A	4	abattage	11
B	10	50	B	4	abattage	0
C	10	60	C	4	abattage	0
D	10	60	D	4	abattage	0
A	13	90	A	10	abattage	0
B	13	80	B	10	abattage	0
C	13	58	C	10	abattage	0
D	13	80	D	10	abattage	0

Les anticorps maternels exercent une certaine protection lorsque l'épreuve est réalisée très tôt sur des porcelets non vaccinés. La mortalité reste comprise entre 8 et 43% sur les porcelets éprouvés à 4 semaines, alors qu'elle est comprise entre 43 et 90% lorsque l'épreuve a lieu à 10 ou 13 semaines. Dans les groupes vaccinés-éprouvés, les porcs sont bien protégés. Les porcelets issus de mères vaccinées en fin de gestation sont totalement protégés par une vaccination à 4 ou 10 semaines d'âge (groupe D). Le moment de la vaccination

des reproducteurs n'intervient pas sur l'efficacité de la vaccination du porcelet, dans la mesure où elle est pratiquée à 10 semaines d'âge.

2.2. Effet de la vaccination sur l'excrétion virale après épreuve.

La vaccination contre la Maladie d'Aujeszky doit protéger les porcs contre les effets de l'infection, de façon à éviter la

mortalité, les signes cliniques et l'altération des performances zootechniques, mais elle doit aussi réduire l'excrétion virale pour limiter l'extension de l'infection. A l'heure actuelle, aucun vaccin ne permet d'éviter totalement le portage et l'excrétion virale après épreuve. La vaccination permet cependant de réduire la quantité de virus excrétée et la durée de l'excrétion

par rapport à des témoins non vaccinés. Huit essais différents ont été réalisés sur des porcs de tous âges. Dans sept d'entre eux, le virus a été recherché dans le mucus nasal prélevé par écouvillonnage plusieurs jours après l'épreuve, sans titrage. Dans le huitième essai, il a de plus été titré. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau 3 et la figure 2.

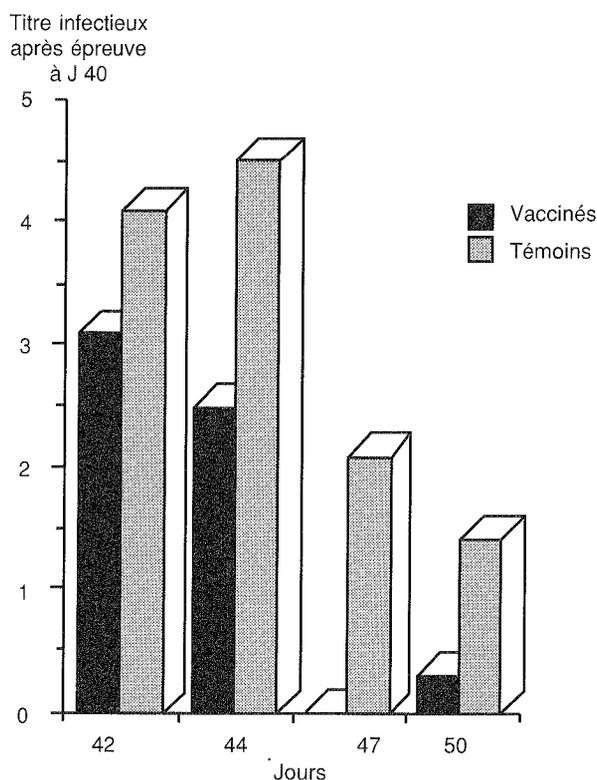
TABLEAU 3
EXCRÉTION NASALE DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY
APRES ÉPREUVE PAR DES PORCS VACCINÉS ET TÉMOINS (ÉTUDE QUALITATIVE)

Age à la vaccination (J0)	Epreuve	Nombre d'animaux		Durée de l'observation	Nombre d'écouvillons positifs/ Nombre total d'écouvillons	
		Vaccinés	Témoins		Vaccinés (%)	Témoins (%)
3-4 jours	J21	19	8	J21 à J39	35/180 (19)	25/52 (48)
4 à 6 sem*	J21	64	79	J24 à J28	2/62 (3,2)	25/79 (31)
5 à 6 sem*	J20	6	6	J19 à J34	12/96 (12,5)	22/43 (51)
5 à 6 sem	J20	6	6	J19 à J34	4/96 (4)	30/63 (48)
5 à 6 sem	J21	24	16	J21 à J35	62/360** (17)	98/153 (64)
8 sem	J21	4	0	J24, 25, 26	6/12 (50)	-
9 à 14 sem	J112	12	4	J115, 117, 121	13/36 (36)	10/12 (83)

* les porcs de ces essais ont été vaccinés avec 10^7 à 10^8 PFU par dose, alors que tous les autres essais sont réalisés dans les conditions habituelles de vaccination (10^4 PFU par dose).

** Cinq des 24 porcs vaccinés n'ont pas du tout excrété le virus après épreuve.

FIGURE 2
EXCRÉTION VIRALE APRES EPREUVE
Etude quantitative sur le mucus nasal



La vaccination permet dans tous les cas de réduire l'excrétion virale, tant en quantité qu'en durée. On remarquera qu'un certain nombre de porcs n'excrète pas du tout le virus d'épreuve malgré la sévérité des épreuves virulentes, avec des inoculum qui sont certainement beaucoup plus riches que lors d'infection naturelle. Ces résultats sont très encourageants par rapport à d'autres essais mentionnés dans la littérature (DONALDSON et al. 1984, De LEEUW et VAN OIRSCHOT, 1985, WARDLEY et al., 1988)

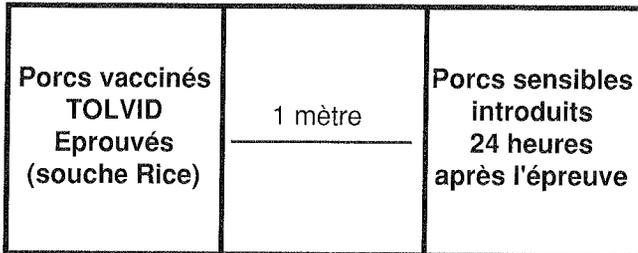
2.3. Absence de transmission du virus d'épreuve au porc contact.

Le vaccin Tolvid limite la propagation du virus sauvage, comme le montre l'essai suivant : quatre porcs de 8 semaines indemnes de Maladie d'Aujeszky ont été vaccinés par voie sous-cutanée avec une dose de vaccin, puis éprouvés un mois plus tard par voie intranasale avec 10^4 PFU de virus, souche Rice. Le lendemain de l'inoculation, ils ont été transférés dans un bâtiment contenant 4 autres porcs du même âge, indemnes de Maladie d'Aujeszky, placés dans une loge voisine, mais séparés des animaux éprouvés par une distance de 1 mètre environ (figure 3). Cette situation permettait donc de reproduire les conditions naturelles de diffusion du virus, lors d'introduction accidentelle d'animaux infectés dans un bâtiment. Tous les porcs ont été mis en observation pendant 15 jours, avec recherche du virus sur des écouvillonnages nasaux, et recherche des anticorps puis épreuve avec la souche Rice à J21 chez les témoins.

Le virus d'épreuve a été retrouvé sur les 4 porcs vaccinés et éprouvés. Les témoins sont restés en bonne santé et n'ont pas fait de séroconversion. Inoculés 21 jours après le transfert des

porcs vaccinés-évalués, ils ont tous présenté des signes sévères de Maladie d'Aujeszky. La vaccination permet donc de limiter la diffusion du virus d'épreuve de façon suffisante pour que des porcs placés à une courte distance des animaux infectés ne soient pas contaminés.

FIGURE 3
SCHÉMA EXPÉRIMENTAL



3. INNOCUITÉ DU VACCIN TOLVID

3.1. Innocuité pour le porcelet

Les effets secondaires de la vaccination ont été étudiés sur des porcelets de tous âges, vaccinés par différentes voies, avec une ou plusieurs doses de vaccin. Selon les essais, l'innocuité a été appréciée par la recherche des réactions thermiques

après vaccination, par les manifestations cliniques, perte d'appétit en particulier, et/ou par la mise en évidence d'éventuels effets négatifs sur la croissance. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les *tableaux 4, 5 et 6*.

A partir de l'âge de 5 à 6 semaines, le porcelet supporte très bien la vaccination : à dose normale, on ne relève que quelques hyperthermies, rares, fugaces et modérées (<40°C). Ces réactions sont un peu plus prononcées en cas d'injections massives de vaccins, mais elles restent cependant très limitées. Il faut noter que les rappels n'induisent pas de réaction particulière. En aucun cas, on ne constate d'effet sur le comportement des animaux et sur la croissance. Le porcelet nouveau-né réagit davantage, mais il ne présente ni mortalité, ni signes cliniques, ce qui confirme la perte de virulence du virus vaccinal.

3.2. Innocuité du vaccin Tolvid pour les reproducteurs

Bien que ce vaccin ne soit pas destiné à être utilisé chez les reproducteurs, du moins en France, ses effets ont été étudiés sur la truie et la cochette à différents stades de gestation, à savoir avant la saillie, au 35ème, 65ème, ou 95ème jour de gestation, ainsi que sur le verrat (WARDLEY et BERLINSKI, 1988). Aucune réaction locale ou générale n'a été enregistrée, et les femelles vaccinées ont toutes donné naissance à un nombre normal de porcelets en parfaite santé. Le virus vaccinal, recherché dans les tissus des porcelets, n'a jamais pu être isolé. Chez le verrat, la vaccination ne provoque pas non plus d'effet secondaire, et ne modifie en aucune façon les propriétés du sperme. Les tentatives d'isolement du virus à partir de ce dernier sont toutes restées négatives.

TABLEAU 4
INNOCUITÉ DU VACCIN TOLVID POUR LE PORCELET VACCINÉ AVEC UNE DOSE DE VACCIN (WARDLEY ET AL. 1988).

Age	Voie d'injection	Effectif		Résultats
		Vaccinés	Témoins	
1 jour	SC	5	7	100% de survie hyperthermie sur 3 des 5 sujets vaccinés : température > 40°C pendant 2 des 7 jours d'observation (J2, J3 ou J3, J4)
4 jours	IM	10	9	100% survie température moyenne > 40°C sur les sujets vaccinés de J2 à J6
3 jours	IM	9	-	100% survie température moyenne > 40°C sur les sujets vaccinés à J2 et J3
3 jours	SC	9	-	100% survie température moyenne > 40°C sur les sujets vaccinés à J5
4-6 sem	IM	64	79	comportement identique dans les deux groupes
5-6 sem	IM	24	8	absence de réaction thermique (t<39°7) absence d'effet sur la croissance

TABLEAU 5
EFFET DE LA VACCINATION AVEC TOLVID SUR LA TEMPÉRATURE RECTALE CHEZ LE PORCELET VACCIN
A L'AGE DE 10 A 12 SEMAINES (ESSAI-TERRAIN RÉALISÉ EN FRANCE).

Traitement	Effectif	Température rectale (°C)		
		J0*	J1	J2
Tolvid	165	39°55	39°82	39°77
Témoin	168	39°45	39°73	39°70

* La température a été prise à J0, juste avant la vaccination.

TABLEAU 6
INNOUITÉ DU VACCIN TOLVID POUR LE PORCELET VACCINÉ AVEC PLUSIEURS DOSES DE VACCIN.

Age	Voie d'injection	Effectif		Résultats
		Vaccinés	Témoins	
5-6 sem	IM 10 ⁸ PFU	6	-	absence de signe cliniques et d'effets négatifs sur la croissance
5-6 sem	10 doses IM + 1 rappel (1 dose) 12 jours plus tard	4	-	hyperthermie modérée (<40°5C) pendant 2 jours absence de signe cliniques et d'effets négatifs sur la croissance
8 sem	25 doses IM 2 fois à 17 jours d'intervalle	8	-	quelques hyperthermies > 40°5C jamais plus de 3 jours consécutifs
6-8 sem	6 fois 1 dose	5	-	absence de réaction thermique et de signes cliniques

CONCLUSION

Les techniques de génie génétique permettent donc d'obtenir des virus qui répondent aux objectifs recherchés : activité et innocuité. Les essais de vaccination-épreuve permettent d'établir l'activité, en particulier sur des porcs vaccinés à l'entrée en engraissement alors qu'ils sont encore porteurs d'anticorps maternels. L'innocuité a été largement étudiée. Elle est confirmée par plusieurs essais de tolérance grande échelle mis en place aux Etats Unis et en France, portant sur plus de 400 porcs, dont la croissance a été suivie tout le long

de la période d'engraissement. Reste à fournir les bases d'une méthode complète d'éradication, appuyée sur une technique de diagnostic sensible et spécifique, capable de différencier les animaux infectés par le virus sauvage des sujets vaccinés. Le choix de la glycoprotéine gX, antigène majeur qui suscite l'apparition d'anticorps à des titres élevés, autorise un bon marquage épidémiologique. Sous réserve d'un avis favorable des autorités compétentes, il devrait représenter une alternative prometteuse et intéressante aux souches vaccinales déléetées en gl.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUN A., KATO F., DURET C., DAUVERGNE M., 1988. 10th IPVS Congress Proc., 189.
- DONALDSON A.I., WARDLEY R.C., MARTIN S., HARKNESS J.W., 1984. Vet.Rec., 121-124.
- KIT S., KIT M., PIRTLE E.C., 1985. Am.J.Vet.Res., **46**. 1359-1367.
- LEEUW P.W. de, VAN OIRSCHOT J.T., 1985. Vet.Quaterly, **7**. 191-197.
- LOMNICZI B., BLANKENSHIP M.L., BEN-PORAT T., 1984. J.Virol., **49**. 970-979.
- MCGREGOR S., EASTERDAY B.C., KAPLAN A.S., BEN PORAT T., 1985. Am.J.Vet.Res., **46**. 1495-1502.
- MARCHIOLI C.C., YANCEY R.J., WARDLEY R.C., et al., 1987. Am.J.Vet.Res., **48**. 1577-1583.
- TATAROV G. 1968. Zentralbl. Veterinarmed. **15**. 847-853.
- VANNIER Ph., TOMA B., COSTES M., et al., 1986. 9th IPVS Congress Proc., 333.
- VANNIER Ph., 1987. Le Point Vétérinaire. **19**. 335-340.
- VAN OIRSCHOT J.T., GIELKENS A.L., 1984. Am.J.Vet.Res., **45**. 2099-2103.
- VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA H.J., MOONEN P.J., POL J.M., VAN ZAANE D., 1986. J.Gen.Virol., **67**. 1179-1182.
- WARDLEY R.C., THOMSEN D.R., POST L.E. 1988. 10th IPVS Congress Proc., 180.
- WARDLEY R.C., BERLINSKI P.J. 1988. 10th IPVS Congress Proc., 181.
- WAWRZKIEWICZ J., DZIEDZIC B., LIPINSKA M., 1981. Comp. Immun. Microbiol. Infects. Dis., **4**. 201-208.