

# Znaczenie ELISA w epidemiologii i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, ZYGMUNT PEJSAK

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Truszczyński M., Pejsak Z.

## Importance of ELISA in epidemiology and control of animal infectious diseases

Summary

The increasing application of ELISA in monitoring and surveillance of infectious diseases of animals as well as the validation of diagnostic test kits as the prerequisite of their high performance have been stressed. On the basis of the examples of PRRS Aujeszky's disease, classical swine fever and foot-and-mouth-disease of cattle as well as the role of ELISA in diagnosing and establishing the disease-free status of the country were presented.

**Keywords:** ELISA, PRRS, Aujeszky's disease, classical swine fever, FMD

### Porównanie ELISA z innymi metodami diagnostyki laboratoryjnej

Metody, czyli testy serologiczne, znajdują na tle innych laboratoryjnych metod diagnostycznych szczególnie szerokie i ciągle wzrastające zastosowanie w rozpoznawaniu i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (16, 17). Wynika to z ich technicznie łatwiejszego wykonania od metod bezpośredniej identyfikacji chorobotwórczego drobnoustroju. Umożliwiają one badanie dużej liczby zwierząt w stosunkowo krótkim czasie i przy mniejszym nakładzie kosztów. Dodać należy, że przy spełnieniu wymaganych warunków (16, 17), o których będzie mowa, mimo pewnych ograniczeń w stosunku do metod bezpośredniej identyfikacji patogenu (chodzi bowiem o wykazanie u zakażonego zwierzęcia wytwarzanych przez nie swoistych przeciwciał, a nie samego patogenu), uzyskuje się wiarygodne i wartościowe informacje.

Spośród licznych metod serologicznych (np. aglutynacja, precypitacja, odczyn wiązania dopełniacza) najbardziej przydatna w wymienionych badaniach okazuje się metoda immunoenzymatyczna, ELISA (3, 16, 17). ELISA odznacza się wysoką czułością. Stwarza zatem możliwość stwierdzenia w surowicy badanej nawet niskich stężeń przeciwciał, niewykrywalnych innymi metodami serologicznymi (3). Cechuje się również dużym stopniem specyficznością. W rezultacie uzyskuje się małą liczbę odczynów fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych (3, 16, 17).

Pomiaru stężenia przeciwciał (odpowiednika miana surowicy przy zastosowaniu innych metod serologicznych, np. aglutynacji) dokonuje się przez porównanie gęstości optycznej, czyli OD (optical density) surowicy badanej z OD dodatniej surowicy standardowej, występującej w zestawie diagnostycznym ELISA (3, 16, 17). Wyraża to stosunek wartości OD próbki surowicy badanej, czyli S (= sample), do surowicy dodatniej, czyli P (= positive), określany jako S/P.

W celu zapewnienia testowi ELISA wysokiej efektywności i wartości (performance), na którą składa się analityczna i diagnostyczna czułość i specyficzność, precyzja i dokładność, powtarzalność i odtwarzalność, musi on być (podobnie jak inne testy diagnostyczne) poddany procesowi walidacji, czyli ocenie gwarantującej wymaganą wartość wymienionych parametrów (16, 17). Pozytywnie zakończona walidacja potwierdza, że dany test diagnostyczny spełnia wymagania, zapewniając uzyskanie wiarygodnego wyniku, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy.

Ważną rolę w procesie walidacji odgrywiają standardy międzynarodowe: surowica wysoce dodatnia w odniesieniu do czynnika etiologicznego danej choroby zakaźnej, surowica nisko dodatnia (np. o S/P = 0,4) reprezentująca miano progowe lub zbliżone do progowego – oraz surowica ujemna, w której stosowaną metodą badawczą nie stwierdza się swoistych przeciwciał.

Standardy te opracowywane i wytwarzane są w laboratoriach uznanych przez autorytatywne organizacje, jak np. Światową Organizację Zdrowia (WHO) lub Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE), jako referencyjne w skali międzynarodowej (16, 17). Są nimi wybrane laboratoria państwowe. Standardy mogą być również opracowywane i wytwarzane przez laboratoria prywatne, znajdujące się w ramach przemysłu bioweterynaryjnego. Produkowane przez firmy prywatne dla celów komercyjnych standardy i zestawy do diagnostyki serologicznej, w tym zestawy ELISA, muszą jednakże przechodzić proces walidacji, kontrolowany przez miarodajne czynniki państwowe. W przypadku zestawów ELISA zwalidowane standardy surowic są do nich włączane (16, 17).

W odniesieniu do szeregu innych niż ELISA metod badawczych (np. odczynu aglutynacji lub wiązania dopełniacza), międzynarodowe standardy surowic są przekazywane do krajowych laboratoriów referencyjnych – w Polsce do Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, gdzie na ich

podstawie sporządzane są standardy krajowe. Te zaś dostarczane są do laboratoriów regionalnych, czyli Zakładów Higieny Weterynaryjnej poszczególnych województw w celu zapewnienia wiarygodności wyników. Tym sposobem uzyskuje się harmonizację poszczególnych metod, służących rozpoznawaniu chorób zakaźnych zwierząt w skali światowej. Dodać należy, że zestawy diagnostyczne ELISA stwarzają możliwość automatyzacji badań oraz elektronicznej rejestracji i analizowania wyników przy użyciu komputera, co w odniesieniu do szeregu innych metod nie jest możliwe (3).

### Wykorzystanie ELISA dla celów weterynaryjnych

Odnosi się ono do: 1) wykrycia pierwszych, względnie nowych przypadków określonej choroby zakaźnej (incidence); 2) ustalenia odsetka zakażonych zwierząt w stadzie lub szerzej, w szeregu stad zlokalizowanych na terenie kraju lub jego regionu – w określonym punkcie czasowym – (prevalence); 3) monitorowania (monitoring), czyli badania zwierząt, znajdujących się z reguły w dużej grupie, zwłaszcza w celu potwierdzenia lub nie potwierdzenia, że wchodząca w grę populacja jest wolna od choroby; 4) wspomagania zwalczania choroby zakaźnej przez okresowe sprawdzanie, czy w wyniku realizowanego postępowania lekarsko-weterynaryjnego liczba zwierząt reagujących dodatkowo zmniejsza się i w jakim stopniu lub też nie obserwuje się tego rodzaju efektu (surveillance). Ostatecznie chodzi o udokumentowanie za pomocą ELISA, że krajowi względnie regionowi należy przyznać status obszaru wolnego od danej choroby, np. klasycznego pomoru świń lub przyszczy (disease free status).

ELISA stanowi polecaną przez OIE (16) metodę diagnostyczną (prescribed test) do badania zwierząt w związku z importem lub eksportem w następujących chorobach: przyszczyca, pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej, księgosusz, choroba niebieskiego języka, afrykański pomór koni, afrykański pomór świń, klasyczny pomór świń, choroba Aujeszky'ego, brucelozą bydła, enzootyczna białaczka bydła, otręt bydła (IBR/IPV), zespół rozrodzo-oddechowy świń (PRRS). Wymienioną metodę dla tych samych celów uznaje OIE (16) jako alternatywną (alternative test), czyli o nieco mniejszej wartości diagnostycznej, w kolejno wymienionych chorobach: zaraza płucna bydła, gorączka Doliny Rift, choroba pęcherzykowa świń, pomór małych przeżuwaczy, paratuberkuloza, włośnica, babeszjoza, zapalenie najdźrzy tryków (wywołane przez *Brucella ovis*), zapalenie stawów i mózgu oraz choroba Maedi-Visna owiec i kóz, zaraza stadnicza, niedokrwistość zakaźna koni, koronawirusowe zapalenie żołądka i jelit świń, choroba Gumboro, zakaźne zapalenie oskrzeli ptaków i zakaźne zapalenie krtani i tchawicy ptaków.

Skuteczność i wartość ELISA w określaniu sytuacji epidemiologicznej w grupie zwierząt zależy od właściwości związanych z tym testem, ale też od dynamiki rozprzestrzeniania się zarazka. W przypadku populacji wrażliwej i dużej zakaźności czynnika etiologicznego, czego efektem jest zakażenie w krótkim czasie dużego odsetka zwierząt w danej grupie, szansa na wykrycie seroreagentów jest duża. Natomiast przy infekcji utrzymującej się przez czas dłuższy (powyżej kilku miesięcy) i jej przewlekłym przebiegu w stadzie poziom swoistych przeciwciał w surowicy krwi z czasem się obniża. Wtedy, mimo dużego odsetka zaka-

Tab. 1. Liczba próbek pobieranych do badań testem ELISA, potrzebnych do wykrycia co najmniej jednego zakażonego osobnika w różnych liczbowo populacjach, w zależności od stopnia zakażenia (6)

Liczba zwierząt w populacji	Przypuszczalny odsetek zwierząt zakażonych					
	≥ 10% (zakażenie małego stopnia)		≥ 20% (zakażenie średniego stopnia)		≥ 30% (zakażenie dużego stopnia)	
	95%*	99%*	95%*	99%*	95%*	99%*
≤ 100	25**	36	13	19	9	13
101-200	27	40	13	20	9	13
201-300	28	41	14	20	9	13
301-500	28	42	14	21	9	13
501-1000	29	43	14	21	9	13
> 1000	29	44	14	21	9	13

Objaśnienia: \* procent pewności wykrycia zakażenia w danej populacji, \*\* liczba pobranych próbek

żonych w stadzie zwierząt, szanse ich wykrycia nawet tak czułą metodą, jaką jest ELISA, są znacznie mniejsze. W takiej sytuacji liczba pobranych próbek musi być większa niż w przypadku infekcji cechującej się dużą dynamiką szerzenia się w stadzie (2).

Istotne jest zatem określenie, od jakiego odsetka ocenianego stada zwierząt ma być pobrana krew, by uzyskany w odniesieniu do całej grupy zwierząt wynik obrazował stopień zakażenia. Dodatkowo, dla określenia dynamiki sytuacji epidemiologicznej w stadzie niezbędne jest powtórzenie badań tych samych zwierząt co najmniej jeden raz a raczej kilkakrotnie, w odstępach kilku do kilkunastu tygodni. Zbadanie wszystkich zwierząt, co najmniej dwukrotnie, daje najbardziej wiarygodne informacje o zakresie i dynamice szerzenia się infekcji. Jednakże ze względów ekonomicznych i/lub technicznych może to być niemożliwe. W związku z tym podjęto badania, w których wyniku okazało się, że w celu uzyskania znacznego stopnia pewności o występowaniu określonej infekcji w stadzie nie jest konieczne zbadanie wszystkich zwierząt, a określonego ich odsetka (6). Bliższe dane na ten temat przedstawia tab. 1.

### Przykład PRRS

ELISA zaliczana jest do tzw. testów szybkich (quick tests) w przeciwieństwie do tzw. testów wolnych (slow tests), do których należy test seroneutralizacji – SN (5, 12). Określenie „szybki” łączy się z możliwością wykrycia w przypadku zespołu rozrodzo-oddechowego świń (PRRS) przeciwciał swoistych już 7 dni po zakażeniu (20). Dodatkowo, testem tym po 10 dniach od zakażenia można wykazać miana S/P > 2,00. Stosując w analogicznej sytuacji test SN, stwierdza się dopiero po 3-4 tygodniach od infekcji przeciwciała przy rozcieńczeniu surowicy 1 : 4, co odpowiada S/P 0,4, czyli wynikowi dodatniemu w teście ELISA. Po takim czasie ELISA wykazuje w tej samej surowicy S/P w granicach 2,00 (5, 12, 19, 20). Możliwie najwcześniejsze wykrycie zwierzęcia zakażonego i jego natychmiastowe wyeliminowanie ze stada ma istotne znaczenie w przeciwdziałaniu szerzenia się infekcji. Wiadomo natomiast, że siewstwo w przypadku PRRS zanika za-

zwyczaj po 2-4 tygodniach licząc od infekcji, czyli wtedy, kiedy przy użyciu SN osobnik zakażony może być dopiero jako taki określony (2). Dodatkowo, test SN, niezależnie od mniejszej czułości niż ELISA, jest technicznie trudniejszy do wykonania (niezbędność zakładania hodowli komórkowej) i droższy.

Przeciwciała anti-PRRS określane testem ELISA utrzymują się przez 7 miesięcy. Natomiast wykrywane testem SN wykrywalne są przez ponad rok (19, 20), co wskazuje, że w celu określenia długo utrzymujących się zakażeń jest on bardziej przydatny niż ELISA.

W związku ze stosunkowo najwcześniejszą możliwością stwierdzenia przeciwciał swoistych dla wirusa PRRS przy zastosowaniu ELISA stanowi on jednak najczęściej używaną metodę badania populacji świń, w celu potwierdzenia, że badana grupa zwierząt jest wolna od infekcji albo z nielicznymi osobnikami zakażonymi. Z tych samych względów używa się ELISA u świń przed przetrzuciem i/lub wprowadzeniem do populacji wolnej od infekcji. Ma to również miejsce dla potwierdzenia, że w populacji uznanej na podstawie poprzedniego badania za niezainfekowaną nie pojawiły się osobniki zakażone.

Dodać należy, że uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego przy zastosowaniu każdego testu serologicznego, w tym również ELISA, może mieć wysoce szkodliwe skutki, jeżeli na tej podstawie nastąpi wprowadzenie do populacji dotychczas wolnej od zakażenia jednego lub kilku zwierząt zakażonych wirusem PRRS. Analogiczne zagrożenie dotyczy innych chorób zakaźnych. Z drugiej strony, wyniki fałszywie dodatnie mogą dać podstawę do nieuzasadnionego eliminowania ze stada zwierząt niezakażonych. Oba rodzaje błędów są przyczyną strat gospodarczych. Ich zminimalizowanie zależy od diagnostycznej czułości i specyficzności stosowanego w przeglądach serologicznych testu.

Wpływ na diagnozę ma w przedstawionym kontekście próg między wynikiem dodatnim i ujemnym (cut-off), ustalany w pewnym stopniu arbitralnie. Istnieje bowiem zależność: im mniejsza czułość tym większa specyficzność i odwrotnie (17). Praktycznie, jeżeli próg przesuwamy na rzecz czułości, to wtedy zwiększa się pewność, że wykryjemy zakażone osobniki, ale przy narastającym niebezpieczeństwie wyników fałszywie dodatnich. Konsekwencją jest eliminowanie ze stada zwierząt zdrowych. Może to być, do pewnych granic, opłacalne wobec ryzyka wprowadzenia zwierząt zakażonych do stada zwierząt zdrowych. Niebezpieczeństwo takie powstaje, jeżeli próg przesunie się na rzecz specyficzności kosztem czułości w stopniu nadmiernym (17). Dla stosowanego do badań terenowych testu konieczne jest zatem optymalizowanie stosunku specyficzności ( $S_e$ ) do czułości ( $S_p$ ) przez takie ustawienie progu granicznego, które zapewni najwyższą liczbę wyników prawdziwie dodatnich, trafnie wskazujących na osobniki zakażone (5).

Ważnym czynnikiem w określaniu sytuacji epidemiologicznej w stadzie lub stadach danego regionu, uważanych za ujemne, jest częstość pobierania próbek krwi do badań diagnostycznych (11).

### Przykład choroby Aujeszky'ego

Spośród metod serologicznych, które stosowano w diagnostyce laboratoryjnej choroby Aujeszky'ego (chA) naj-

większe znaczenie posiadają, podobnie jak w przypadku PRRS, testy SN i ELISA (6, 16, 18). Również w tym przypadku ten ostatni używany jest jednak znacznie częściej, ze względu na prostszą technikę i inne, wcześniej podane zalety. Wykazuje w przypadku chA wyższą czułość niż SN przy porównywalnej z nim specyficzności (6, 17, 18).

Dodatkowo, wprowadzenie do stosowania szczepionek delecyjnych (znakowanych) stało się możliwe dopiero po opracowaniu zestawów ELISA umożliwiających serologiczne odróżnianie zwierząt uodpornianych szczepionkami delecyjnymi od zakażonych wirusem terenowym. Zestawy te różnią się tym od testów ELISA opartych na kompletnym antygenie wirusowym, że do opłaszczania mikropłytek wchodzących w skład zestawu wykorzystuje się wyłącznie glikoproteinę E, którą usunięto z antygeny szczepionkowego (16, 18). Uzyskana tym sposobem informacja jest niezbędna, jeżeli w programie zwalczania chA uwzględnia się szczepienia jako jeden z elementów jej likwidacji, co miało miejsce, między innymi, w Belgii, Holandii, Niemczech i we Francji (18).

Test ELISA jest zatem podstawą weryfikowania efektów zwalczania chA oraz określania, czy w danej chlewni względnie fermie – mimo, że świnię są szczepione – występują osobniki zakażone wirusem chA. Umożliwia on ponadto uzyskanie danych na temat sytuacji epizootologicznej w gminie, powiecie, regionie i na obszarze całego kraju. Umożliwia więc realizację celu głównego, jakim jest uzyskanie statusu kraju wolnego od chA. To zaś, obok ewidentnych korzyści stanowi spełnienie warunku UE i OIE umożliwiającego eksport świń. Po uznaniu kraju za wolny od chA wymieniony test ELISA wykorzystywany jest w badaniach monitoringowych w celu dokumentowania, że taki stan się utrzymuje lub że pojawiają się nowe zakażenia, które należy likwidować.

### Przykład pomoru klasycznego świń

Kolejną chorobą, w której zwalczaniu istotną rolę odgrywają badania serologiczne oparte na wykorzystaniu ELISA, jest pomór klasyczny świń (classical swine fever – CSF).

Test ten znajduje powszechne zastosowanie w przeglądach serologicznych świń nieszczepionych przeciw CSF (7, 10). Ich celem jest wykrywanie osobników zakażonych lub potwierdzenie, że w badanej populacji świń nie występują nosiciele i siewcy wirusa CSF. Dodatkowo w krajach, w których stosowane są szczepienia przeciw CSF, zwłaszcza szczepionką zawierającą glikoproteinę E2 (7), będącą immunogennym elementem pełnego antygeny wirusa, test ELISA wykorzystywany jest do odróżniania świń szczepionych od świń zakażonych, w tym również szczepionych przeciw CSF. W badaniach tych używane są 2 zestawy ELISA (10). Zestaw zawierający jako antygen glikoproteinę E2 identyfikuje świnię szczepioną szczepionką podjednostkową oraz świnię zakażoną wirusem CSF. Natomiast zestaw ELISA z antygenem  $E^{RNS}$ , będącym też elementem pełnego antygeny wirusa CSF, wykrywa wyłącznie świnię zakażoną. Zawarty w nim antygen nie wykrywa natomiast świń szczepionych, ponieważ w zestawie tym nie występuje glikoproteina E2 (7, 10). Potrzeba odróżniania świń zakażonych od świń szczepionych zaistniała, kiedy Komisja Weterynaryjna UE zrewidowała dotychczasowe stanowisko zabraniające stosowania szczepień prze-

ciw CSF (7, 10). Zmiana ta polega na wyrażeniu zgody na ograniczone i kontrolowane szczepienia wyłącznie wymienioną szczepionką w przypadku epizootii o znacznym zasięgu, co umożliwi przynajmniej częściową rezygnację z metody totalnego wybijania nie tylko świń zakażonych, co jest oczywiste, ale też podejrzanych o zakażenie.

### Przykład pryszczycy bydła

Test ELISA znalazł również praktyczne zastosowanie w monitoringu, mającym na celu potwierdzenie, że dana populacja bydła jest wolna od pryszczycy oraz w wykrywaniu osobników, które ją przechorowały, czyli tzw. ozdrowieńców (13). Są one potencjalnymi siewcami wirusa i jako jego ewentualni roznośnicy podlegają likwidacji. W krajach, w których stosuje się szczepienia profilaktyczne bydła przeciw pryszczycy (np. w Ameryce Łacińskiej) istotną w jej zwalczaniu stała się informacja, czy ma się do czynienia ze zwierzętami wyłącznie szczepionymi przeciw pryszczycy, czy też dodatkowo zakażonymi wirusem pryszczycy. Wtedy bowiem jako potencjalni siewcy i roznośnicy choroby powinni być ze stad bydła niezwłocznie eliminowani.

W świetle przedstawionej potrzeby podjęto prace zmierzające do opracowania testów laboratoryjnych, które umożliwią odróżnienie zwierząt zakażonych wirusem pryszczycy od zwierząt szczepionych przeciw pryszczycy. Podobnie jak w poprzednio omawianych chorobach zastosowany został w tym celu test ELISA. W jego opracowaniu wykorzystano występowanie w wirusie pryszczycy immunogennych białek strukturalnych oraz immunogennych białek niestrukturalnych.

Żywy wirus pryszczycy w odróżnieniu od inaktywowanego, znajdującego się w szczepionce przeciwpyszczycowej, posiada właściwość wyzwalania u zwierzęcia nie tylko przeciwciał swoistych dla strukturalnych białek kapsydowych (VP1-VP4), ale także dla szeregu białek niestrukturalnych, o symbolach: 2C, 3A, 3AB oraz 3ABC (4, 9, 14, 15). Złwłaszcza kompleks białek niestrukturalnych 3ABC ulega inaktywacji w trakcie produkcji szczepionki pryszczycowej. W związku z tym u zwierząt szczepionych nie występują swoiste dla niego przeciwciała. Właściwość ta pozwoliła na opracowanie zestawu diagnostycznego ELISA, w którym do opłaszczania mikroplętek wykorzystywane jest białko 3ABC. W przypadku zakażenia wirusem pryszczycy wykazuje się po zastosowaniu takiego zestawu u badanej krwi obecność swoistych dla 3ABC przeciwciał (9). Natomiast jeżeli zwierzę badane było szczepione przeciw pryszczycy, lecz nie przeżyło zakażenia wirusem patogennym, nie stwierdza się w jego surowicy przeciwciał anti-3ABC, co – jak wspomniano – wiąże się z utratą przez 3ABC w trakcie produkcji szczepionki zdolności do pobudzania organizmu krwi do wytwarzania swoistych dla tego białka przeciwciał.

Przedstawiony przykład stanowi kolejny dowód na wartość ELISA nie tylko w monitorowaniu sytuacji epidemiologicznej w populacji zwierząt, lecz również w odróżnieniu zwierząt szczepionych od zakażonych, co ma podstawowe znaczenie w zwalczaniu choroby i ostatecznie w uzyskaniu statusu kraju wolnego od pryszczycy.

Badania zmierzające do odróżniania zwierząt, które przechorowały pryszczycę od zwierząt szczepionych przeciw pryszczycy stosowane są, jak wspomniano, w krajach

Ameryki Łacińskiej (1, 13, 16). Mogą jednak stać się w przyszłości aktualne w Europie. Nie można bowiem wykluczyć, że ze względów ekonomicznych i humanitarnych odstąpi się od obecnie stosowanego, jako wyłącznej metody, totalnego wybijania zwierząt zakażonych oraz podejrzanych o zakażenie i w zwalczaniu pryszczycy ponownie będą, obok wybijania zwierząt, stosowane szczepienia.

### Podsumowanie

W podsumowaniu przedstawionych danych należy podkreślić, że ELISA odgrywa ważną rolę w ograniczaniu występowania i eradykacji chorób zakaźnych zwierząt. Warunkiem powodzenia jest dysponowanie zwalidowanymi w oparciu o standardy międzynarodowe zestawami diagnostycznymi. Niezbędne jest również uwzględnienie specyfiki choroby, w celu unikania sytuacji, w których metoda ta nie gwarantuje oczekiwanych efektów.

### Piśmiennictwo

1. Auge de Mello P., Gomes I., Behnemann H. G.: The vaccination of young cattle with an adjuvant foot-and-mouth disease vaccine. *Bd Centr. Panam, Tiebrev Allosa* 1989, 55, 3-14.
2. Christianson W. T., Choi C. S., Collins J. E., Molitor T. W., Morrison R. B., Joo H. S.: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 1993, 57, 262-268.
3. Crowther J. R.: The ELISA Guidebook, Human Press, Totawa, New Jersey 2001.
4. Diego de M., Brocchi E., Mackay D., Simone de F.: The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 1997, 142, 2021-2033.
5. Holck J. T., Roberts J.: Serological monitoring in negative and low prevalence populations, PRRS Compendium, National Pork Board, Des Moines, Iowa, USA 2003.
6. Kluge J. P., Beran G. W., Hill H. T., Platt K. B.: Pseudorabies (Aujeszky Disease), *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA 1999.
7. Lipowski A., Drexler Ch., Pejsak Z.: Safety and efficacy of a classical swine fever subunit vaccine in pregnant sows and their offsprings. *Vet. Microbiol.* 2000, 77, 99-108.
8. Mackay D. K. J., Forsyth M. A., Davies P. R., Berlinzani A., Belsham G. J., Flint M., Ryan M. D.: Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine* 1998, 16, 446-459.
9. Niedbalski W., Kęsy A.: Zastosowanie testu 3ABC – ELISA do różnicowania przeciwciał pryszczycowych powstałych w wyniku zakażenia lub immunizacji wrażliwych zwierząt. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 695-697.
10. Pejsak Z., Lipowski A.: Nowe dane na temat występowania i zwalczania pomoru klasycznego u świń i dzików. *Życie Wet.* 2001, 76, 18-19.
11. Polson D., Jordan D.: A simulated model approach to sample size determination. *Proc. Internat. Pig Vet. Soc. Congress* 2002, 1, 256-262.
12. Roberts J.: Serological monitoring in infected sow herds. PRRS Compendium, National Pork Board, Des Moines, Iowa, USA 2003.
13. Shen F., Chen P. D., Walfield A. M., Ye J., House J., Brown T., Wang C. Y.: Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by peptide ELISA. *Vaccine* 1999, 17, 3039-3049.
14. Silberstein E., Kaplan G., Taboga O., Duffi S., Palma E.: Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 non structural protein. *Arch. Virol.* 1997, 142, 795-805.
15. Sorensen K. J., Madsen K. G., Madsen E. S., Salt J. B., Ngindi J., Mackay D. K. J.: Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the defecation of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.* 1998, 143, 1461-1476.
16. Truszczyński M. (red.): Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties – OIE, Paris 2000.
17. Truszczyński M. (red.): OIE Quality Standards and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases, Office International des Epizooties – OIE, Paris 2002.
18. Van Oirschot J. T., Gielkens A. L. J., Moormann R. J. M., Berbs A. J. M.: Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* 1990, 23, 85-202.
19. Wills R. W., Zimmerman J. J., Yoon K. J., Swenson S. L., Hoffman L. J., Mc Ginley M. J., Will H. T., Platt K. B.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 1997, 57, 69-81.
20. Yoon K. J., Zimmerman J. J., Swenson S. L.: Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995, 7, 305-312.