Strategia DIVA w zwalczaniu pryszczycy

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

Zakład Pryszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Otrzymano 23.06.2016

Zaakceptowano 27.07.2016

Niedbalski W., Fitzner A.

DIVA strategy in the eradication of foot-and-mouth disease

Summary

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), in contrast to the antigen used for the production of FMD vaccine, can replicate in animals. As a result of infection the specific antibody to the viral structural proteins (SPs) and non-structural proteins (NSPs) of FMDV are synthesized. The laboratory diagnostic methods based on individual NSPs, e.g. 3D, 2C and 2B, as well as polypeptides, such as 3AB and 3ABC can be used for differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA). This article presents the aim, principle, methods and results of applying DIVA strategy in the eradication of foot-and-mouth disease. The marker vaccines which enable differentiation between infected and vaccinated animals and appropriate ELISA serological tests for detection of antibodies to the NSPs of FMDV have been described. DIVA strategy makes it possible to reduce the economic losses and restore possibilities of international trade in animals and animal products. This strategy may be an alternative of the administrative “stamping-out” eradication method. The essential aim of DIVA strategy is realization of the so-called “vaccinate-to-live” policy, which is based on the principle that vaccinated animals exposed to FMDV will not transmit the virus. These animals are not epidemiologically risky, and therefore do not have to be eliminated. It is necessary to develop new vaccines and improve those already used as well as the application of reliable diagnostic tests to detect FMDV in vaccinated livestock populations.

Keywords: FMD, eradication, DIVA strategy

Pryszczycza (*Aphthae epizooticae*, Foot and Mouth Disease – FMD) – choroba zakaźna, wybitnie zaraźliwa zwierząt parzystokopytnych domowych i dzikich (1). Na zakażenie podatne są: bydło, świnie, owce, kozy, bawoły, renifery, wielbłądy oraz zwierzęta dziko żyjące – ogółem ponad 70 gatunków (1, 15). Czynnikiem etiologicznym jest wirus pryszczycy (FMDV), rodzina *Picornaviridae*, rodzaj *Aphthovirus*. Genom FMDV stanowi pojedynczą nić RNA o dodatniej polarności i wielkości około 8,5 kb. Częsteczką RNA otoczona jest przez ikozahedralny (kubiczny) kapsyd utworzony przez 60 kopii każdego z czterech białek strukturalnych (structural proteins – SPs) VP1 do VP4. Ponadto RNA koduje białka niestrukturalne (non-structural proteins – NSPs), które odgrywają ważną rolę w procesie replikacji wirusa, jego dojrzewaniu i uwolnieniu z zakażonej komórki (15). FMDV charakteryzuje duża zmienność genetyczna i antygenowa; znanych jest 7 serotypów wirusa oznaczonych: A, O, C, Asia 1 oraz SAT 1, SAT 2 i SAT 3, a w obrębie każdego z serotypów występuje wiele podtypów i wariantów antygenowych (11). Duża różnorodność genetyczna FMDV spowodowana wyso-

kim stopniem mutacji zachodzących podczas replikacji jego materiału genetycznego w znacznym stopniu utrudnia diagnostykę i profilaktykę choroby (12).

Pryszczycza od lat stanowi poważne zagrożenie dla hodowli zwierząt w wielu regionach świata. Straty ekonomiczne spowodowane chorobą są związane bezpośrednio ze zmniejszeniem efektywności hodowli oraz pośrednio, z utratą rynków zbytu, z powodu embargo na handel zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), choroba występuje obecnie na terytorium ponad 100 państw kontynentu azjatyckiego i afrykańskiego (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI). Objawy chorobowe pryszczycy oraz ich nasilenie mogą różnić się w zależności od gatunku zwierzęcia. W przypadku bydła typowe objawy kliniczne obserwuje się zarówno w jamie ustnej, jak i na racicach, podczas gdy u świń widoczne są przede wszystkim na racicach. U owiec objawy kliniczne nie występują lub są słabo wyrażone (17). Ponadto inne choroby wirusowe, takie jak: choroba pęcherzykowa świń (swine vesicular disease –

SVD), pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej (vesicular stomatitis – VS) oraz wysypka pęcherzykowa (vesicular exanthema – VES) charakteryzują się podobnymi do pryszczycy objawami, dlatego w celu precyzyjnego odróżnienia pryszczycy od innych chorób pęcherzowych niezbędna jest szczegółowa laboratoryjna diagnostyka różnicowa (15). Stosowane rutynowo w laboratoriach pryszczycowych serologiczne metody diagnostyczne, takie jak: odczyn seroneutralizacji (SN) i testy immunoenzymatyczne (liquid-phase blocking ELISA – LPBE oraz solid-phase blocking ELISA – SPCE) pozwalają w próbkach surowicy/osocza wykryć przeciwciała dla SPs wirusa pryszczycy.

Wirus pryszczycy, w odróżnieniu od jego antygeny, na bazie którego produkuje się szczepionki przeciwko pryszczycy, posiada zdolność replikacji w organizmie zwierzęcia. W odpowiedzi na zakażenie powstają przeciwciała swoiste dla SPs oraz dla wielu NSPs wirusa (8) (ryc. 1). W celu odróżnienia zwierząt zakażonych i szczepionych (differentiation of infected from vaccinated animals – DIVA) wykorzystuje się metody oparte zarówno na indywidualnych NSPs, np. 3D (27), 2C (20) i 2B (16), jak i polipeptydach, takich jak 3AB (36) oraz 3ABC (9). Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że przeciwciała dla białka 3ABC są najbardziej wiarygodnym serologicznym markerem pozwalającym identyfikować i różnicować zwierzęta po przebytej infekcji wirusowej, nosicieli i rekonwalescentów od zwierząt immunizowanych szczepionkami inaktywowanymi (3, 5, 13, 35). Testy diagnostyczne z wykorzystaniem markerów zakażenia mogą być stosowane do badania zarówno zwierząt nieszczepionych, jak i szczepionych, i mają tę przewagę nad konwencjonalnymi metodami serologicznymi, że nie są specyficzne dla określonego serotypu wirusa, co oznacza, że ten sam test może być przydatny do wykrywania przeciwciał dla wszystkich siedmiu serotypów FMDV.

Strategię DIVA stosowano przez wiele lat na kontynencie południowoamerykańskim do monitorowania wyników zwalczania pryszczycy w krajach, w których choroba wystąpiła, oraz w celu udokumentowania statusu – „kraj wolny od pryszczycy ze szczepieniami”, co umożliwiałoby uzyskanie zezwolenia na eksport wołowiny (3). W krajach tych intensywny wypas była prowadzi się na wielkich, otwartych przestrzeniach, na których rozpoznanie kliniczne choroby nie zawsze jest możliwe, dlatego serologiczne badania przeglądowe stanowią podstawę szybkiej i wiarygodnej diagnozy. Strategię DIVA wykorzystywano także podczas zwalczania choroby wśród świń szczepionych przeciwko pryszczycy na Dalekim Wschodzie (7). Ponadto testy DIVA stosowano w ograniczonym zakresie w 1996 r. w Macedonii i Albanii po użyciu szczepień interwencyjnych podczas zwalczania pryszczycy (6). W krajach posiadających status „wolny od pryszczycy bez szczepień”, jak państwa członkowskie Unii Europejskiej (UE) oraz Stany Zjednoczone Ameryki

Ryc. 1. Zasada testu 3ABC-ELISA do odróżnienia zwierząt zakażonych od szczepionych przeciwko pryszczycy (DIVA)

Północnej (USA), testy immunoenzymatyczne do wykrywania przeciwciał dla NSPs wykorzystuje się jako użyteczne narzędzie kontroli pryszczycy, między innymi podczas wdrażania polityki „szczepienie w celu przeżycia” (vaccinate-to-live). Zgodnie z tą koncepcją, kontrola pryszczycy w krajach dotychczas wolnych od tej choroby może być realizowana poprzez zastosowanie szczepień interwencyjnych wokół zakażonych stad, a następnie szczegółowych badań laboratoryjnych w celu wykrycia i wyeliminowania osobników zakażonych wirusem, bez konieczności wybijania zwierząt szczepionych (31, 33). W związku z tym OIE i Komisja Europejska (KE) wprowadziły nowe regulacje, zgodnie z którymi odzyskanie statusu „kraj wolny od pryszczycy” możliwe jest po 6 miesiącach zamiast po 12 od wygaszenia ostatniego ogniska pryszczycy, zwalczanej zgodnie z tą polityką (Kodeks Zdrowia Zwierząt Lądowych OIE; Dyrektywa Rady 2003/85/WE). Ponadto strategia DIVA jest wykorzystywana do badania zwierząt, które są obiektem wymiany handlowej, ponieważ znaczny odsetek (do 50%) osobników zakażonych FMDV może stać się nosicielami wirusa (carrier animals), co oznacza, że w ich organizmie, w cieśni gardzieli, wirus może być obecny dłużej niż 28 dni od zakażenia. Nosiciele nie wykazują żadnych objawów klinicznych choroby i mogą pozostać w tym stanie przez długi okres, np. w przypadku bydła przez 2-3 lata, a bawołu afrykańskiego nawet 5 lat. Osobniki te mogą stanowić potencjalne źródło zakażenia innych zwierząt, co dotychczas udowodniono w warunkach terenowych w przypadku bawołu afrykańskiego (2).

W Zakładzie Pryszczycy PIWet-PIB pierwsze badania z wykorzystaniem testu 3ABC-ELISA do różnicowania przeciwciał powstałych w wyniku zakażenia oraz immunizacji zwierząt wykonano pod koniec lat

90. ub. stulecia (26). Wykazano, że wszystkie badane surowice, w tym próbki od bydła z rejonu „pierścieniowych” szczepień profilaktycznych prowadzonych w latach 1985-1989 wokół Zduńskiej Woli oraz surowice dodatnie w odczynie SN i ELISA oceniane w ramach badań monitoringowych, a także surowice od bydła przeznaczonego na eksport w latach 1993-1997, dodatnie w badaniu na obecność przeciwciał dla SPs, dały wynik ujemny dla białka 3ABC. Ponadto stwierdzono, że spośród 82 próbek dodatnich dla SPs od bydła sprowadzonego do Polski w latach 1985-1991 z Rosji, Czech, Słowacji, Francji, Belgii i innych krajów europejskich, tylko dwie od bydła pochodzącego z Rosji reagowały dodatnio z antygenem 3ABC, co stanowi 2,5% ogólnej liczby sprowadzonych do kraju zwierząt (26). Badania nad zastosowaniem antygeny 3ABC do wykrywania zakażeń FMDV w populacji zwierząt podatnych kontynuowano w następnych latach, oceniając przydatność metody 3ABC-ELISA do wykrywania bydła zakażonego wirusem w populacji zwierząt wcześniej szczepionych przeciwko pryszczycy (25). Stwierdzono, że wszystkie surowice od zwierząt zdrowych, nieszczepionych i niezakażonych oraz szczepionych, lecz niezakażonych wirusem pryszczycy były wolne od przeciwciał dla NSPs, natomiast surowice od zwierząt nieszczepionych i zakażonych reagowały dodatnio w teście 3ABC-ELISA. Przeciwciała dla antygeny 3ABC wykryto również we krwi sześciu z ośmiu zwierząt zakażonych FMDV, które wcześniej szczepiono przeciwko pryszczycy. Poziom przeciwciał dla białka 3ABC ulegał obniżeniu w czasie i utrzymywał się do 13. tygodnia po zakażeniu, a w surowicy jednego osobnika przeciwciała te wykryto po zakończeniu eksperymentu, tzn. po 130 dniach od zakażenia (25). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że test 3ABC-ELISA może stanowić użyteczne narzędzie diagnostyczne podczas zwalczania pryszczycy, umożliwiając rozpoznanie zakażenia FMDV w populacji zwierząt szczepionych oraz różnicowanie osobników zakażonych od wyłącznie szczepionych. W kolejnym etapie badań dotyczących DIVA prowadzonych w naszym laboratorium porównano dostępne w handlu zestawy diagnostyczne ELISA do wykrywania przeciwciał dla NSPs (23, 24). Oceniono specyficzność oraz czułość zestawów CHEKIT FMD-3ABC (Bommeli Diagnostics, Szwajcaria), Ceditest FMDV-NS (Cedi-Diagnostics, B.V., Holandia) oraz 3ABC-ELISA (IZSLER, Brescia, Włochy) do wykrywania przeciwciał dla NSPs. Stwierdzono, że wszystkie metody charakteryzowały się wysoką specyficznością (97,2-99,7%) oraz czułością analityczną przekraczającą 98% (23). Uzyskane wyniki dowodzą, że wszystkie zestawy ELISA mogą być wykorzystywane do badań serologicznych zwierząt będących w obrocie handlowym (eksport/import) oraz do realizacji badań monitoringowych w ramach programu kontroli choroby, a także podczas zwalczania

pryszczycy w sytuacji, gdy stosowano szczepienia interwencyjne w ognisku choroby. Pod koniec 2015 r. test 3ABC-ELISA wykorzystano do badania wybranych surowic kontrolnych od bydła zakażonego doświadczalnie wirusem pryszczycy serotyp O, A, Asia 1 i SAT 2, dostarczonych z Laboratorium Referencyjnego UE ds. pryszczycy w Pirbright (Anglia). Probki surowicy pobrano od zwierząt szczepionych przeciwko pryszczycy, a następnie zakażonych FMDV metodą inokulacji lub przez bezpośredni kontakt z zakażonym zwierzęciem. Do badania próbek w kierunku obecności przeciwciał dla NSPs wykorzystano zestawy PrioCHECK FMDV NS (Prionics, Holandia) oraz ID Screen FMD NSP Competition (ID.vet, Francja). Wszystkie próbki surowicy kontrolnej badane przy użyciu obu zestawów dały wynik dodatni dla NSPs o zróżnicowanym procencie hamowania (PI), od progowego (około 50%) do wysokiego, wynoszącego ponad 90% (dane nieopublikowane). Zbliżone wartości PI dla tych samych próbek z zastosowaniem zestawów Ceditest FMDV-NS oraz Svanovir FMDV 3ABC-Ab (Svanova Biotech, Szwecja) uzyskali autorzy zestawu surowic kontrolnych (30). Badania wykonane w ramach międzynarodowego projektu badawczego dotyczącego porównania metod wykrywania przeciwciał dla NSPs (3B i 3ABC) wykazały różnice w ich przydatności do identyfikacji zwierząt zakażonych w populacji szczepionych przeciwko pryszczycy; czułość analityczną metod oszacowano na 35% do 74% (w przypadku nosicieli 45%-89%), natomiast specyficzność wszystkich sześciu badanych metod ELISA oszacowano na ponad 96% (5). Testy o wysokiej czułości, np. 3ABC-ELISA, są rutynowo wykorzystywane w badaniach przeglądowych, a wyniki dodatnie potwierdza się inną metodą na obecność przeciwciał dla NSPs o porównywalnej czułości i specyficzności. Ponadto w celu wyeliminowania wyników fałszywie dodatnich zaleca się przeprowadzenie dochodzenia epidemiologicznego oraz badanie próbek z gardzieli (probang sample) metodą real-time RT-PCR (31, 32).

Konwencjonalne szczepionki przeciwko pryszczycy zawierają jako antygen zarówno SPs, jak i śladowe ilości NSPs wirusa pryszczycy. Po immunizacji zwierząt takimi szczepionkami w ich organizmie produkowane są przeciwciała dla obu rodzajów białek, a te dla NSPs wykrywa się najczęściej wtedy, gdy stosuje się rewakynację takimi preparatami uodporniającymi. Szczepionki konwencjonalne mają za zadanie ograniczyć szerzenie się choroby poprzez utworzenie strefy buforowej uniemożliwiającej dalsze rozprzestrzenianie się wirusa wśród zwierząt, jednak nie eliminują go z ich populacji. Ponadto, po użyciu takiej szczepionki nie jest możliwe odróżnienie osobników zakażonych od szczepionych. Z tego powodu zastosowanie szczepionek konwencjonalnych przeciwko pryszczycy, pomimo ich dużego znaczenia epizootycznego i ekonomicznego, nie pozwala ocenić występowania i skali

rozprzestrzenienia wirusa pryszczycy w populacji zwierząt szczepionych. Dla przeprowadzenia prawidłowej oceny epizootycznej na obszarach, na których chorobę zwalczano metodą szczepień interwencyjnych, konieczne jest zastosowanie testów DIVA. Należy jednak zaznaczyć, że serokonwersja NSPs nie występuje u wszystkich zwierząt, które miały kontakt z wirusem pryszczycy, w związku z tym zakażenia nie można ostatecznie udowodnić wyłącznie na podstawie wyników badań serologicznych. Ponadto, w celu uzyskania wystarczająco wysokiej czułości metody badawczej zaleca się analizę wyników otrzymanych po badaniu całego stada, przy czym liczebność takiego stada powinna być odpowiednio wysoka. Mogą pojawić się problemy związane z wystąpieniem wyników fałszywie dodatnich, w szczególności w przypadku nosicieli, gdy wyniku badania nie można potwierdzić innym testem serologicznym, a metody wirusologiczne nie są wystarczająco czułe. Wynik badania w kierunku przeciwciał dla NSPs może stanowić dodatkowy dowód skuteczności szczepionki przeciwko pryszczycy (22). Wykazano także, że szczepionki konwencjonalne podane zwierzętom pozajelitowo nie przyczyniają się do produkcji immunoglobulin typu A (IgA) na błonie śluzowej lub indukują syntezę tych przeciwciał w niewielkim stopniu, natomiast u nosicieli wirusa stężenie IgA jest wysokie. W przypadku tych zwierząt test na obecność IgA w ślinie może stanowić metodę alternatywną do DIVA w kierunku NSPs, w celu wykrycia persystencji FMDV w próbkach gardzieli (29). Metoda ta może być szczególnie przydatna do zwalczania pryszczycy w krajach, w których występuje ona endemicznie, a stosowane szczepionki są zanieczyszczone NSPs i często praktykuje się rewakynację takimi preparatami uodporniającymi (28).

W różnych systemach ekspresyjnych uzyskano nowoczesne, rekombinowane szczepionki podjednostkowe przeciwko pryszczycy, zawierające fragmenty genomu FMDV niezbędne do syntezy białek kapsydu wirusa i pozbawione regionu kodującego większość NSPs, w tym również wysoce immunogenne białko 3D (14). Już jednokrotna immunizacja świń taką szczepionką podjednostkową otrzymaną w defektywnym wektorze adenowirusa ludzkiego indukuje szybką (w ciągu 7 dni) i długotrwałą (do 8 miesięcy) ochronę przed zakażeniem. Bydło inokulowane jedną dawką tego rekombinowanego wektora adenowirusowego było odporne na bezpośrednie zakażenie wirusem pryszczycy oraz przez kontakt. U zwierząt, którym podano dwie dawki tej szczepionki, zachodziła produkcja przeciwciał neutralizujących FMDV o wysokim mianie, lecz nie stwierdzono obecności przeciwciał dla NSPs, co pozwoliło odróżnić zwierzęta immunizowane takim szczepionkami od zakażonych wirusem (14). Wczesną odporność świń na zakażenie wirusem pryszczycy uzyskano po podaniu tym zwierzętom czynnika antywirusowego – interferonu typu I

(IFN α/β), a następnie szczepionki podjednostkowej. W rezultacie pełną ochronę przed zakażeniem uzyskano już po 1 dniu od inokulacji IFN α/β , a odporność na zakażenie utrzymywała się przez kilka miesięcy (14). Uzyskano także markerowe szczepionki delecyjne, po pozbawieniu FMDV serotypu A, jednego z podstawowych determinantów wirulentności – sekwencji kodującej proteinazę L (34). Po immunizacji zwierząt takimi szczepionkami w ich organizmie nie zachodziła ekspresja immunogennych białek kodowanych przez usunięty gen i w rezultacie w ich surowicy nie pojawiły się przeciwciała swoiste dla tych białek, co umożliwiała odróżnienie osobników szczepionych od zakażonych. Również rekombinowana szczepionka przeciwko pryszczycy uzyskana w wyniku ekspresji białek wirusowych w systemie bakulowirusowym, zawierająca cząsteczki wirusopodobne (virus-like particles VLPs) była wysoce immunogenna i wolna od NSPs, co potwierdzono przy użyciu testów DIVA (19).

Szczepionki nowej generacji, choć także nazwane markerowymi, nie są wynikiem modyfikacji genetycznych genomu wirusa, tak jak w przypadku typowych szczepionek delecyjnych. Te nowoczesne szczepionki inaktywowane zawierają wysoce oczyszczone antygeny wirusa pryszczycy, wolne od NSPs wszystkich znanych szczepów wirusa pryszczycy (21). Podczas ich produkcji NSPs usuwane są do tak niskiego stężenia, przy którym, po zastosowaniu tych szczepionek do immunizacji zwierząt, nie dochodzi do serokonwersji NSPs i w organizmie zwierzęcia syntetyzowane są przeciwciała wyłącznie dla SPs kapsydu wirusa (ryc. 1), których obecność można udowodnić za pomocą testów serologicznych (10). Zastosowanie takiej szczepionki markerowej podczas pierścieniowych szczepień interwencyjnych, a następnie użycie testu ELISA w celu identyfikacji przeciwciał dla polipeptydu 3ABC umożliwia precyzyjne odróżnienie zwierząt niezakażonych od zakażonych wirusem i dzięki temu konieczność ich masowego wybijania podczas zwalczania pryszczycy jest znacznie ograniczona (31). Osobniki, u których nie stwierdza się obecności przeciwciał dla NSPs, nie stanowią ryzyka dalszego szerzenia się choroby i nie muszą być eliminowane, jak to miało miejsce podczas zwalczania epizootii pryszczycy w Holandii w 2001 r. (4). Użycie szczepionek markerowych i testu 3ABC-ELISA zalecane jest także w celu ochrony przed zakażeniem zwierząt szczególnie cennych (gatunki rzadkie, zwierzęta zarodowe oraz przetrzymywane w zoo lub w cyrku).

Reasumując można stwierdzić, że nadrzędnym celem strategii DIVA jest realizacja polityki „vaccinate to live”, której podstawę stanowi zasada, że zwierzęta szczepione, a następnie narażone na kontakt z wirusem pryszczycy nie będą go przenosić na inne parzystokopytne. Osobniki takie nie stwarzają zagrożenia epizootycznego, dlatego ich eliminacja nie jest konieczna. Niezbędne jest opracowanie nowych

szczepionek oraz doskonalenie już stosowanych, a także stosowanie precyzyjnych testów diagnostycznych, pozwalających wykryć obecność wirusa pryszczycy w populacji zwierząt szczepionych. Oczekuje się, że nowa strategia zwalczania pryszczycy nie będzie oparta wyłącznie na stosowaniu szczepionek zawierających negatywne markery z delecją określonych epitopów antygenu NSPs, lecz także szczepionek opracowanych na bazie oczyszczonego antygenu wirusowego całkowicie pozbawionego tych białek. dopełnieniem tej strategii muszą być wiarygodne testy serologiczne do wykrywania przeciwciał dla NSPs oraz dodatkowo metody wykrywania antygenu i materiału genetycznego wirusa. Strategia DIVA może stanowić alternatywę radykalnej metody administracyjnej masowego wybijania (stamping-out) zwierząt w ognisku choroby podczas zwalczania pryszczycy. Użycie strategii DIVA niewątpliwie przyczyni się do znacznego ograniczenia strat ekonomicznych w hodowli oraz do szybszego przywrócenia dostępu do międzynarodowego handlu zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia.

Piśmiennictwo

- Alexandersen S., Mowat N.: Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2005, 288, 9-42.
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. J.: The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.* 2003, 129, 1-36.
- Bergmann I. E., Malirat V., Neitzert E., Correa Melo E.: Vaccination: foot-and-mouth disease experience in South America. *Dev. Biol. (Basel)* 2004, 119, 273-282.
- Bouma A., Elbers A. R. W., Dekker A., de Koeijer A., Bartels C., Vellema P., van der Wal P., van Rooij E. M. A., Pluimers F. H., de Jong M. C. M.: The foot-and-mouth disease epidemic in the Netherlands in 2001. *Prev. Vet. Med.* 2003, 57, 155-166.
- Brocchi E., Bergmann I. E., Dekker A., Paton D. J., Sammin D. J., Greiner M., Grazioli S., de Simone F., Yadin H., Haas B., Bulut N., Malirat V., Neitzer E., Goris N., Parida S., Sorensen K., de Clercq K.: Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2006, 24, 6966-6977.
- Brocchi E., Sorensen K., Mackay D.: The use of serology as part of the exit strategy to the 1996 epidemic of FMD in the Balkans. *Dev. Biol. (Basel)* 2004, 119, 283-292.
- Chung W. B., Liao P. C., Yang P. C., Chen S. P., Jong N. H., Steu T. W.: Surveillance of FMD virus non-structural antibodies in pig populations involved in an eradication programme. *Vet. Rec.* 2003, 152, 595-597.
- Clavijo A., Wright P., Kitching P.: Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.* 167, 2004, 9-22.
- Diego M. de, Brocchi E., Mackay D., De Simone F.: The non-structural polypeptide 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.
- Doel T. R.: FMD vaccines. *Virus Res.* 2003, 91, 81-99.
- Domingo E., Escarmis C., Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Carrillo E., Nunez J. I., Sobrino F.: Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 2003, 91, 47-63.
- Domingo E., Escarmis C., Martinez M. A., Martinez-Salas E., Mateu M. G.: Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, 176, 33-47.
- Foord A. J., Muller J. D., Yu M., Wang L. F., Heine H. G.: Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. *J. Immunol. Methods* 2007, 321, 142-151.
- Grubman M. J.: Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* 2005, 33, 227-234.
- Grubman M. J., Baxt B.: Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 465-493.
- Inoue T., Parida S., Paton D. J., Linchongsabongkoch W., Mackay D., Oh Y., Aunpomma D., Gubbins S., Saeki T.: Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of foot-and-mouth disease virus nonstructural protein antibody using a chemically synthesized 2B peptide as antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006, 18, 545-552.
- Kitching R. P., Hughes G. J.: Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Rev. Sci. Tech.* 2002, 21, 505-512.
- Kweon Y. H., Ko Y. J., Kim W. I., Lee S. Y., Naha J. J., Lee K. N., Sohna H. J., Choi K. S., Hyuna B. H., Kanga S. W., Joo Y. S., Lubroth J.: Development of foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine* 2003, 21, 1409-1414.
- Li Z., Yin X., Yi Y., Li X., Li B., Lan X., Zhang Z., Liu J.: FMD subunit vaccine produced using a silk-worm-baculovirus expression system: protective efficacy against two type Asia 1 isolates in cattle. *Vet. Microbiol.* 2011, 149, 99-103.
- Lubroth J., Brown F.: Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. *Res. Vet. Sci.* 1995, 59, 70-78.
- 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.
- Martin P. A., Cameron A. R., Greiner M.: Demonstrating freedom from disease using multiple complex data sources: a new methodology based on scenario trees. *Prev. Vet. Med.* 2007, 79, 71-97.
- Niedbalski W.: Comparison of three ELISA kits for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus non-structural proteins. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, 49, 147-151.
- Niedbalski W.: Detection of foot-and-mouth disease virus infection in vaccinated cattle. *Pol. J. Vet. Sci.* 2005, 8, 283-287.
- Niedbalski W., Haas B.: Differentiation of infection from vaccination by detection of antibodies to the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2003, 47, 51-60.
- Niedbalski W., Kęsy A.: Zastosowanie testu 3ABC-ELISA do różnicowania przeciwciał pryszczycowych powstałych w wyniku zakażenia lub immunizacji wrażliwych zwierząt. *Med. Weter.* 1998, 54, 695-697.
- O'Donnel V. K., Boyle D. B., Sproat K., Fondevila N. A., Forman A., Schudel A., Smitsaart E. N.: Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996, 8, 143-150.
- Parida S.: Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. *Expert Rev. Vaccines* 2009, 8, 347-365.
- Parida S., Anderson J., Cox S. J., Barnett P. V., Paton D. J.: Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. *Vaccine* 2006, 24, 1107-1116.
- Parida S., Fleming L., Gibson D., Hamblin P. A., Grazioli S., Brocchi E., Paton D. J.: Bovine serum panel for evaluating foot-and-mouth disease virus non-structural protein antibody tests. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007, 19, 539-544.
- Paton D. J., de Clercq K., Greiner M., Dekker A., Brocchi E., Bergman I., Sammin D. J., Gubbins S., Parida S.: Application of non-structural protein antibody test in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. *Vaccine* 2006, 24, 6503-6512.
- Paton D. J., Ferris N. P., Hutchings G. H., Li Y., Swabey K., Keel P., Hamblin P., King D. P., Reid S. M., Ebert K., Parida S., Savva S., Georgiou K., Kakoyiannis C.: Investigations into the cause of FMDV seropositive small animals in Cyprus during 2007. *Transbound. Emerg. Dis.* 2009, 56, 321-328.
- Paton D. J., Fussell A. E., Vosloo W., Dekker A., de Clercq K.: The use of serosurveys following emergency vaccination, to recover the status of "foot-and-mouth disease free where vaccination is not practised". *Vaccine* 2014, 32, 7050-7056.
- Piccone M. E., Rieder E., Mason P. W., Grubman M. J.: The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.* 1995, 69, 5376-5382.
- Rodriguez A., Dopazo J., Saiz J. C., Sobrino F.: Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch. Virol.* 1994, 136, 123-131.
- Silberstein E., Kaplan G., Taboga O., Duffy S., Palma E.: Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. *Arch. Virol.* 1997, 142, 795-800.

Adres autora: dr hab. Wiesław Niedbalski, prof. nadzw., ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: wieslaw.niedbalski@piwzp.pl