



HAL
open science

Détection d'anticorps et d'antigènes du virus de Visna-Maedi par immunotransfert

C. Bosgiraud, M. Rucheton, J. Coste, J.M. Lemaire, J.A. Nicolas, M. Simeon
de Buochberg, L. Beaubatie

► **To cite this version:**

C. Bosgiraud, M. Rucheton, J. Coste, J.M. Lemaire, J.A. Nicolas, et al.. Détection d'anticorps et d'antigènes du virus de Visna-Maedi par immunotransfert. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1989, 20 (2), pp.187-193. hal-00901859

HAL Id: hal-00901859

<https://hal.science/hal-00901859v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Article de recherche

Détection d'anticorps et d'antigènes du virus de Visna-Maedi par immunotransfert

C. Bosgiraud¹, M. Rucheton², J. Coste³, J.M. Lemaire³,
J.A. Nicolas¹, M. Simeon de Buochberg⁴ et L. Beaubatie¹

¹ UER de Pharmacie, 2, rue du Docteur-Marcland, F-87025 Limoges Cedex,

² INSERM U291, 99, rue Puech Villa, F-34100 Montpellier,

³ Centre de Transfusion Sanguine, av. Emile-Jeanbrau, F-34000 Montpellier,

⁴ UER de Pharmacie, 15, av. Charles-Flahaut, F-34060 Montpellier Cedex, France

(accepté le 4-8-1988)

Résumé — La recherche des anticorps contre le virus Visna-Maedi a été réalisée par une technique immunoblot à partir d'une préparation antigénique du virus visna K796 purifié en coussin de saccharose.

Après électrophorèse sur SDS-PAGE et transfert sur nitrate de cellulose, la réaction par immunoblot a été adaptée à la recherche d'anticorps spécifiques contenus dans les sérums ovins. Les résultats obtenus ont montré que, dans la maladie naturelle due au virus visna-maedi, les anticorps n'apparaissent pas systématiquement contre toutes les protéines virales du core du virus. L'existence d'anticorps dirigés contre les protéines codées par le gène *gag* et le gène *pol* est démontrée.

virus du Visna-Maedi — immunotransfert — anticorps — antigène

Summary — **Detection of antibodies and antigens of Visna-Maedi virus by an immunoblotting technique.** *The visna-maedi virus was immunologically diagnosed using an immunoblotting technique from an antigenic preparation of the visna-maedi virus K796 purified by sucrose density gradient centrifugation.*

After SDS-PAGE electrophoresis and transfer onto a nitrocellulose sheet, the immunoblotting procedure was adapted to the search for specific antibodies in ovine serum samples.

The results obtained showed that, in the natural visna-maedi disease, antibodies are not systematically detectable against every viral protein of the virus core. We have demonstrated the existence of antibodies directed against the proteins coded by the gag and the pol genes.

Visna-Maedi virus — immunoblotting technique — antibody — antigen

Introduction

Le virus Visna-Maedi est un rétrovirus classé dans la famille des Lentivirinae. Il est responsable chez les ovins de deux

affections à évolution très lente mais cliniquement différentes. La maladie Visna est une encéphalopathie progressive démyélinisante (Sigurdsson et Palsson, 1958). La maladie Maedi est une pneumopathie

progressive interstielle (Sigurdsson, 1954).

Actuellement, la cinétique d'apparition des anticorps dans la maladie naturelle est mal connue et le contrôle immunologique des animaux infectés est difficile à interpréter.

Plusieurs types de réactions sérologiques ont été utilisées antérieurement pour déceler, dans l'infection naturelle ou expérimentale provoquée par ce lentivirus, la réponse humorale des ovins : la séroneutralisation (Thormar *et al.*, 1965; Petursson *et al.*, 1976; Sihvonen *et al.*, 1980), la réaction de fixation du complément (Gudnadottir et Kristinsdottir, 1967; Goel *et al.*, 1975), la réaction d'immunofluorescence indirecte (Biront *et al.*, 1981), la réaction d'immunodiffusion en gélose (Terpstra et de Boer, 1973; Cutlip *et al.*, 1977; Remond *et al.*, 1980) et la réaction ELISA (Houwens *et al.*, 1982; Vitu *et al.*, 1982). La séroneutralisation met en évidence des anticorps apparaissant tardivement après l'infection. Elle ne permet pas l'identification systématique des anticorps neutralisants dirigés contre les variants de la glycoprotéine d'enveloppe après déviation antigénique de la souche virale parentale au cours de l'infection lente.

Le titre des anticorps fixant le complément n'est pas constant et diminue dans le temps.

La réaction d'immunofluorescence indirecte a été peu utilisée. Les auteurs ne l'ont pas retenue à cause de son imprécision.

Actuellement la réaction d'immunodiffusion en gélose est le seul diagnostic sérologique reconnu à l'échelon international. C'est une réaction immunologique simple à réaliser et peu onéreuse, mais la composition de l'antigène en protéines virales n'est pas définie, et sa reproductibilité est de ce fait imparfaite. Elle reste

cependant une bonne méthode de dépistage de la maladie dans le cadre de grandes enquêtes épidémiologiques.

La technique ELISA se heurte à la difficulté d'obtention d'un antigène purifié. Or sa composition en protéines virales n'a pas été explicitement déterminée. De plus, le seuil de positivité de la réaction obtenu par comparaison avec des sérums de référence positifs et négatifs provenant d'animaux inoculés expérimentalement reste insuffisamment précise.

Devant cette imprécision des méthodes immunologiques pratiquées, il nous est apparu intéressant de mettre au point une méthodologie utilisant un antigène dont la composition en protéines virales est connue. Pour cela, nous avons utilisé une technique par immunotransfert. Les protéines virales d'un extrait antigénique purifié de virus visna cultivé sur cellules de plexus choroïde de mouton sont séparées sur gel de polyacrylamide et transférées sur nitrate de cellulose.

La présence de complexes immuns fixés sur les bandelettes de nitrate de cellulose, obtenus après réaction avec des sérums d'animaux séropositifs, est révélée par la protéine A radioactive après autoradiographie.

L'immunotransfert met en évidence la spécificité de la réaction antigène-anticorps entre les protéines du core du virus visna et leur précurseur, et la reverse transcriptase d'une part, et les anticorps correspondants contenus dans les sérums d'animaux infectés d'autre part.

Matériel et Méthodes

Antigène viral

La souche Visna K796 du Docteur Sigurdsson (Institute for Experimental Pathology, Reykjavik) nous a été aimablement fournie par le Doc-

teur Larenaudie du Laboratoire Central Vétérinaire d'Alfort. Elle est cultivée sur cellules primaires de plexus choroïde de mouton. La culture cellulaire reçoit 0,5 unités formant plages (UFP) virale par cellule. Après 3 h de contact, l'inoculum viral est rejeté, et remplacé par un milieu de survie. Ce milieu, le MEME, est additionné de 2% de sérum d'agneau. Le premier prélèvement de surnageant viral est effectué 48 h après, et ainsi toutes les 24 h jusqu'à destruction partielle du tapis cellulaire. Les surnageants rassemblés sont maintenus à 4°C en présence d'inhibiteurs enzymatiques : apronitine (Zymofren, Specia) 2 unités antikallicréine/ml et phényl méthyl sulfoxyde di-fluoride (PMSF) $0,2 \times 10^{-3}$ M. Les surnageants viraux sont clarifiés par centrifugation 20 min à 8 670 g à 4°C (rotor Beckman JA 10).

Le matériel viral est concentré par centrifugation 2 h 30 à 30 000 x g à 4°C (rotor Beckman JA 14).

Les culots secs sont rassemblés dans un volume minimum de Tris-HCl 10^{-2} M, NaCl 10^1 M, acide d'éthylènediamine tétraacétique (EDTA) 10^{-3} M (TNE), pH 7,5 à 4°C.

La purification de 6 ml de matériel viral est réalisée à travers deux coussins de saccharose 20% et 60% dans le tampon TNE : 6 ml de la solution de saccharose à 60% et 25 ml de la solution à 20%. Après ultracentrifugation 4 h à 100 000 x g (rotor Beckman SW 27) à 4°C, la bande virale localisée à l'interface des deux coussins, est récupérée. Le culot final de virus, obtenu après centrifugation 1 h à 100 000 x g à 4°C (rotor Beckman SW 40), est repris dans 1,2 ml de TNE pour un volume de surnageant viral initial égal à 1,2 l et congelé à -80°C.

Le taux de protéines virales est obtenu après titrage selon la micro-méthode de Lowry *et al.* (1951).

Sérums

Le sérum de référence anti-Visna Tv nous a été fourni par le Docteur Larenaudie (Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 94000 Maisons-Alfort). Il est obtenu à partir de jeunes ovins inoculés par voie intracérébrale par le virus visna K796.

Notre sérum témoin anti-Maedi (Tm) a été recueilli à partir d'un ovin atteint de la maladie Maedi et autopsié au Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de Limoges.

Les sérums à analyser Xv et Xm proviennent de deux animaux diagnostiqués et autop-

siés au laboratoire. Ils présentaient les symptômes cliniques caractéristiques, le premier d'une maladie visna, le second, d'une maladie maedi au dernier stade de l'infection, avec présence de manifestations histopathologiques évidentes. Ils provenaient d'un troupeau contaminé par le virus. Ils ont été testés par immunodiffusion en gélose (Remond *et al.*, 1980) et en ELISA (méthode non publiée à ce jour).

Les sérums N₁, N₂ et N₃ négatifs en immunodiffusion en gélose et ELISA, proviennent d'animaux de moins de 2 ans issus d'un troupeau exempt de Visna-Maedi.

Deux sérums monospécifiques nous ont été gracieusement fournis par R. Vigne de la Faculté de Médecine de Marseille. Le premier est un sérum de lapin anti-p26, le second est un sérum de mouton anti-gp135.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert

Les protéines virales sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 15% de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli et Fabre (1973). La quantité d'échantillon viral est calculée de manière à obtenir 10 µg de protéines virales par bandelette après transfert selon la méthode décrite par Rucheton *et al.* (1985). Le transfert des protéines est réalisé sur nitrate de cellulose (BA 83, Schleicher et Schull, GmbH D-3354 Dassel, FRG) dans un champ électrique (40 à 60 V/cm) pendant une nuit.

Après transfert, la feuille de nitrate est lavée avec un tampon PBS-Tween 20 à 3%, 15 min à 37 °C, sous agitation, rincée dans l'eau bi-distillée, puis saturée 10 min à 37 °C dans 3 x 10⁻² g/l de sérum albumine bovine. Le transfert est contrôlé par coloration du nitrate de cellulose à l'amido-noir à 0,1%. Les protéines résiduelles non transférées, restées sur le gel sont colorées au bleu de Coomassie à 5,4 x 10⁻⁴ g/ml.

La feuille de nitrate de cellulose est découpée en bandelettes de 2 mm de large et conservées à -20 °C.

Immunoblot

La réaction proprement dite est effectuée dans des plateaux à gouttières (CTS, Montpellier).

Les dilutions des sérums et les lavages successifs sont réalisés avec une solution à 140 ml/l de PBS Dulbecco 10 fois concentrée

(pH 7,2) additionnée de NaCl 0,1 M, Tween 20 (2 g/l), PMSF ($0,5 \times 10^{-3}$ M) et apronitrine (2,5 unités/ml). Le choix de la dilution de sérum à tester est définie à partir des sérums témoins positifs anti visna et anti maedi. Quatre dilutions sont respectivement utilisées : 1/10, 1/20, 1/50 et 1/250. La dilution 1/20 convient le mieux.

Les bandelettes sont rincées dans la solution de lavage, et les sérums à tester sont dilués au 1/20. Après 4 h de contact sous agitation à 22 °C, les bandelettes sont rincées 4 fois.

Elles sont ensuite incubées avec le réactif de Bolton et Hunter (Amersham, Buckinghamshire, UK) constitué de protéine A marquée à ^{125}I ode à raison de 10 à 12 000 cpm/cm² pendant une nuit à 4 °C sous agitation.

Après 6 rinçages successifs, les bandelettes sont autoradiographiées pendant 15 jours.

Résultats

L'analyse électrophorétique de la préparation antigénique du virus visna sur gel de polyacrylamide a montré une bonne migration des protéines virales. La charge en protéines de chaque bandelette a été déterminée de manière à obtenir avec le sérum témoin anti visna la présence de complexes immuns nettement visibles (Fig. 1).

Le sérum de référence anti visna (Tv) contient des anticorps dirigés contre les protéines p14, p16, p26, p46 et p70 du virus visna. Le sérum témoin anti maedi (Tm) contient des anticorps contre les protéines p26 et p46. Ils sont tous les deux positifs au 1/640 en ELISA. Les sérums à analyser Xv et Xm sont négatifs en immunodiffusion en gélose. Le sérum à tester Xm est positif au 1/60 en ELISA et contient des anticorps qui reconnaissent les protéines p14 et p46. Par contre le sérum Xv donne un résultat à la limite de la positivité en ELISA (1/40) et reste

négatif lorsqu'il est testé par immunotransfert. Les sérums N₁, N₂ et N₃ négatifs en immunodiffusion en gélose et en ELISA, ne reconnaissent pas les protéines de l'antigène viral.

L'utilisation d'anticorps monospécifiques anti-p26 met en évidence l'existence dans notre antigène viral d'une protéine reliée à la protéine p26, issue de la protéolyse du précurseur Pr55*gag*. Ce produit intermédiaire provenant du clivage du précurseur a un poids moléculaire de 46 000 Da (Fig. 2) : c'est p46. Le sérum monospécifique anti-p26 confirme l'existence des complexes immuns dirigés contre la protéine p26 majeure du core. Ils excluent une présence potentielle de pré-

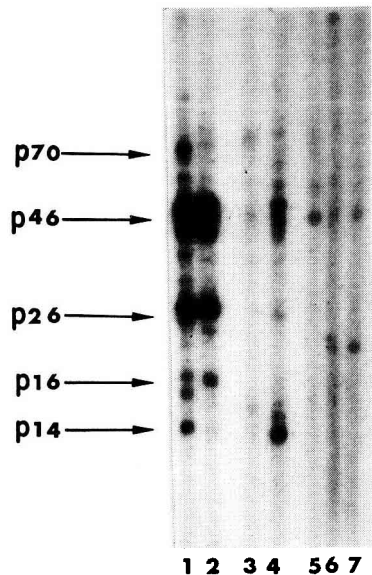


Fig. 1. Détection des anticorps dirigés contre les protéines du virus Visna-Maedi par immunotransfert. Antigène Visna-Maedi : 10 µg de protéines virales par bande. Sérums dilués au 1/20. 1 : sérum témoin positif Tv; 2 : sérum témoin positif Tm; 3 : sérum Xv; 4 : sérum Xm; 5, 6, 7 : sérums témoins négatifs N₁, N₂, N₃. Xv et Xm : sérums de deux animaux au stade final d'une Visna et d'une Maedi maladie. Xm est positif en ELISA, Xv est faiblement positif en ELISA.

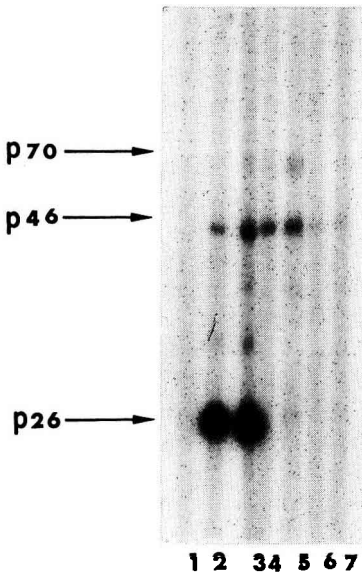


Fig. 2. Immunotransfert réalisé avec des sérums de référence monospécifiques. Antigène Visna-Maedi : 10 µg de protéines virales par bandes. 1 : sérum anti-gp135 dilué au 1/40; 2 : sérum anti-p26 dilué au 1/60; 3 : sérum anti-p26 dilué au 1/40; 4 : sérum témoin positif anti-maedi Tm dilué au 1/20; 5 : sérum témoin positif anti-visna Tv dilué au 1/20; 6 et 7 : sérums témoins négatifs N₁ et N₂ dilués au 1/20.

cipités d'origine cellulaire, non spécifiques.

La protéine p70 qui apparaît faiblement avec le sérum Tv correspondrait à la reverse transcriptase d'un poids moléculaire moyen de 70 000 Da.

Discussion

L'antigène viral que nous avons purifié montre des résultats comparables à ceux des préparations de virus radiomarqués utilisées par certains auteurs (Haase et Baringer, 1974; Lin, 1978; Vigne *et al.*, 1982). Ces auteurs ont identifié les pro-

téines du virus visna par radiomarquage. Leurs préparations virales marquées à la [³⁵S] méthionine (Lin, 1978; Vigne *et al.*, 1982) ou avec des acides aminés ¹⁴C (Haase et Baringer, 1974), puis analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, après immunoprécipitation, ont l'avantage de ne pas laisser apparaître les protéines cellulaires.

Notre préparation antigénique, obtenue à partir de grandes quantités de surnageants de culture infectées contient les trois protéines structurales majeures du core codées par le gène *gag* : p26, p16 et p14, et la reverse transcriptase p70 codée par le gène *pol*. Les sérums positifs, témoins et à tester, ont d'une manière répétitive des anticorps dirigés contre la protéine p46, protéine intermédiaire issue de l'expression de Pr55*gag*, principal précurseur des trois protéines du core.

Nous remarquons que le sérum témoin Tv provenant d'animaux inoculés expérimentalement contient des anticorps dirigés contre les trois protéines du core et leur précurseur et des anticorps dirigés contre la reverse transcriptase. Par contre, les animaux infectés par le virus dans la maladie naturelle n'ont pas dans leur sérum tous les anticorps dirigés contre toutes les protéines majeures. Ceci laisse présager la complexité de la réponse immunitaire dans la maladie naturelle et particulièrement à la phase terminale de l'infection. En effet dans cette dernière, l'inoculum de virus est beaucoup moins important qu'une inoculation expérimentale renfermant une forte dose de particules virales infectieuses. Au cours des infections lentes à Lentivirinae, les provirus maintiennent la persistance virale à l'intérieur de certaines cellules hôtes (Bosgraud *et al.*, 1987). De ce fait, la stimulation antigénique est limitée et la réponse humorale, liée à la libération irrégulière des diverses protéines virales est variable et difficile à mettre en évidence.

La réaction par immunotransfert, plus précise lorsque nous la comparons aux réactions d'immunodiffusion en gélose et ELISA, nous a permis une meilleure approche de l'interprétation de nos résultats. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide que nous avons effectuée avec l'antigène utilisé dans la réaction d'immunodiffusion en gélose est ininterprétable car elle ne nous a pas permis d'isoler les protéines virales individuellement. Cet antigène préparé par simple dialyse de surnageants de cultures infectées (Remond *et al.*, 1980) n'est pas purifié. Selon Cutlip *et al.* (1977) et Bruns *et al.* (1979) les anticorps précipitants sont essentiellement dirigés contre la glycoprotéine gp135.

Ce manque de spécificité oblige à utiliser en parallèle une deuxième réaction de type ELISA. Dans cette réaction l'antigène utilisé est purifié selon un protocole identique à celui employé dans l'immunotransfert. La comparaison de ces trois méthodes permet de vérifier que le sérum à tester Xm, négatif en immunodiffusion en gélose, contient en réalité des anticorps dirigés contre p14 et p46. La composition en protéines virales de l'antigène révélée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous a permis d'améliorer le procédé de purification des surnageants viraux et d'éviter la dégradation des virus en travaillant à froid (4 °C) en présence d'inhibiteurs enzymatiques. La fixation éventuelle des protéines non spécifiques sur le conjugué intervenant dans la réaction ELISA peut être responsable de résultats faussement positifs. L'immunotransfert démontre la négativité du sérum à tester Xv trouvé faiblement positif en ELISA.

L'utilisation des sérums monospécifiques anti-gp135 et anti-p26 confirme la spécificité de l'antigène que nous avons préparé. Nous pouvons éliminer ainsi les résultats faussement positifs des réac-

tions ELISA et immunodiffusion en gélose. En accord avec Lin et Thormar (1979) les bandes apparaissant entre p26 et p46 (Fig. 1) sont probablement des protéines cellulaires entraînées en même temps que le virus au cours de la purification.

L'utilisation des anticorps monoclonaux devrait rendre le diagnostic encore plus spécifique (Houwers et Shaake, 1987). Ces anticorps se fixent sur un seul épitope de l'antigène. Mais il faudrait pratiquement utiliser plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre les principaux épitopes de chaque protéine majeure.

Le diagnostic immunologique de la maladie Visna-Maedi par immunotransfert nous a permis de mettre en évidence, grâce à la lecture par autoradiographie, les différents types d'anticorps réagissant avec les protéines du virus Visna-Maedi. La mise au point d'une telle réaction offre des perspectives quant à son application au Western blot. Une telle méthodologie est très utilisée dans le diagnostic du SIDA et elle nous paraît être d'un réel intérêt pour une meilleure connaissance de la réponse immunitaire dans la maladie Visna-Maedi.

Remerciements

Nous remercions Hélène Valles pour sa compétence et son assistance technique.

Références

- Biront P., Charlier G. & De Smet A. (1981) Serologisch onderzoek met de indirecte immunofluorescentietest naar het voorkomen van Zwoegerziekte (maedi/visna) bij Texelshapen in België. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 50, 269-273
- Bosgiraud C., Nicolas J.A. & Simeon de Buochberg M. (1987) La pathogenèse du virus visna-

- maedi : modèle expérimental pour l'étude des Lentivirinae. *Med. Mal. Infect.* 3, 106-109
- Bruns M., Straub O.C., Weiland F. & Feilers A. (1979) Detection of antibodies against glycoprotein of maedi-visna virus released as soluble antigen in cell cultures. *Zentralbl. Veterinaer-med. B.* 26, 461-468
- Cutlip R.C., Jackson T.A. & Laird G.A. (1977) Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1081-1084
- Goel Y.P., Hajela S.K., Sharma D.N. & Dwivedi J.N. (1975) Complement-fixing antibodies for maedi in serum of sheep and goats in Uttar Pradesh. *Indian J. Anim. Sci.* 45, 804-808
- Gudnadottir M. & Kristinsdottir K. (1967) Complement-fixing antibodies in sera of sheep affected with visna and maedi. *J. Immunol.* 98, 663-667
- Haase A.T. & Baringer J.R. (1974) The structural polypeptides of RNA slow viruses. *Virology*, 57, 238-250
- Houwers D.J. & Scharke J. (1987) An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-stop assay. *J. Immunol. Methods* 98, 151-154
- Houwers D.J., Gielkens A.L.J. & Schaake J. (1982) An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.* 7, 209-219
- Laemmli U.K. & Fabre M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80, 575-599
- Lin F.H. (1978) Polyacrylamide gel electrophoresis of visna virus polypeptides isolated by agarose gel chromatography. *J. Virol.* 25, 207-214
- Lin F.H. & Thormar H. (1979) Precipitation of visna viral proteins by immune sera of rabbits and sheep. *J. Virol.* 29, 536-539
- Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Petursson G., Nathanson M., Georgsson G., Panitch H. & Palsson P.A. (1976) Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Lab. Invest.* 35, 402-412
- Remond M., Russo A., Giauffret A. & Larenaudie B. (1980) La méthode d'immunodiffusion en gélose. Application au diagnostic sérologique de la maladie maedi-visna du mouton. *Bull. Lab. Vet.* 1, 35-41
- Rucheton M., Graafland H., Fanton H., Ursule L., Ferrier P. & Larsen J.C. (1985) Presence of circulating antibodies against gag gene MuLV proteins in patients with autoimmune connective tissue disorders. *Virology* 144, 468-480
- Sigurdsson B. (1954) Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep : an epizootological and a pathological study. *Br. Vet. J.* 110, 255-270
- Sigurdsson B. & Palsson P.A. (1958) Visna of sheep. A slow, demyelinating infection. *Br. J. Exp. Path.* 39, 519-528
- Sihvonen L., Estola T. & Tuomi J. (1980) Experimental maedi infection in sheep. II. Antibody response. *Acta Vet. Scand.* 21, 124-133
- Terpstra C. & De Boer G.F. (1973) Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 43, 53-62
- Thormar H., Gislason G. & Helgadottir H. (1965) A survey of neutralizing antibodies against maedi virus in sera from flocks of sheep affected with maedi and from healthy flocks. *J. Infect. Dis.* 116, 41-47
- Vigne R., Filippi P., Querat G., Sauze N., Vitu C., Russo P. & Delori P. (1982) Precursor polypeptides to structural proteins of visna virus. *J. Virol.* 42, 1046-1056
- Vitu C., Russo P., Filippi P., Vigne R., Querat G. & Giauffret A. (1982) Une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-virus maedi-visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gélose et la fixation de complément. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 469-481