

Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 636.09:616.98:578.
82/.83:57.083.33
© 2014

М.П. Ситюк,
кандидат
ветеринарних наук
Інститут ветеринарної
медицини НААН

ІМУНОПЕРОКСИДАЗНИЙ ТЕСТ ДЛЯ ВІРУСОЛОГІЧНОЇ ТА СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ РЕПРОДУКТИВНО- РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ ТА ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ

Наведено дані щодо застосування імунопероксидазного тесту для вірусологічної та серологічної діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому та цирковірусної інфекції свиней. Наведено дані щодо необхідних реактивів та обладнання для постановки методу, описано процедури постановки та обліку результатів реакції стосовно виявлення вірусів і специфічних антитіл.

Ключові слова: репродуктивно-респіраторний синдром, цирковірусна інфекція, діагностика, імунопероксидазний тест, реакція нейтралізації.

Репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС) — вірусне контагіозне захворювання, що характеризується абортми свиноматок, мертвородженням поросят, передчасними опоросами або їх затримкою, респіраторними порушеннями [18]. Перші повідомлення про хворобу з'явилися у 80-ті роки XIX ст. у США [9, 19] та Канаді [9, 22]. У 1991 р. було виділено специфічний збудник [9, 18]. Відтоді РРСС реєстрували в Німеччині, Нідерландах, Великій Британії (1991), Франції та Іспанії (1992), Данії, Японії (1994) [18, 19]. На території Росії РРСС офіційно було зареєстровано з 1993 р. [9]. В Україні це захворювання реєстрували у деяких свинарських господарствах Сумської, Харківської, Донецької і Полтавської областей [2, 4, 17]. РРСС також було виявлено на території Білорусі [5, 29] і Вірменії [16]. Нині вірус РРСС класифікується на 2 генотипи: американський і європейський, які мають певну географічну належність [9, 23, 31], американський генотип циркулює в країнах Європи, а європейський — у США і Південно-Східній Азії [9, 25, 28, 31].

Серед засобів лабораторної діагностики РРСС використовують: виділення вірусу в первинній культурі клітин альвеолярних макрофагів поросят і перещеплюваних клітинних лі-

ніях MARC-145, CL-2621, CRL-11171 [6], метод флуоресцентних антитіл [12]; для виявлення специфічних антитіл — імуноферментний аналіз (ІФА), імунопероксидазний тест [1]; для виявлення РНК вірусу — полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Зазначені вище тести рекомендовано Міжнародним епізоотичним бюро (ОІЕ) для діагностики РРСС [26].

Цирковірус свиней вперше виявлено у 1974 р., охарактеризовано у 1982 р. [11], у 1995 р. Міжнародним комітетом з таксономії виділено в окрему родину [7, 14]. Збудник цирковірусної інфекції свиней (PCV-2) належать до роду *Circovirus* родини *Circoviridae* [3, 7, 14, 27, 30]. Нині відомо 2 типи цирковірусу свиней [7, 27]. За даними зарубіжних авторів [21, 24, 30], штами PCV-2 є патогенними для свиней, а PCV-1 — непатогенними та контамінантами культури клітин PK-15 [14].

Вперше захворювання свиней описано у Канаді у 1991 р. [14], а вірус був ізольований у 1998 р. з тканин поросят у культурі клітин PK-15. В епізоотологічному відношенні цирковірусна інфекція поширена у Європі, Азії, Африці, Північній і Південній Америці [13]. За одними даними, антитіла до PCV-2 у крові свиней у різних країнах Європи реєструвалися в 25–98% випадків [20], а за іншими [14] — на рівні від 55–100%.

Для виявлення ЦВС-2 застосовують ІФА, метод флуоресцентних антитіл і ПЛР. Нині найширше застосовують тест-системи для ІФА [8, 14] і ПЛР [10, 13, 14].

Враховуючи той факт, що вірус РРСС хоч і виявляє цитопатичну дію в культурі клітин MARC-145, однак не завжди його реплікації супроводжуються проявом ЦПД, а цирковірус 2-го типу не викликає прояву цитопатичної дії в культурах клітин, постає питання до вибору найчутливішого та специфічного методу вірусологічної та серологічної діагностики цих інфекцій.

Важливу роль відводиться імунопероксидазному тесту під час вивчення антигенних властивостей штамів, ізолятів чи клонів вірусів РРСС та ЦВС-2. За допомогою цього методу проводиться об'єктивна оцінка вірусів РРСС та ЦВС-2 в чутливих культурах клітин з визначенням титру їх інфекційної активності, а також визначення титру специфічних гуморальних антитіл у сироватках крові за допомогою реакції нейтралізації.

Оскільки в Україні серологічна діагностика цирковірусної інфекції та репродуктивно-респіраторного синдрому здійснюється виключно за допомогою тест-систем ІФА, метою досліджень було подати альтернативний варіант використання імунопероксидазного методу для виявлення антигену та специфічних антитіл до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому та цирковірусу 2-го типу в біологічних субстратах.

Матеріали і методи досліджень. *Обладнання:* ламінарний або настільний бокс; CO₂ інкубатор; планшети 96-лункові для культивування культури клітин; планшети 96-лункові для приготування розведень дослідних проб; піпетка 8-канальна автоматична на 50–300 мкл; піпетка 1-канальна автоматична на 50 мкл; стерильні наконечники для піпеток; інвертований світловий мікроскоп. *Матеріали:* живильні середовища для культур клітин (ГЛА, 199, RPMI-1640, ІГЛА); культура клітин для культивування вірусу РРСС (MARC-145), культура клітин для культивування цирковірусу 2-го типу SK-6; цирковірус 2-го типу (ізоляти, штами, клони); вірус РРСС (ізоляти, штами, клони); гіперімунні (позитивні) сироватки крові одержані на свинях; негативні сироватки крові свиней, що не містять специфічних антитіл проти цирковірусу 2-го типу та вірусу РРСС; 0,85%-й розчин натрію хлориду; 0,1 М фосфатно-буферний розчин (ФБР) pH 7,2–7,4; фіксувальний буфер (96%-й етиловий спирт); кон'югат (кролячий антисвинячий імуноглобулін G, мічений пероксидазою хрому); 1%-ве знежирене молоко; 0,04%-й

3-аміно-9-етилкарбазол; Na-ацетатний буфер pH 5,0. *Методи:* імунопероксидазний тест використовується як для прямого виділення вірусу РРСС та PCV 2 в біологічному матеріалі і визначення його титру інфекційної активності, а також для виявлення специфічних нейтралізуювальних антитіл у сироватках крові за допомогою реакції нейтралізації.

Результати досліджень. Імунопероксидазний метод діагностики цирковірусної інфекції та РРСС може бути спрямований на виявлення антигену вірусу або специфічних нейтралізуювальних антитіл за допомогою чутливих біологічних моделей — культур клітин. Прямий імунопероксидазний тест дає змогу виявляти зазначені віруси в біологічному матеріалі (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначати титр інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів, а непрямий — специфічні нейтралізуювальні антитіла до цих вірусів способом дослідження сироваток крові, молока, молозива з використанням реакції нейтралізації.

Розглянемо етапи постановки імунопероксидазного тесту з метою виявлення вірусів РРСС і цирковірусу 2-го типу та визначення їх інфекційної активності.

Вирощений у культуральному посуді моношар культур клітин MARC-145 (для культивування вірусу РРСС), SK-6, PK-15 (для культивування цирковірусу 2-го типу) знімають розчином трипсин — версену (1:9) та ресуспендують за допомогою стерильної піпетки і доводять живильним середовищем таким чином, щоб коефіцієнт пересіву для культури клітин MARC-145 становив 1:3–1:4, а для культур клітин SK-6, PK-15 — 1:3–1:5. Для проведення реакції висівають суспензію клітин чутливої культури (для вірусу РРСС — MARC-145, для цирковірусу 2-го типу — SK-6, PK-15) на поживних середовищах з додаванням 10% фетальної сироватки крові великої рогатої худоби за допомогою автоматичної 8-канальної піпетки на планшет для культивування культур клітин.

Суспензію клітин вносять у кожну лунку 96-лункового пластикового мікропланшета з плоским дном по 0,2 см³ та культивують в CO₂ інкубаторі. За серологічної діагностики цирковірусної інфекції використовують несформований моношар клітин SK-6, PK-15 (заповнення лунок клітинами на 50%), а за серологічної діагностики РРСС використовують суцільний моношар клітин.

Для цього у всі лунки 96-лункового пластикового мікропланшета з круглим дном вносять по 0,18 см³ живильного середовища. У перший ряд лунок круглодонного планшета вносять по

0,02 см³ вірусовмісного біологічного матеріалу або вакцинного чи діагностичного вірусу та титрують у розведеннях 10⁻¹–10⁻⁶ (10-разові розведення). У лунки, призначені для контролю клітин, вносять живильне середовище з 10% фетальної сироватки крові великої рогатої худоби. Під час дослідження біологічного матеріалу від домашніх свиней або диких кабанів щодо наявності цирковірусу 2-го типу або вірусу РРСС обов'язково ставлять позитивний контроль вірусу (діагностичні чи вакцинні штами цирковірусу 2-го типу або вірусу РРСС). Після процедури титрування вміст планшета з моношаром культури клітин видаляють і за допомогою 8-канальної автоматичної піпетки переносять вміст лунок планшета з круглим дном у плоскодонний планшет з культурою клітин з додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2%). Інкубацію здійснюють 7 діб в умовах CO₂ інкубатора, концентрація вуглекислоти — 5%.

Через 5–7 діб безпосередньо проводять процедуру імунопероксидазного фарбування клітин. Вміст планшета видаляють, а моношар клітин в лунках відмивають (1–2 рази) 0,1 М ФБР рН 7,2–7,4. Фіксувальний буфер (96%-й етиловий спирт) вносять у всі лунки планшета на 10 хв, потім його видаляють і протягом 1 год підсушують в умовах термостату. Далі готують робочі розведення специфічної сироватки та кон'югату на 0,1 М ФБР рН 7,2–7,4 з 1% знежиреного сухого молока (за діагностики цирковірусної інфекції використовується специфічна сироватка крові до цирковірусу 2-го типу, а за діагностики РРСС — специфічна сироватка крові проти вірусу РРСС). У дослідні та контрольні лунки спочатку вносять по 0,05 см³ специфічної сироватки крові в робочому розведенні та інкубують за температури 37 °С протягом 60 хв. Потім видаляють вміст, а лунки тричі промивають буферним розчином та вносять по 0,05 см³ робочого розведення кон'югату (кролячий антисвинячий імуноглобулін G, мічений пероксидазою хрому) і поміщають у термостат за температури 37 °С на 60 хв. Знову вміст планшета видаляють, а лунки промивають тричі фосфатно-буферним розчином. На наступному етапі готують і вносять розчин субстрату (0,04% 3-аміно-9-етилкарбазол у Na-ацетатному буфері, рН 5,0) з експозицією 15–20 хв в умовах термостату. Зупиняють реакцію відмиванням лунок планшета під проточною водою. Облік результатів реакції проводять за допомогою інвертованого світлового мікроскопа за малого збільшення (+100), де інфіковані цирковірусом 2-го типу

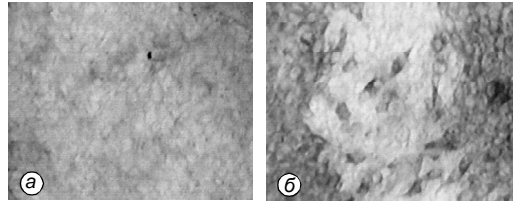


Рис. 1. Клітини культури MARC-145: а — не уражені вірусом РРСС; б — уражені вірусом РРСС (бляшки)

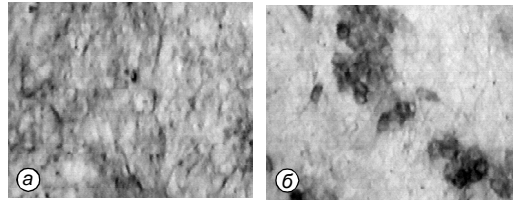


Рис. 2. Дія сироватки крові: а — позитивної (відсутність бляшок завдяки наявності специфічних антитіл проти вірусу РРСС); б — негативної (наявність бляшок завдяки відсутності специфічних антитіл проти вірусу РРСС)

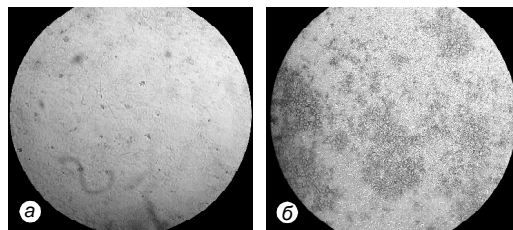


Рис. 3. Клітини культури SK-6: а — не уражені цирковірусом 2-го типу; б — уражені цирковірусом 2-го типу

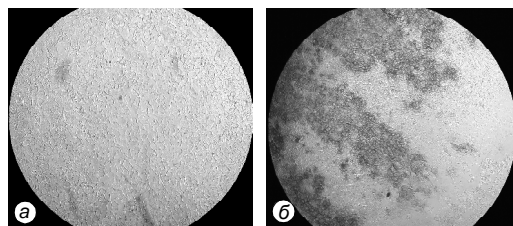


Рис. 4. Дія сироватки крові: а — позитивної (відсутність бляшок завдяки наявності специфічних антитіл проти цирковірусу 2-го типу; б — негативної (наявність бляшок завдяки відсутності специфічних антитіл проти цирковірусу 2-го типу)

клітини мають вигляд поодиноких клітин або їх скупчень (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром. Межею інфекційної активності вірусу вважають найвище його розведення, в якому помітна хоча б одна специфічна бляшка. Результати тит-

рування інфекційної активності вірусу виражають у десятикових логарифмах тканинних клітинних інфекційних доз ($\lg \text{TKID}_{50}$), які визначають за методом Ріда і Менча або методом Кербера в модифікації І.П. Ашмаріна [15].

Розглянемо етапи постановки імунопероксидазного тесту у реакції нейтралізації з метою виявлення специфічних антитіл проти вірусу РРСС і цирковірусу 2-го типу та визначення їх титру в сироватках крові домашніх свиней та диких кабанів.

Для проведення реакції висівають суспензію клітин чутливої культури (для вірусу РРСС — MARC-145, для цирковірусу 2-го типу — SK-6, PK-15) на живильних середовищах з додаванням 10% фетальної сироватки крові великої рогатої худоби за допомогою автоматичної 8-канальної піпетки на планшет для культивування культур клітин. У кожен лунку вносять по 0,2 cm^3 зазначених інгредієнтів та інкубують за температури 37°C в CO_2 інкубаторі з 5%-м умістом CO_2 . Стан моношару оцінюють за допомогою біокулярного інвертованого мікроскопа.

За серологічної діагностики цирковірусної інфекції використовують несформований моношар клітин SK-6, PK-15 (заповнення лунок клітинами на 50%), а за серологічної діагностики РРСС використовують суцільний моношар клітин культури MARC-145.

Проводять процедуру титрування позитивної (контрольної) та дослідних сироваток крові. У лунки 96-лункового пластикового планшета з круглим дном вносять по 0,1 cm^3 живильного середовища без сироватки крові. У перший ряд лунок вносять по 0,1 cm^3 дослідних сироваток крові (на кожен окрему сироватку використовують по 4 лунки) і піпетують 3–5 разів для змішування, після чого 0,1 cm^3 суміші переносять в аналогічні лунки наступного ряду. Отже, завдяки послідовному перенесенню сумішей отримують 2-разові розведення сироваток. Для цієї реакції готують робоче розведення вірусів (для

цирковірусної інфекції свиней — штам Stoon 1010, для РРСС — Lelystad) — 1000 $\text{TCID}_{50}/1\text{cm}^3$, яке вносять в об'ємі 0,1 cm^3 в усі лунки планшета з розтитрованими дослідними і позитивною сироватками крові. Одночасно робоче розведення вірусу вносять у лунки, зазначені як контроль вірусу, та ставлять контролю: 1. Контроль культури клітин. У 4 лунки вносять тільки живильне середовище для виявлення неспецифічної дегенерації клітин. 2. Контроль токсичності сироватки крові. В 4 лунки вносять сироватку в найменшому розведенні, яке використовували в реакції. 3. Позитивний контроль сироватки крові. Робоче розведення вірусу змішують з 2-разовими розведеннями специфічної сироватки. 4. Негативний контроль сироватки. Робоче розведення вірусу змішують з 2-разовими розведеннями негативної сироватки. 5. Контроль робочого розведення вірусу. З робочого розведення вірусу готують 4 ряди 10-разових розведень так, щоб у лунках було по 1000, 100, 10, 1 і 0,1 дози вірусу.

Вмістимо планшета змішують коловими рухами і ставлять на 1 год у CO_2 інкубатор для контакту вірусу з сироватками. Потім суміші переносять у планшет з моношаром клітин, з якого попередньо видалають ростове середовище, і ставлять в CO_2 інкубатор на 5–7 діб.

Облік результатів реакції нейтралізації з контролюями проводять на 5–7-му добу способом імунопероксидазного фарбування моношару клітин згідно з процедурою, наведеною вище. Реакцію нейтралізації враховують за допомогою інвертованого мікроскопа, де інфіковані цирковірусом 2-го типу або вірусом РРСС клітини мають вигляд поодиноких клітин або їх скупчень (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром, і оцінюють, як відсутність антитіл у сироватці, а відсутність бляшок — як наявність антитіл у сироватці. Типи антитіл виражають у подвійних логарифмах з основою 2 (Log_2) (рис. 1–4).

Висновки

Запропонований та апробований імунопероксидазний тест дає змогу проводити визначення інфекційної активності вірусів репродуктивно-респіраторного синдрому та цирко-

вірусної інфекції свиней відповідно в чутливих культурах клітин MARC-145 та SK-6, а також визначати титри специфічних антитіл до цих патогенів у реакції нейтралізації.

Бібліографія

1. Антитела к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней в сыворотках свиней/ Л.Ю. Вергун, З. Пейсак, Ю.А. Собко, А.Т. Шиков//

Ресурси і віруси: матеріали IV Міжнар. конф. (Київ, 27–30 вер. 2004 р.). — К., 2004. — С. 40–41.

2. Ассоциированные вирусные инфекции при па-

- тологии воспроизводства свиней/О.Е. Краснобаева, Е.А. Краснобаев, Е.Г. Павлов [и др.]/Пробл. и перспективы паразитологии: матер. V межсезд. конф. паразитологов Украины. — Харьков — Луганск, 1997. — С. 92–93.
3. Блоцька О.Ф. Цирковірусна інфекція свиней/О.Ф. Блоцька//Вет. медицина України. — 2008. — № 12. — С. 21–22.
4. Бусол В.О. Репродуктивний і респіраторний синдром свиней — загроза свинарству України/В.О. Бусол, М.В. Бабкін, В.О. Міщенко//Збереженість молодняку с.-г. тварин — запорука розвитку тваринництва України: зб. стат. наук.-практ. конф. — Х., 1994. — С. 102–104.
5. Генетическое разнообразие вируса РРСС/А.В. Щербаков, В.Ф. Ковалишин, В.А. Пыльнов [и др.]/Актуал. пробл. инфекц. патологии животных: материалы Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2003. — С. 150–155.
6. Диагностика и специфическая профилактика РРСС/Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер [и др.]/Ветеринария. — 2000. — № 10. — С. 16–19.
7. Инфекционная патология животных: у 2 т.; под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. — Т. 1. — С. 886–888.
8. ИФА для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа/М.А. Шкаева, В.В. Цибезов, О.А. Верховский [и др.]/Ветеринария. — 2005. — № 9. — С. 20–23.
9. Кукушкин С.А. Эпизоотология и меры борьбы с репродуктивно-респираторным синдромом свиней в мире и в Российской Федерации/С.А. Кукушкин//Ветеринар. патология. — 2006. — № 4. — С. 89–95.
10. Малооголовкин А.С. Выделение цирковируса свиней 2-го типа от поросят с синдромом мульти-системного истощения отъемышей/А.С. Малооголовкин, Г.А. Надточей, Д.В. Колбасов//Ветеринар. врач. — 2009. — № 2. — С. 27–30.
11. Малооголовкин А.С. Проблема цирковирусных инфекций в патологии животных и человека/А.С. Малооголовкин//Веткорм. — 2008. — № 2. — С. 30–31.
12. Методы лабораторной диагностики респираторно-репродуктивного синдрома свиней/В.В. Куринов, И.Ф. Вишняков, Е.А. Балашова [и др.]/Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней — неотложные проблемы науки и практики», 9–11 нояб. 1994 г. — Покров, 1995. — С. 136–140.
13. Орлянкин Б.Г. Цирковирусная инфекция свиней/Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов//Ветеринария с.-х. животных. — 2006. — № 12. — С. 17–21.
14. Орлянкин Б.Г. Цирковирусная инфекция свиней и меры борьбы с ней/Б.Г. Орлянкин//Ветеринария с.-х. животных. — 2005. — № 2. — С. 18–20.
15. Прискока В.А. Классична чума свиней (проблеми та перспективи)/В.А. Прискока, Ю.А. Собко, С.В. Аранчій//Дім, сад, город, 2000. — 180 с.
16. Проявление репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Армении/Х.В. Саркисян, А.С. Оганян, Т.Э. Гаспарян [и др.]/Актуал. пробл. инфекц. патологии животных: материалы Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2003. — С. 92–94.
17. Репродуктивно-респираторный синдром свиней/Т.З. Байбиков, А.А. Гусев, Н.А. Яременко [и др.]/Ветеринария. — 2001. — № 3. — С. 18–24.
18. Репродуктивный и респираторный синдром свиней/В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина//Вирусные болезни животных. — М.: ВНИТИБП, 1998. — С. 552–558.
19. Средства лабораторной диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней/Т.В. Гребенникова, А.Д. Забережний, Е.А. Непоклонов//Ветеринария. — 2005. — № 10. — С. 24–26.
20. Цирковирусные болезни свиней (ЦВБС)/В.И. Семенов, И.А. Болотский, А.К. Васильев, С.В. Пруцаков//Ветеринария Кубани. — 2009. — № 5. — С. 8–10.
21. Allan G.M. Porcine circoviruses: a review/G.M. Allan, J.A. Ellis//J. Vet. Diagn. Invest. — 2000. — № 12. — P. 3–14.
22. Antibodies to PRRS virus in serum banks of Ontario swine (1978–1982)/S. Carman, S.E. Sanford, S. Dea//Proc. 14th Int. PigVet. Soc. Congr. — Bologna, Italy, 1996. — P. 76.
23. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates/S. Dea, C.A. Gagnon, H. Mardassi [et al.]/Archives of Virology. — 2000. — V. 145. — P. 659–688.
24. Dulac G. Porcine circoviruses antigens in PK 15 cell line (ATCC CCLL 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs/G. Dulac, A. Afshar//Can. J. Vet. Res. — 1989. — V. 53. — P. 431–433.
25. Experimental infection of pigs with European-like (type 1) PRRS virus isolates of U.S. origin/S. Lawson, Y. Fang, R. Rowland [et al.]/Proc. 2005 International PRRS Symposium. — St. Louis, Missouri, 2005. — P. 42.
26. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.07_PRRS.pdf
27. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV-2) and nonpathogenic PCV 1 in weanling pigs/M. Fenaux, T. Opriessing, P.G. Halbur, X.J. Meng //J. Virol. — 2003. — V. 77. — P. 11232–11234.
28. Molecular epidemiology of EU-genotype PRRSV in Europe: clues to PRRSV emergence, and implications for disease control/T. Stadejek, M.B. Oleksiewicz, A.V. Scherbakov [et al.]/5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. — Krakow, Poland, 2007. — P. 135–136.
29. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes/T. Stadejek, M.B. Oleksiewicz, D. Potapchuk, K. Podgorska //J. Gen. Virol. — 2006. — V. 87. — № 7. — P. 1835–1841.
30. The Circoviridae/P. Lukert, D.F. de Boer, J.L. Dale et al.//Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.N.L. Bishop et al. — Vienna and New York: Springer Verlag, 1995. — P. 166–168.
31. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe/R. Forsberg, T. Storgaard, H.S. Nielsen [et al.]/Virology. — 2002. — V. 299, № 1. — P. 38–47.

Надійшла 17.02.2014.