

Identifikasi Sel-sel Target Virus Penyakit Jembrana dengan Teknik Imunositokimia Ganda

Identification of The Jembrana Disease Virus Target Cells by Double Immunocytochemistry Method

I Ketut Berata^{1*} dan I Nyoman Mantik Astawa²

¹Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jln. Tukad Banyu Poh VII No. 21 Denpasar Bali 80233

²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jln. Tukad Banyu Poh VII No. 21 Denpasar Bali 80233

E-mail: iketutberata@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The aim of the research is to identify of the Jembrana disease virus target cells by double immunocytochemistry method. The research used Bali cattle which was inoculated with Jembrana disease virus (JDV) intramuscularly. Second day of fever following of the JDV inoculation, the cattle was necropsied. The spleen of the cattle was took aseptically, and then was soaked into buffer formaldehyde 10% solution. Histological slide spleen was made by cryomicrotome. The histological slides were stained by double immunocytochemistry method. To identified of the cells subset, monoclonal antibody anti-BoCD₄⁺ or anti-BoCD₈⁺ and diamino benzidine (DAB) were used as substrate. In this staining, the JDV infected cells appeared in blue color and cells subset (BoCD₄⁺ or BoCD₈⁺) in brown color respectively. To Identified of the JDV infected cells, monoclonal antibody anticapsid-JDV (BBVet Denpasar), and nitro blue tetrazolium (NBT) as substrate. Result of the research showed that the JDV infected cells on the BoCD₄⁺ cells subset only, but not on the BoCD₈⁺ cells subset. The conclusion of the research is the BoCD₄⁺ cells subset is as target cells of JDV.

Key words: Jembrana disease virus, lymphoid organ, subset cells

Abstrak

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi sel target virus Jembrana dengan teknik imunositokimia ganda. Penelitian ini menggunakan sapi Bali yang diinokulasi dengan virus Jembrana secara intramuskuler. Pada demam hari kedua setelah inokulasi virus, sapi dinekropsi. Limpa diambil secara aseptik, kemudian direndam dalam buffer formalin 10% selama 24 jam. Potongan limpa diproses untuk pembuatan sediaan histologis dengan menggunakan cryomicrotome. Preparat histologis limpa diwarnai dengan teknik imunositokimia ganda. Untuk mengidentifikasi subset limfosit digunakan antibody monoklonal anti BoCD₄⁺ dan anti BoCD₈⁺, serta diamino benzidine (DAB) sebagai substrat. Pada pewarnaan ini, sel-sel terinfeksi akan tampak berwarna biru, sedangkan sel-sel marka BoCD₄⁺ atau BoCD₈⁺ akan tampak berwarna coklat. Untuk identifikasi sel-sel terinfeksi virus Jembrana digunakan antibodi monoklonal anti-capsid JDV (BB-Vet Denpasar) dan nitro blue tetrazolium (NBT) sebagai substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel yang terinfeksi virus Jembrana hanya bermarka BoCD₄⁺, dan sama sekali tidak pada sel BoCD₈⁺. Simpulan penelitian ini adalah sel-sel BoCD₄⁺ merupakan sel target virus Jembrana.

Kata kunci: Virus penyakit jembrana, organ limfoid, subset sel (BoCD₄⁺, BoCD₈⁺)

Diterima: 26 Oktober 2010, disetujui: 03 Januari 2011

Pendahuluan

Sapi Bali merupakan plasma nutfah yang harus dilestarikan dan dikembangkan untuk

kesejahteraan manusia. Sapi Bali memiliki berbagai keunggulan, diantaranya mudah beradaptasi pada lingkungan kritis, reproduksi, produksi karkas serta kualitas daging yang

tinggi (Martoyo, 2002). Kelemahan sapi Bali adalah sangat peka terhadap penyakit, salah satunya adalah terhadap penyakit Jembrana.

Virus penyebab penyakit Jembrana (JDV = *Jembrana disease virus*) dapat menginfeksi sel-sel limfosit sapi Bali, baik pada limpa, limfoglandula maupun limfosit darah perifer. Sel-sel terinfeksi JDV, merupakan bahan bioaktif yang penting dikembangkan dan dipelajari untuk tujuan berbagai aspek termasuk pengembangan sumber antigen untuk vaksin. Vaksin yang digunakan untuk penyakit Jembrana saat ini adalah jenis vaksin limpa yang merupakan suspensi limpa sapi yang sebelumnya diinokulasi JDV. Daya proteksi vaksin ini adalah 70% (Hartaningsih *et al.*, 2001). Kelemahan vaksin limpa adalah tindakan membunuh sapi donor yang melanggar kaidah bioetika. Oleh karena itu, pengembangan jenis vaksin alternatif terus dilakukan. Salah satu jenis vaksin alternatif yang mungkin dapat dikembangkan adalah vaksin kultur. Vaksin kultur sangat mungkin dikembangkan, mengingat sel-sel terinfeksi JDV dapat dikembangkan dengan teknik kultur dari limfosit yang berasal dari darah perifer (Astawa *et al.*, 2005). Seleksi dan propagasi sel-sel terinfeksi JDV dilakukan dalam kultur. Oleh karena itu, umur penyimpanan sel-sel terinfeksi JDV dengan teknik kultur tidak bisa lama perlu dipelajari pengembangan sel-sel terinfeksi JDV sebagai *cells line*. Aspek yang penting dipelajari adalah mengidentifikasi sel-sel target JDV berdasarkan subset selnya.

Sel-sel terinfeksi JDV merupakan limfosit bermarker BoCD_4^+ karena pada infeksi JDV terjadi penurunan rasio $\text{BoCD}_4^+/\text{BoCD}_8^+$ (Dharma, 1996). Analog dengan infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV), penurunan rasio $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ adalah akibat sel CD_4^+ sebagai sel target virus HIV (Amadori *et al.*, 1996). Sedangkan pada penyakit Jembrana, belum ada yang membuktikan bahwa limfosit bermarker BoCD_4^+ sebagai sel target JDV. Teknik yang memungkinkan untuk mengidentifikasi sel BoCD_4^+ sebagai sel target JDV adalah teknik imunositokimia ganda (*double labeling*). Ada dua aspek yang diidentifikasi dengan teknik imunositokimia ganda yaitu aspek ada atau tidak adanya infeksi, dan *marker* sel-sel, apakah BoCD_4^+ atau BoCD_8^+ yang terinfeksi

JDV. Teknik imunositokimia ganda dapat mengidentifikasi sel-sel terinfeksi JDV serta *marker* dari sel tersebut. Penelitian ini bertujuan mengetahui marker pada JDV (sel target JDV).

Metode Penelitian

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu penyiapan sapi Bali yang bebas penyakit Jembrana, penyiapan isolat virus penyakit Jembrana, inokulasi sapi Bali dengan JDV, proses pembuatan preparat *cryomicrotome*, proses pewarnaan imunositokimia ganda dan analisis hasil pemeriksaan.

Penyiapan Isolat Virus

Virus penyakit Jembrana (JDV) diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner (BBV) Denpasar, strain Tabanan /87. Limpa sapi terinfeksi JDV dicincang, kemudian digerus sampai lumat. Setelah penambahan fosfat buffer saline (PBS pH. 7,2) sampai konsentrasinya 15%, kemudian suspensi tersebut disentrifus 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipakai untuk menginokulasi sapi sehat yang telah disiapkan.

Penyiapan Sapi Bali

Penyiapan sapi Bali dilakukan sebagaimana penyiapan sapi yang akan digunakan sapi donor vaksin di Balai Besar Veteriner Denpasar.

Inokulasi JDV pada Sapi

Sapi Bali yang bebas penyakit Jembrana, diinokulasi dengan suspensi limpa 15% dari sapi terinfeksi JDV isolat Tabanan/87. Sebanyak 10 ml suspensi disuntikan secara intramuskuler.

Suhu tubuh sapi diukur setiap hari. Sapi dinekropsi ketika sapi menunjukkan gejala demam (hari kedua suhu rektal lebih besar $39,5^\circ\text{C}$). Organ limpa, limfoglandula prefemoralis, dan limfoglandula prescapularis diambil secara aseptis lalu disimpan pada suhu -20°C .

Pembuatan Jaringan Limpa untuk Uji Imunohistokimia

Jaringan limpa yang diberi OCT (Sigma, USA), dibekukan secara cepat ke dalam nitrogen cair. Jaringan tersebut dipotong setebal 4–5 μm dengan *cryomicrotome* pada suhu -20°C . Potongan jaringan segar diletakkan di atas gelas objek yang telah dilapisi *poly-L-lysine* 0,001% (Sigma, USA). Setelah dikeringkan di udara, jaringan difiksasi dengan aseton dingin yang mengandung H_2O_2 3%, selama 30 menit, kemudian pewarnaan imunositokimia ganda.

Pewarnaan Imunositokimia Ganda

Preparat yang akan diwarnai, difiksasi dengan metanol yang mengandung H_2O_2 3%. Kemudian preparat dicuci dengan PBS 2x5 menit. Preparat yang belum kering, digenangi dengan BSA 1% (*bovine serum albumine*), dan ditambah antibodi monoklonal (AbMo) primer, sesuai dengan prosedur yang telah ditentukan. Satu preparat ditambah (AbMo) anti- BoCD_4^+ , sedangkan preparat lain ditambah AbMo anti- BoCD_8^+ . Kedua AbMo dijaga agar tidak tercampur. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar, preparat dicuci dengan PBS 3x5 menit. Selanjutnya, preparat digenangi dengan konyugat *goat anti-mouse IgG* (Bio-Rad, USA) dengan pengenceran 1:800 dalam PBS yang mengandung BSA 1% dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Preparat dicuci dengan PBS 3x5 menit, kemudian ditambah *mouse PAP complex* dan diinkubasi selama 45 menit. Setelah pencucian 4x5 menit dengan PBS, marka limfosit T BoCD_4^+ atau BoCD_8^+ divisualisasikan dengan penambahan substrat diamino benzidine (DAB) 0,01% (Sigma, USA). Reaksi substrat dihentikan dengan air kran mengalir selama 15 menit. Limfosit T dengan *marker* BoCD_4^+ atau BoCD_8^+ akan berwarna coklat.

Untuk memvisualisasikan sel yang terinfeksi JDV pada jaringan/sel yang telah diwarnai dengan AbMo anti- BoCD_4^+ atau AbMo anti- BoCD_8^+ , preparat tadi difiksasi lagi dengan aseton dingin selama 10 menit. Preparat dicuci dengan PBS 2x5 menit. Selanjutnya digenangi dengan AbMo anticapsid-JDV yang telah dilabel biotin (BB-Vet Denpasar).

Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Preparat dicuci dengan PBS 3x5 menit. Selanjutnya jaringan/ sel pada preparat digenangi dengan streptavidin-alkaline-phosphatase (Promega, USA) pengenceran 1:200 dalam tris buffer saline (TBS), selama 15 menit. Setelah dicuci dengan PBS 3x5 menit, kemudian ditambahkan substrat 4-Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT) selama 15 menit. Preparat dicuci dengan air kran mengalir selama 5 menit. Jaringan dicelupkan dalam alkohol absolut 2x5 menit. Preparat dicelupkan dalam xylol 2x5 menit. Preparat dikeringkan, *mounting* dengan permount selanjutnya ditutup dengan *coverslip*. Limfosit terinfeksi JDV akan berwarna ungu kebiruan, karena substrat NBT. Jika pada preparat tampak ada sel berwarna coklat (subset limfosit T tertentu: BoCD_4^+ atau BoCD_8^+), dan sekaligus berwarna ungu kebiruan, maka subset limfosit itulah yang terinfeksi JDV. Berarti sel target JDV adalah sel yang berwarna kombinasi ungu kebiruan disertai warna coklat.

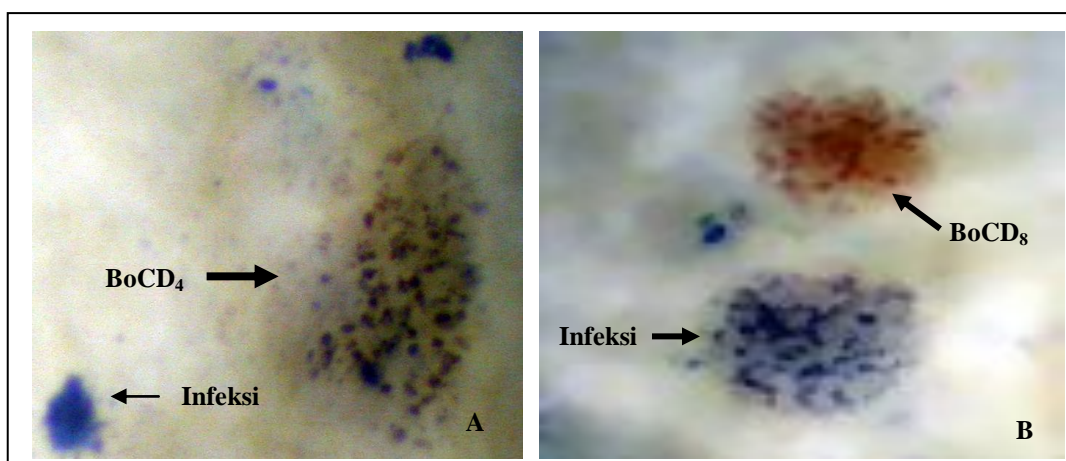
Hasil dan Pembahasan

Pada pewarnaan ganda (*double labeling*), jaringan limpa sapi bali terinfeksi JDV, tampak subset limfosit T BoCD_4^+ atau BoCD_8^+ berwarna coklat, karena digunakan substrat DAB (diamino benzidine). Sel limfosit terinfeksi JDV berwarna biru keunguan, karena digunakan substrat NBT (nitro blue tetrazolium chloride). Subset limfosit T yang terinfeksi JDV, ditandai dengan warna kombinasi antara coklat dengan biru keunguan (Gambar 2A) Ini berarti bahwa limfosit T ber*marker* BoCD_4^+ yang terinfeksi JDV. Pada jaringan limpa yang diwarnai dengan AbMo anti- BoCD_8^+ dan AbMo anti-JDV, limfosit yang berwarna coklat terpisah dari sel yang berwarna biru keunguan. Hal ini menunjukkan bahwa limfosit T BoCD_8^+ tidak terinfeksi JDV (Gambar 2B).

Hasil pewarnaan teknik imunositokimia ganda menunjukkan, bahwa banyak limfosit T BoCD_4^+ yang terinfeksi JDV. Limfosit T BoCD_4^+ juga hanya sedikit tidak terinfeksi JDV. Hasil ini menunjukkan, bahwa kebanyakan sel yang terinfeksi JDV adalah limfosit T BoCD_4^+ . Hal ini menyebabkan

terjadinya penurunan rasio subset limfosit T bermarker $BoCD_4^+/BoCD_8^+$ pada infeksi JDV, seperti yang dilaporkan oleh Dharma (1996) sehingga semakin kuat dugaan bahwa limfosit T $BoCD_4^+$ merupakan sel target utama JDV. Infeksi Lentivirus lainnya yaitu HIV, dilaporkan terutama menyerang limfosit CD_4^+ yang aktif, sehingga terjadi penurunan jumlah limfosit T CD_4^+ yang berlanjut pada keadaan imunodefisiensi (Pesaud *et al.*, 2000). Infeksi *feline immunodeficiency virus* (FIV) pada kucing, juga terjadi penurunan rasio subset limfosit T CD_4^+/CD_8^+ (Brown *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 2004). Pada sapi Bali yang terserang JDV, keadaan immunosupresi sementara juga telah dilaporkan (Dharma, 1996). Keterkaitan infeksi JDV pada limfosit T $BoCD_4^+$ (T helper) dengan keadaan immunosupresi, perlu penelitian lebih lanjut.

Virus JDV tampaknya tidak menginfeksi limfosit T $BoCD_8^+$. Semua limfosit T $BoCD_8^+$ (berwarna coklat), terwarnai secara terpisah dengan sel terinfeksi JDV (berwarna biru keunguan) (Gambar 2B). Virus JDV memiliki kesamaan dengan virus HIV karena infeksi HIV dilaporkan juga tidak menyerang limfosit T CD_8^+ (Lifson *et al.*, 1986; Gowda *et al.*, 1989; Eckstein *et al.*, 2001). Berbeda dengan infeksi FIV pada kucing, selain limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ juga terinfeksi (Brown *et al.*, 1991). *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) mampu menginfeksi limfosit T $BoCD_8^+$ (Whetstone *et al.*, 1997), tampaknya terdapat variasi sel-sel target diantara virus yang tergolong Lentivirus. Sel target virus dari golongan Lentivirus perlu diketahui untuk melakukan karakterisasi masing-masing virus pada hospesnya.



Gambar 1. Subset limfosit T pada jaringan limpa sapi Bali yang terinfeksi JDV, yang diwarnai dengan teknik immunositokimia ganda. Preparat hasil potongan tipis dengan cryomicrotome jaringan limpa di atas gelas objek, pertama diwarnai dengan teknik immunositokimia menggunakan AbMo anti- $BoCD_4^+$, atau anti- $BoCD_8^+$. Jaringan yang sama kemudian diwarnai dengan AbMo anti-Ca JDV. Warna coklat menunjukkan subset limfosit, sedangkan biru/ungu menunjukkan adanya infeksi JDV. A). Pewarnaan ganda dengan AbMo anti- $BoCD_4^+$ dan anti-JDV, tampak limfosit T $BoCD_4^+$ terinfeksi JDV. Tampak pula sel yang bukan limfosit T $BoCD_4^+$, yang terinfeksi JDV. B). Pewarnaan immunositokimia ganda dengan AbMo anti- $BoCD_8^+$ dan anti-JDV, tampak terpisah antara coklat dan biru yang menunjukkan limfosit T $BoCD_8^+$ tidak ada terinfeksi JDV (10x10).

Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa sel target virus penyakit

Jembrana adalah limfosit bermarker $BoCD_4^+$. Penurunan rasio subset limfosit $BoCD_4^+/BoCD_8^+$ pada infeksi virus penyakit Jembrana adalah akibat hilangnya sebagian sel bermarker $BoCD_4^+$.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang mekanisme hilangnya limfosit bermarker BoCD₄⁺, karena lisis oleh virus atau ekspresi markernya dihambat.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada DP2M DIKTI KEMDIKNAS RI, atas bantuan dana Penelitian Fundamental tahun 2009, Kepala Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Denpasar, atas fasilitas untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Amadori, A., Zamarchi, R. dan Bianchi, L.C. 1996. CD₄ : CD₈ Ratio and HIV Infection, The "Tap and Drain" Hypothesis. *Viewpoint Immunology Today*, 17 (9): 415-417.
- Astawa, N.M., Hartaningsih, N., Dharma, D.M.N., Tenaya, W.M., Budiantono dan Ekaana, W. 2005. Replikasi Virus Jembrana pada Kultur Limfosit Darah Tepi asal Sapi Bali. *J. Vet.*, 6 (4): 135-142.
- Berata, I.K. dan Astawa, N.M. 2007. Protein kapsid virus penyakit Jembrana menginduksi kekebalan seluler pada mencit. *J. Vet.*, 8 (3): 147-154.
- Brown, W.C., Bissey, L., Legan, K.S., Pedeson, N.C., Elder, J.H. dan Collison, E.W. 1991. Feline Immunodeficiency Virus Infects Both CD₄⁺ and CD₈⁺ Lymphocytes. *J. of Virol.*, 65: 3359-3364.
- Chadwick, B.J., Desport, M., Brownlie, J., Wilcox, G.E. dan Dharma, D.M.N. 1998. Detection of Jembrana Disease Virus in Spleen, Lymphnodes, Bone Marrow and Other Tissues by In Situ Hybridization of Paraffin-Emmbeded Sections. *J.of General Virol.*, 79: 101-106.
- Desport, M. 2002. A Differential Test for Jembrana Disease Virus and Bovine Immunodeficiency Virus. In: Hartaningsih, N. *Manual Diagnosa laboratorik Penyakit Jembrana*. Pp. 99-106. ACIAR-BPPV VI Denpasar.
- Dharma, D.M.N. 1996. The Pathology of Jembrana Disease. In: Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, D.M.N. & Copland, J.W. (Eds.). *Jembrana Disease and The Bovine Lentiviruses*. Pp. 26-28. ACIAR Proceedings No. 75.
- Dharma, D.M.N. 2002. Teknik Imunohisokimia. In: Hartaningsih, N. (Eds.). *Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana*. Pp.76-98. Materi kursus peningkatan metode diagnosa penyakit jembrana. ACIAR-BPPV VI Denpasar.
- Eckstein, D.A., Penn, M.L., Korin, Y.D., Scripture-Adams, D., Zack, J.A., Kreisberg, J.A., Roederer, M., Sherman, M.P., Chin, P.S. dan Goldsmith, M.A. 2001. HIV Actively Replicates in Native CD₄⁺ Residing in Human Lymphoid Tissues, *Immunity*. No.15. Pp. 671-682.
- Gowda, S.D., Stein, B.S., Mohagbenghpour, N., Benike, C.J. dan Englemen, E.G. 1989. Evidence that T Cells Activation is Required for HIV-1 Entry in CD₄⁺ Lymphocytes. *J. of Immunol.*, 142: 773-780.
- Hartaningsih, N., Dharma, D.M.N., Soeharsono, S. dan Wilcox, G.E. 2001. The Induction of Protective Immunity Against Jembrana Disease in Cattle by Vaccination With Inactivated Tissue-Derived Virus Antigens. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 78: 163-176.
- Joshi, A., Garg, H., Tompkins, M.B. dan Tompkins, W.A. 2004. Preferential Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection of CD₄⁺ CD₂₅⁺ T-regulatory Cells Correlates with Surface Expression of CxCR4 and Activation of FIV Long Terminal Repeat Binding Cellular Transcriptional Factors. *J. of Virol.*, 70: 4965-4976.
- Kertayadnya, G. 2002. Etiologi Penyakit Jembrana. In: Hartaningsih, N. Editor. *Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana*. Materi kursus peningkatan metode diagnosa penyakit jembrana. ACIAR-BPPV VI Denpasar. Pp.76-98.
- Lifson, J.D., Reyes, G.R., McGrath, M.S., Stein, B.S. dan Engleman, E.G. 1986. AIDS Retrovirus Induced Cytopathology: Giant Cell Formation and Involvement of CD₄ Antigen. *Science*, 232: 1123-1137.
- Martojo, H. 2002. A Simple selection program for smalholder Bali cattle farmers. In: Proceeding of an ACIAR Workshop on "Strategies to Improve Bali Cattle in Eastern Indonesia", Denpasar Bali, Indonesia.
- Mason, D.Y. dan Woolston, R.E. 1982. Double Immunoenzymatic Labeling. In: Bullock, G.R. and Petrusz, P. (Eds.). *Techniques in Immunochemistry*. Pp.135-154. Vol.1. Academic Press. London.

- Minguez, I., Rueda, A., Dominguez, J. dan Sanchez-Viscaino, J.M. 1988. Double Labeling Immunohistological Study of African Swine Virus-Infected Spleen and Lymph Nodes. *Vet. Pathol.*, 25: 193–198.
- Persaud, D., Peierston, T., Ruff, C., Finci, D., Chadwick, K.R., Margolic, J.B., Ruff, A., Hutton, N., Reay, S. dan Siliciano, R.F. 2000. A Stable Latent Reservoir for HIV-1 in Resting CD4+ Lymphocytes in Infected Children. *J. Clinical Investig.*, 105: 995–103.
- Taylor, J.M., Fahey, J.L., Detel, R. dan Giorgi, J.V. 1989. CD₄ Percentage, CD₄ Number, and CD₄-CD₈ Ratio in HIV Infection: Which to Choose and How to Use. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 2: 114–124.
- Teale, A.J., Baldwin, C.L., Morrison, W.I., Ellis, J. dan McHugh, N.D. 1987. Phenotypic and Functional Characteristics of Bovine T-Lymphocytes. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 17: 113–123.
- Temestte, M., Gruters, R.A., De Wolf, F., De Goide, R.E.Y., Lange, J.M.A., Schellekens, P.T.A., Goudsmith, J., Huisman, J.G. dan Midesma, F. 1989. Evidence for A Role of Virulent Human Immunodeficiency Virus (HIV) Variants in Pathogenesis of AIDS Obtained from A Panel of Sequential HIV Isolates. *J. of Virol.*, 63: 2118–2125.
- Whetstone, C.A., Suarez, D.L., Harp, J.A., Miller, J.M., Van der Maaten, M.J., Read, B. dan Wilcox, G.E. 1994. Bovine Lentivirus Infection in Bali Cattle (*Bos javanicus*), Following Infection with BIV. Workshop on Jembrana Disease and the Bovine Lentivirus. Denpasar Bali. *ACIAR Proceeding No.75*. Pp.128–132.
- Wilcox, G.E., Chadwick, B.J. dan Kertayadnya, G. 1995. Jembrana Disease Virus: A New Bovine Lentivirus Producing an Acute Severe Clinical Disease in *Bos javanicus* Cattle. Abstract in third International Congress on Veterinary Virology, Interleken, Switzerland. 4–7 September 1994.
- Xie, B., Shoida, T., Fukushima, M., Hu, H., Oka, S., Iwamoto, A. dan Nagai, Y. 1998. Facilitation of HIV Isolation from Patients by Neurominidase. *Archives of Virol.*, 143: 85–95.