

## PROPAGATION OF AVIANPOX VIRUS VACCINE STRAINS IN MAMMALIAN MDBK CELL LINE

Konstantin Simeonov<sup>1</sup>, Ivan Ivanov<sup>1</sup>, Theodora Popova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Pathology and Parasitology,  
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia 1113, Bulgaria

<sup>2</sup>Forest technical University, Faculty of Veterinary Medicine, Sofia, Bulgaria

## РАЗМНОЖУВАЊЕ НА ВИДОВИ ВИРУС НА ПТИЧЈА ДИФТЕРИЈА ЗА ВАКЦИНА ВО ЦИЦАЧКАТА МДГБ ЛИНИЈА

Константи́н Симео́нов<sup>1</sup>, Иван Иванов<sup>1</sup>, Теодора Попова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт за експериментална патологија и паразитологија,  
Бугарска академија на науките, Софија 1113, Бугарија

<sup>2</sup>Шумарско-технички универзитет, Ветеринарен факултет, Софија, Бугарија

### ABSTRACT

The replication of vaccine-type embryo-adapted avipoxviruses FK and Dessau with fowl and pigeon origin, respectively, in mammalian epithelial-type cell line MDBK was studied. Viruses were propagated initially in chicken embryonating eggs and adapted later in primary duck embryo cells, before being transferred in MDBK cell line. Three to five days after inoculation cytopathic effect (CPE) appeared in infected cell cultures, but with only slight tendency for development. Strains FK and Dessau following the first passage had a titer of  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> and  $10^{3.33}$  TCID<sub>50</sub>, whereas after six passages the titer reached  $10^{5.33}$  TCID<sub>50</sub> and  $10^{4.67}$  TCID<sub>50</sub>, respectively. The fact that the FK and Dessau strains undergone six consecutive passages in mammalian MDBK cells with increasing of the titer shows that sufficient mature virions are realized to the extracellular medium. However, slow developing of CPE once it appear, suggest that avian poxviruses replicate productively in restricted number of infected mammalian cells.

### INTRODUCTION

Members of the Avipoxvirus (APV) genus cause a disease with cutaneous and, in some cases, mucous membranes lesions in free-living and domestic birds. The prevention of the disease is realized by vaccination with attenuated fowlpox virus (FPV) strains or antigenically related pigeonpox virus. They are commonly propagated in 10-12 days-old embryonating chicken eggs or in primary cell cultures of avian origin such as chicken embryo fibroblast (CEF), chicken embryo skin cells and chick kid-

### КРАТКА СОДРЖИНА

Беше проучувана репликацијата на ембрионално адаптираните и наменети за вакцина видови на вирусот на птичја дифтерија ФК и Десау со потекло од живина и гулаби во цицачката епителна клеточна линија МДГБ. Вирусите беа првично размножувани во пилешки ембрионални јајца и подоцна адаптирани во примарните ембрионални клетки на патките, пред да бидат пренесени во МДГБ клеточната линија. Три до пет дена после инокулацијата цитопатогениот ефект (ЦПЕ) се појави во инфицираните клеточни култури, но само со мала тенденција за развој. Видовите ФК и Десау по првиот премин имаа титар од  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> и  $10^{3.33}$  TCID<sub>50</sub>, додека пак по шест премина титарот достигна  $10^{5.33}$  TCID<sub>50</sub> и  $10^{4.67}$  TCID<sub>50</sub>. Фактот дека видовите ФК и Десау поминаа низ шест последователни премини во цицачките МДГБ клетки со зголемување на титарот покажува дека доволно зрели вириони се реализираше во вонклеточната подлога. Сепак, бавниот развој на ЦПЕ кога ќе се појави укажува на тоа дека вирусите на птичјата дифтерија се реплицираат продуктивно во ограничен број на инфицирани цицачки клетки.

### ВОВЕД

Членовите на родот на вирусите на птичја дифтерија (ВПД) предизвикуваат болести со кожни и во некои случаи со лезии на слузните мембрани кај дивите и домашните птици. Спречувањето на болеста се реализира со вакцинација со



ney cells. Although these cells are highly susceptible to FPV replication and could be used for a primary isolation and propagation of new strains, their preparation is relatively work- and time-consuming and SPF-eggs are need to avoid contamination of vaccines with other viruses. There exist only a restricted number of non-virus transformed avian permanent cell lines in contrast to mammalian ones. The data available (4, 5, 7, 8), show that FPV can infect mammalian cells, but does not productively replicates, although cytopathic effect (CPE) was observed. However, early and late gene expression, as well as genomic DNA replication have been observed in mammalian cell lines (4). Despite undergoing abortive replication in mammalian cells, fowlpox- and canarypox virus recombinants carrying genes of other viral pathogens have been found to produce sufficient antigen in mammalian cell cultures and to induce demonstrable immune responses *in vivo* (1, 3, 8). However, the expression of FPV-antigens in mammalian cells has not been investigated. If there exist expression of such of antigens then these cell lines could be utilized successfully in the diagnosis of avian pox, as well as for the production of recombinant viral vaccines.

Till now, cell cultures of only human and monkey origin have been used to study the replication of avianpox viruses in mammalian cells (3, 4, 5, 6, 8).

Here we present our preliminary data from trials to adapt and propagate vaccine fowl and pigeon pox strains FK and Dessau in a mammalian cell line of bovine origin - MDBK (Madin-Darby bovine kidney).

## MATERIAL AND METHODS

**Viruses and cells.** The embryo-adapted, vaccine avipoxvirus strains FK and Dessau of fowl and pigeon origin, respectively, at an unknown passage were used throughout the study. The virus suspensions were obtained from a homogenized chorioallantoic membranes of infected chicken embryos. Before being transferred to MDBK cells, virus strains were passaged ten times in primary duck embryo cells (DEC), prepared from 16-day old duck embryos by conventional methods. The virus stocks were prepared from the 10-th FK and Dessau strains passages in DEC and had a titer of  $10^{5.25}$  EID<sub>50</sub> and  $10^{3.0}$  EID<sub>50</sub>, respectively.

MDBK cells were grown in Eagle's minimum essential medium with Earle's salts (E'MEM, SIGMA Chemical Co.), supplemented with 6% newborn calf serum (NCS) and antibiotics in usual concentrations. Maintenance medium was supplemented with 2% NCS. Cells were growth in 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks or 24-well polystyrene plates and incubated at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator.

**Inoculation of cell cultures.** The MDBK cells were inoculated at 80% confluent monolayer. A 100 µl

ослабени видови на вирусот на дифтерија на живината (ВДЖ) или со антигено сродниот вирус на дифтерија на гулабите. Тие вообичеано се размножуваат во 10-12 дена стари ембрионални пилешки јајца или во примарните клеточни култури од птичјо потекло како што се пилешкиот ембрионален фибробласт (ПЕФ), пилешки ембрионални кожни клетки и пилешки бубрежни клетки. Иако овие клетки се многу подложни на репликација на ВДЖ и можат да се употребат за примарна изолација и размножување на новите видови, за нивното подготвување треба релативно многу работа и SPF-јајцата треба да избегнат контаминација со вакцини со други вируси. Постои само ограничен број на птичји постојани клеточни линии кои не се трансформирани од вирус за разлика од цицачките. Податоците кои ни се на располагање (4,5,7,8) покажуваат дека ВДЖ може да ги инфицира цицачките клетки, но не се реплицира продуктивно, иако цитопатогениот ефект (ЦПЕ) беше регистриран. Сепак, рана и доцна генска експресија, како и генomsка ДНК репликација беа регистрирани во цицачките клетки (4). И покрај тоа што имаа недоволно развиена репликација во цицачките клетки, се откри дека рекомбинантите на вирусите на дифтеријата на живината и канаринците кои носат и гени на други вирусни патогени произведуваат доволно антигени во цицачките клеточни култури и предизвикуваат пристојни имунолошки реакции *in vivo* (1,3,8). Сепак експресијата на ВДЖ во цицачките клетки не е испитана. Ако постои експресија на вакви антигени, тогаш овие клеточни линии можат успешно да се искористат при дијагностицирањето на птичјата дифтерија, како и за производство на рекомбинантни вирусни вакцини.

Се досега, само клеточните култури од човечко и мајмунско потекло беа користени во проучувањето на репликацијата на вирусите на птичјата дифтерија во цицачките клетки (3,4,5,6,8).

Овдека ги прикажуваме нашите прелиминарни податоци од обидите да се адаптираат и размножат видовите ФК и Десау на вирусите на дифтерија на живината и гулабите за вакцина во цицачката клеточна линија од говедско потекло - МДГБ (Мадин- Дарбиев говедски бубрег).

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

**Вируси и клетки.** Ембрионално адаптираните видови ФК и Десау на вирусите на птичја дифтерија за вакцина со потекло од живина и гулаби и се од непознат премин беа употребувани за цело време на проучувањето. Вирусните суспензии беа добиени од хомогенизираните хориоалантоисни мембрани на инфицираните пилешки ембриони.



per well of one-to-ten diluted stock viruses were allowed to adsorb for 60 min at 37°C. Cells were rinsed once with phosphate-buffered saline, pH 7.4 and maintenance medium was added. The infected cultures were incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> and were checked daily for the appearance of CPE. Mock-infected wells served as controls. The infected cells were harvested 144 hours post inoculation (p.i.) and after freezing and thawing for three times, cell debris was removed by low speed centrifugation. Supernatants prepared in this manner were used in the next passaging experiments.

**Infectivity assay.** The FK and Dessau virus suspensions from the first and the sixth passage in MDBK cells were titrated in the same cell culture by the conventional microtitration method. One hundred microliters ten-fold dilutions of each virus suspension were mixed in quadruplicate in 96-wells plates with the same volume MDBK cell suspension, having a concentration of  $8.10^4$  cells/ml. Mock-infected wells served as controls. The development of CPE was accepted as a criterion for virus replication. The 50% tissue-culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) were evaluated according to Reed and Muench.

In order to confirm the specificity of CPE observed, 200µl of virus suspension of FK strain from the sixth passage on MDBK cells were inoculated on the chorioallantoic membrane (CAM) of 11 day-old chicken embryos. Seven days later CAMs were harvested and checked for lesions, specific for replicating poxviruses.

## RESULTS

Both FK and Dessau strains induced CPE in MDBK cell cultures, even at their first passages. The initial signs of cellular degeneration appeared regularly 48 hours p.i. The CPE was characterized by the appearance of an increased number of rounded cells, detached from the monolayer, whereas foci of rounded cells with different size were observed later. The CPE developed slowly and areas of intact, non-damaged cells could be found 6 days p.i., when uninfected controls began to degenerate. The FK strain always showed an early CPE appearance and higher CPE levels than the Dessau strain. The results from the titration experiments of the two strains at the first and the sixth passages in MDBK cells are presented in Table 1.

**Table 1.** Infectivity assays of the first and the sixth passages of FK and Dessau strains in MDBK cell cultures.

STRAINS	PASSAGES	TITER (TCID <sub>50</sub> )
FK	1	$10^{4.5}$
	6	$10^{5.33}$
Dessau	1	$10^{3.33}$
	6	$10^{4.67}$

Пред да бидат пренесени во МДГБ клетките, видовите вирус беа пет пати преминати во примарните ембрионални клетки на патка (ЕКП), подготвени со конвенционални методи од ембриони на патка стари 16 дена. Вирусните резерви беа подготвени од десетите премини на видовите ФК и Десау во (ЕКП) и имаа титар од  $10^{5.25}$  EID<sub>50</sub> и  $10^{5.0}$  EID<sub>50</sub>, последователно.

МДГБ клетките беа одгледувани во Игло-вата минимална есенцијална подлога со Ерлови соли (E'MEM, SIGMA Chemical Co) со додаток на 6% серум од новородено теле (СНТ) и антибиотици во вообичаени концентрации. Подлогата за одржување имаше додаток од 2% СНТ. Клетките беа одгледувани во 25 cm<sup>2</sup> шишиња со ткивна култура или полистиренски чинии со 24 базенчиња и инкубирани на 37°C во CO<sub>2</sub> инкубатор.

**Инокулација на клеточни култури.** МДГБ клетките беа инокулирани на 80% конфлуентен монослој. 100 µl по базенче на еден-спрема-десет разредени резервни вируси беше дозволено 60 минути да се адсорбираат на 37°C. Клетките беа еднаш исплакнати со фосфатно пуфериран солени раствор, pH 7.4 и потоа беше додадена подлога за одржување. Инфицираните култури беа инкубирани на 37°C со присуство на 5% CO<sub>2</sub> и беа дневно проверувани за појава на ЦПЕ. Лажно инфицирани базенчиња служеа како контроли. Инфицираните клетки беа ожнеани 144 часа по инокулацијата (п.и.) и после три пати замрзнување и одмрзнување, клеточните остатоци беа отстранети со бавно центрифугирање. Супернатанти подготвени на овој начин беа употребувани во наредните експерименти со преминување.

**Анализа на инфективност.** ФК и Десау вирусните суспензии од првиот и шестиот премин во МДБГ клетките беа титрирани во истата клеточна култура со конвенционални методи на микротитрирање. 100 микролитри на секоја вирусна суспензија десет пати разредена беа четворно измешани во чинии со 96 базенчиња со ист волумен на суспензиите на МДГБ клетки со концентрација од  $8.10^4$  клетки/ml. Лажно инфицирани базенчиња служеа како контроли. Развојот на ЦПЕ беше прифатен како критериум за вирусна репликација. 50% инфективните дози на ткивна култура (ИДТК) беа проценети според Рид и Мунш.

За да се потврди специфичноста на забележаниот ЦПЕ, 200µl вирусна суспензија од ФК видот од шестиот премин во МДГБ клетките беа инокулирани врз хориоалантоисната мембрана (ХАМ) на пилешки ембриони стари 11 дена. Седум дена подоцна, ХАМ-ите беа ожнеани и проверени за лезии, специфични за вирусите на дифтерија кои се реплицираат.



The MDBK-cultured FK strain induced swelling of CAM and the appearance of yellow-whitish local proliferations. However, no well formed pocks were observed.

## DISCUSSION

The preliminary results presented, show that vaccine avipox virus strains FK and Dessau can infect and induce CPE in mammalian cell line MDBK. In these cells, the ability to induce CPE was saved at least six consecutive passages. In similar experiments, infectious viruses and CPE have been detected after three to four passages in cell lines Vero and MRC-5 of simian and human origin, respectively (8).

It is generally accepted that avian poxviruses are naturally restricted in that productive replication takes place only in susceptible avian species (1, 4, 5, 8). In this case, it is difficult to explain how the ability of the two strains investigated to induce CPE has been preserved in the course of passaging, if no progeny virus, capable to infect other cells, is generated. FPV has also been reported to induce a cytotoxic effect not associated with the production of infectious virus in human amniotic cells (Burnett J., and T. Frothingham, cited by (8)). However, by passaging experiments and particularly, in titration assays, the input virus in our investigations was highly diluted. Moreover, an increase of titres of both strains was observed when the virus suspensions from the first and the sixth passages were compared. These facts suggest that probably small number of mature virions have been generated.

Despite the development of CPE in FPV-infected MDBK cells its level never reached 100%. This fact lead to assumption, that these viruses undergo complete cycle of replication in a restricted number of cells or, most probably, only small numbers of mature virions, able to infect other cells are released in extracellular fluid. The formation of apparently mature virions, however, to a lesser extent than immature particles has also been observed in fibroblast-like cells of monkey origin (4).

It is also known, that two types of FPV particles are generated in infected avian cells - extracellular enveloped virus particles (EEV) and intracellular mature virions (IMV) (2). In our study infected cells were disrupted in order to release intracellular mature and immature viruses and next passages were made with suspensions, containing both extra- and intracellular viruses. Whether mature viruses are released in culture medium of infected MDBK cells or remain cell-associated have to be clarified.

The positive result from the adaptation trials in MDBK cells could be due also to the appropriate selection of epithelial-like cell culture, since poxviruses are known to be strong epitheliotropic agents. The fact, that

## РЕЗУЛТАТИ

И ФК и Десау видовите предизвикаа ЦП во МДГБ клеточните култури, дури и при нивните први премини. Првите знаци на клеточна дегенерација редовно се појавуваа 48 часа п.и. ЦПЕ беше карактеризиран со појава на зголемен број на заокружени клетки, одвоени од монослојот, додека пак жаришта на заокружени клетки со различна големина беа регистрирани подоцна. ЦПЕ се разви полека, но области со недопрени, неоштетени клетки можеа да бидат најдени 6 дена п.и., кога неинфицираните контроли почнуваа да дегенерираат. Видот ФК секогаш покажуваше рана појава на ЦПЕ и повисоки ЦПЕ нивоа отколку Десау видот. Резултатите од експериментите со титрации на двата вида при првиот и шестиот премин во МДГБ клетките се претставени во Табела 1.

МДГБ култивираниот вид ФК предизвика отечување на ХАМ и појава на жолто-белузлаво локални пролиферации. Сепак, не можеа да се забележат никакви добро оформени плакови.

## ДИСКУСИЈА

ПРЕЛИМИНАРНИТЕ РЕЗУЛТАТИ ПРЕТСТАВЕНИ ОВДЕ, ПОКАЖУВААТ ДЕКА ФК И ДЕСАУ ВИДОВИТЕ НА ВИРУСОТ НА ПТИЧЈА ДИФТЕРИЈА ЗА ВАКЦИНА МОЖЕ ДА ИНФИЦИРААТ И ДА ПРЕДИЗВИКААТ ЦПЕ ВО ЦИЧКАТА КЛЕТОЧНА ЛИНИЈА МДГБ. ВО ОВИЕ КЛЕТКИ, СПОСОБНОСТА ДА СЕ ПРЕДИЗВИКА ЦПЕ БЕШЕ ЗАЧУВАНА БАРЕМ ВО ШЕСТ ПОСЛЕДОВАТЕЛНИ ПРЕМИНИ. ВО СЛИЧНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ, ИНФЕКТИВНИТЕ ВИРУСИ И ЦПЕ БЕА ОТКРИЕНИ ПОСЛЕ ТРИ ДО ЧЕТИРИ ПРЕМИНИ ВО КЛЕТОЧНИТЕ ЛИНИИ ВЕРО И МРC-5 ПОСЛЕДОВАТЕЛНО ОД МАЈМУНСКО И ЧОВЕЧКО ПОТЕКЛО (8).

ОПШТО Е ПРИФАТЕНО ДЕКА ВИРУСИТЕ НА ПТИЧЈАТА ДИФТЕРИЈА СЕ ПРИРОДНО ОГРАНИЧЕНИ СО ТОА ШТО ПРОДУКТИВНАТА РЕПЛИКАЦИЈА СЕ ОДВИВА САМО ВО ПОДЛОЖНИТЕ ВИДОВИ ПТИЦИ (1,4,5,8). ВО ОВОЈ СЛУЧАЈ, ТЕШКО Е ДА СЕ ОБЈАСНИ КАКО СПОСОБНОСТА НА ПРОУЧУВАНИТЕ ДВА ВИДА ДА ПРЕДИЗВИКААТ ЦПЕ БЕШЕ ЗАЧУВАНА ЗА ВРЕМЕ НА ПРЕМИНУВАЊАТА, АКО НЕ СЕ ГЕНЕРИРА НИТУ ЕДЕН ВИРУС ПОТОМОК СПОСОБЕН ДА ИНФИЦИРА ДРУГИ КЛЕТКИ. ЗА ВДЖ ИСТО ТАКА СЕ ИЗВЕСТУВА ДЕКА ПРЕДИЗВИКУВА ЦИТОТОКСИЧЕН ЕФЕКТ КОЈ НЕ Е ПОВРЗАН СО ПРОИЗВОДСТВОТО НА ИНФЕКТИВНИ ВИРУСИ ВО ЧОВЕЧКИТЕ ПЛОВОДИ КЛЕТКИ (БАРНЕТ Ј. И Т. ФРОТИНГАМ, ЦИТИРАНИ ВО (8)). НО, ВО ЕКСПЕРИМЕНТИТЕ СО ПРЕМИНУВАЊЕ И ОСОБЕНО ВО АНАЛИЗИТЕ НА ТИТРИРАЊЕТО, УПОТРЕБЕНИОТ ВИРУС ВО НАШИТЕ ИСТРАЖУВАЊА БЕШЕ МНОГУ РАЗРЕДЕН. ПОНАТАМУ, БЕА ЗАБЕЛЕЖАНИ ЗГОЛЕМУВАЊА НА ТИТРИТЕ НА ДВАТА ВИДА КОГА ВИРУСНИТЕ СУСПЕНЗИИ ОД ПРВИОТ И ШЕСТИОТ ПРЕМИН БЕА СПОРЕ-



the two strains were adapted in primary DEC, before transferring to the MDBK cell cultures, could not be excluded either.

When chick embryos were inoculated with the sixth passage of MDBK-grown FK strain, swelling of CAMs and local proliferations were observed. These findings support the assumption that infectious virions were produced in MDBK cells. On the other hand, the absence of well-formed pocks, suggest that avian pox viruses probably undergo some alterations after cultivation in heterologous cells.

The preliminary results presented here need to be verified by additional passaging experiments and electron microscopy. Nevertheless, it appears highly probable the APV-infected MDBK cell cultures could be used for production of serological tests, such as immunofluorescence and ELISA. This cell line could also be suitable for propagation of APV recombinants, carrying foreign genes of mammalian viruses and especially, infecting cattle.

Овие факти укажуваат на тоа дека веројатно мал број на зрели вириони биле генерирани.

И покрај развојот на ЦПЕ во МДГБ клетки инфицирани со ВДЖ, неговото ниво никогаш не достигна 100%. Овој факт води кон претпоставката дека овие вируси поминуваат низ целосен циклус на репликација во ограничен број на клетки или пак што е поверојатно само мал број на зрели вириони способни да инфицираат други клетки се ослободуваат во вонклеточната течност. Формирањето на очигледно зрели вириони, сепак во помала мера од незрелите честички, беше регистрирано во фибробластовидните клетки од мајмунско потекло (4).

Исто така е познато дека два типа на ВДЖ честички се создаваат во инфицираните птичји клетки - вонклеточно обвиткани вирусни честички (ВОВЧ) и внатрешноклеточни зрели вириони (ВЗВ) (2). Во нашето проучување инфицираните клетки беа нарушени за да се ослободат внатрешноклеточните зрели и незрели вируси и наредните премини беа изведени со суспензии кои содржеа вон- и внатрешноклеточни вируси. Останува да се разјасни дали зрелите вируси се ослободуваат во подлоги на култури или инфицирани МДГБ клетки или пак остануваат поврзани со клетките.

Позитивните резултати од обидите за адаптација во МДГБ клетките може да исто така да се должат на соодветната селекција на епителовидните клеточни култури, бидејќи е познато дека вирусите на дифтерија се силни епителотрофни агенти. Фактот дека двата вида беа адаптирани во примарни ЕКП пред да бидат пренесени во МДГБ клеточните култури исто така не може да се исклучи.

Кога пилешките ембриони беа инокулирани со шестиот премин на МДГБ одгледуваниот ФК вид, беа регистрирани отечувања на ХАМ-ите и локални пролиферации. Овие наоди ја поткрепуваат претпоставката дека инфективни вириони беа произведени во МДГБ клетките. Од друга страна пак, отсуството на добро формирани плакови укажува дека вирусите на птичјата дифтерија веројатно претрпуваат одредени промени после култивацијата во хетеролошките клетки.

ПРЕЛИМИНАРНИТЕ РЕЗУЛТАТИ ДАДЕНИ ОВДЕ треба да се потврдат со додатни експерименти со пасажи и електронска микроскопија. Сепак, се чини многу веројатно дека МДГБ клеточните култури инфицирани со ВПД може да се употребат за производство на серолошки тестови, како што се имунофлуоресценција и ELISA. Оваа клеточна линија може исто така да биде погодна за размножување на ВПД рекомбинанти кои носат туѓи гени на цицачки вируси и особено кои го инфицираат добитокот.

---

**REFERENCES**

---

1. Baxby, D. and E. Paoletti. Potential use of non-replicating vectors as recombinant vaccines. *Vaccine*, 10(1), 1992, 8-9.
  2. Boulanger, D., T. Smith, M. A. Skinner. Morphogenesis and release of fowlpox virus. *J. Gen. Virology*, 81(3), 2000, 675-687.
  3. Fang Zhi-Yu, I. Kuli-Zade, P. Spearman. Efficient Human Immunodeficiency virus (HIV-1) gag-env pseudovirion formation elicited from mammalian cells by a Canarypox HIV vaccine candidate. *J. Inf. Dis.*, 79(2), 1998, 347-352.
  4. Somogyi, P., J. Frazier, M. A. Skinner. Fowl pox virus host range restriction: gene expression, DNA replication and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology*, 197(1), 1993, 439-444.
  5. Stannard, L. M., D. Marais, D. Kow, K. R. Dumbell. Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. *J. Gen. Virol.*, 79, 1998, 1637-1646.
  6. Tartaglia, J., O. Jarrett, J. C. Neil, P. Desmetre, E. Paoletti. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J. Virol.*, 67, 1993, 2370-2375.
  7. Taylor, J. and E. Paoletti. Fowlpox virus as a vector in non-avian species. *Vaccine*, 6, 1988, 466-468.
  8. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmetre, E. Paoletti. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine*, 6, 497-503.
-