

# Walidacja metody ELISA (SPCE) do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi pryszczycy

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Niedbalski W., Kęsy A.

## Validation of a solid-phase competition ELISA (SPCE) for measuring antibodies to foot-and-mouth disease virus

### Summary

The aim of this study was to examine the essential validation parameters of a solid-phase competition ELISA (SPCE) assay for the serological detection of foot-and-mouth disease virus (FMDV) antibody serotypes A, O and Asia 1. The sensitivity of the SPCE was calculated from the results of testing positive sera from convalescent and vaccinated cattle. The highest sensitivity of assay (>99% for all FMDV types) was found at PI 41-50 but implementation of a cut-off level above PI 50 resulted in a decrease of ELISA sensitivity. The specificity of SPCE was examined by testing 760 samples of FMDV-negative field sera collected from healthy, neither infected nor previously vaccinated cattle. In contrast to the sensitivity, an increase in ELISA specificity was observed in tested successive PI ranges and 100% was achieved at PI 61-70. The accuracy of assay was determined by the estimation of repeatability and reproducibility of results. These were performed using a panel of reference sera distributed by the World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease (WRL FMD) for the purpose of Phase XVIII collaborative studies. Repeatability and reproducibility were expressed as a coefficient of variation (CV) by analyzing the results of tested reference sera. In case of reproducibility, the CVs for 9 of 10 tested sera ranged from 6.6 to 9.8%. The results of reproducibility were more variable – CVs for all reference sera were generally higher and for two samples (weak positive for FMDV serotype A) they exceeded the acceptable maximum limit.

**Keywords:** foot-and-mouth disease, ELISA (SPCE)

Pryszczycyca – ze względów epizootycznych i ekonomicznych najważniejsza wirusowa choroba zakaźna zwierząt parzystokopytnych domowych i dzikich. Kraje wolne od tej choroby korzystają z nieograniczonego dostępu do międzynarodowych rynków zbytu zwierząt i produktów zwierzęcego pochodzenia. Jednym z podstawowych kryteriów uzyskania i utrzymania statusu kraju wolnego od pryszczycy jest przedstawienie wiarygodnych wyników badań potwierdzających, że zwierzęta podatne nigdy nie chorowały na pryszczycę oraz nie były szczepione przeciwko tej chorobie. Odnośne dane uzyskuje się poprzez wykrywanie i ocenę ilościową przeciwciał swoistych dla białek strukturalnych kapsydu wirusa pryszczycy. Serologiczne badania przeglądowe bydła na obecność przeciwciał swoistych wykonuje się w większości krajów europejskich (4). Od 1991 r. badania takie prowadzi się także w Polsce w ramach krajowego programu badań monitoringowych w kierunku pryszczycy (11). Metody wykrywania przeciwciał zalecane dla potrzeb handlu międzynarodowego są opisane w podręczniku badań diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych Międzynarodowego Urzędu ds. Epizootii (OIE) (5). Zgodnie z tym podręcznikiem, odczyn seroneutralizacji

(SN) jest metodą referencyjną, jednakże jest on pracochłonny, a ponadto, ze względu na konieczność stosowania aktywnego wirusa, wymagane jest zapewnienie w laboratorium odpowiednich warunków bezpieczeństwa biologicznego. Inną opisaną metodą jest test immunoenzymatyczny – liquid-phase blocking ELISA (LPBE) – opracowany przez Hamblina i wsp. (8, 9), a następnie zaadaptowany w większości laboratoriów europejskich (13), od 1993 r. także w Zakładzie Pryszczycy PIWet-PIB w Zduńskiej Woli (15). Ze względu na łatwość wykonania i krótki czas uzyskania wyników oraz czułość porównywalną z odczynem SN, a także użycie inaktywowanego antygeny wirusa pryszczycy, test LPBE zalecany jest do serologicznych badań monitoringowych zwierząt podatnych. Jednakże z powodu dużego odsetka wyników fałszywie dodatnich – od 4% w populacji zwierząt zdrowych nieszczepionych aż do 18% wśród zwierząt narażonych na stres – metoda ta jest obecnie krytykowana (7). W ostatnich latach, w kilku renomowanych laboratoriach pryszczycowych opracowano i wprowadzono do rutynowej praktyki laboratoryjnej metody immunoenzymatyczne, w których reakcja antygen–przeciwciało zachodzi w fazie stałej. Pierwszą jest solid-phase com-

petition ELISA (SPCE), oparta na współzawodnictwie przeciwciał swoistych obecnych w badanej surowicy z przeciwciałami anty-pryszczycowymi w surowicy odpornościowej hiperimmunizowanej świnki morskiej o miejsca antygenowe wirusa pryszczycy (12). Następną jest solid-phase blocking ELISA polegająca na blokowaniu wiązania przeciwciał monoklonalnych anty-pryszczycowych do antygeny przez przeciwciała swoiste w badanej surowicy (6). Przewaga tych metod nad LPBE wynika przede wszystkim ze znacznie wyższej ich specyficzności (> 99%), a także na krótszym czasie wykonania badania (ok. 5-6 godz.) oraz mniejszym wpływie warunków środowiska na uzyskane wyniki. Obecnie w Zakładzie Pryszczycy PIWet-PIB prowadzone są badania walidacyjne metody SPCE w celu jej zaadaptowania w miejsce metody LPBE do serologicznych badań diagnostycznych. Wstępne porównanie podstawowych parametrów metod LPBE/SN i SPCE wskazuje na większą użyteczność SPCE do zakrojonych na szeroką skalę serologicznych badań przeglądowych (14).

Celem badań było określenie podstawowych parametrów metody SPCE, tzn. specyficzności, czułości oraz precyzji – powtarzalności i odtwarzalności.

### Materiał i metody

**Surowice.** W badaniach walidacyjnych wykorzystano następujące surowice:

– surowice ujemne: 760 próbek od zwierząt zdrowych, nigdy nie szczepionych przeciwko pryszczycy i które nigdy nie miały kontaktu z wirusem pryszczycy, co wcześniej potwierdzono w odczynie SN i/lub LPBE;

– surowice dodatnie: 220 próbek surowic archiwalnych „poszczepiennych” od bydła z regionu Zduńskiej Woli, które w latach 1985-1989 systematycznie, corocznie szczepiono szczepionką trójwartościową A, O i C. Wykorzystano także 42 próbki surowicy od ozdrowieńców, po wcześniejszym zakażeniu wirusem pryszczycy serotyp A, O, C i Asia 1, ze Światowego Laboratorium Referencyjnego ds. Pryszczycy (WRL FMD) w Pirbright (Anglia). Ponadto użyto zestawów surowic referencyjnych A, O i Asia 1 – ujemna (–), dwie słabo dodatnie (+) oraz silnie dodatnia (++) , które sporządzono dla potrzeb międzylaboratoryjnych badań porównawczych (17).

**ELISA.** Test SPCE wykonano zgodnie z zaleceniem dla międzylaboratoryjnych badań doskonałości (17). Jest to zmodyfikowana wersja metody oryginalnej opisanej przez Mackaya i wsp. (12), ze zmianą polegającą na zastosowaniu supernatantu z zakażonej hodowli komórkowej w miejsce antygeny oczyszczonego w gradiencie gęstości sacharozu.

#### Schemat badania

Adsorpcja przeciwciał króliczych homologicznych dla wirusa pryszczycy. Wszystkie zagłębienia płytki płaskodennej napełnia się surowicą odpornościową króliczą anty-pryszczycową (50 µl/zagłębienie) w rozcieńczeniu roboczym i pozostawia na 16-20 godzin w temperaturze 5°C (± 3°C).

**Przemycie buforem.** Z zagłębienia płytki usunąć surowicę króliczą przez silne wytrząśnięcie. Do wszystkich zagłębień dodać po około 300 µl buforu PBS i po 10-15 sekundach usunąć. Czynność powtórzyć 4-krotnie. Po ostatnim przemyciu resztki buforu usunąć przez kilkakrotne energiczne wytrząśnięcie. Płytki używać bezpośrednio do badania lub przechowywać w temp. poniżej –18°C.

**Inkubacja z antygenem.** Do wszystkich zagłębień płytki dodać po 50 µl antygeny wirusa pryszczycy rozcieńczonego w buforze blokującym (PBS zawierający 10% normalnej surowicy

widzącej i 5% normalnej surowicy króliczej) i płytkę pozostawić na 1 godz. w temp. 37°C (± 1°C) na wytrząsarce rotacyjnej.

**Reakcja z surowicami kontrolnymi, badanymi i surowicą odpornościową świnki morskiej.** Płytkę przemyc zgodnie z punktem 2 i do wszystkich zagłębień dodać po 40 µl bufora blokującego oraz dodatkowo 10 µl do zagłębień z kontrolą antygeny (bez surowicy) i 60 µl do zagłębień z kontrolą koniugatu. Do odpowiednich zagłębień dodać po 10 µl surowic badanych i kontrolnych (wstępne rozcieńczenie surowic wynosi 1 : 5). Bezpośrednio po dodaniu tych surowic przygotowuje się robocze rozcieńczenie homologicznej surowicy odpornościowej świnki morskiej anty-pryszczycowej w buforze blokującym i natychmiast dodaje po 50 µl do wszystkich zagłębień płytki, z wyjątkiem zagłębienia kontroli koniugatu. Po dodaniu surowicy odpornościowej świnki morskiej końcowe rozcieńczenie surowic badanych (kontrolnych) wynosi 1 : 10. Płytkę pozostawić na 1 godz. w temp. 37°C (± 1°C) na wytrząsarce rotacyjnej.

**Reakcja z koniugatem.** Płytkę przemyc zgodnie z punktem 2 i do wszystkich zagłębień dodać po 50 µl koniugatu w buforze blokującym i pozostawić na 1 godz. w temp. 37°C (± 1°C) na wytrząsarce rotacyjnej, ciągle mieszając.

**Wywołanie reakcji barwnej.** Płytkę przemyc zgodnie z punktem 2 i do wszystkich zagłębień dodać po 50 µl odpowiednio przygotowanej mieszaniny OPD/substrat, przykryć i pozostawić na 10-25 minut w temperaturze pokojowej do momentu, aż OD<sub>492</sub> w zagłębieniach kontroli antygeny osiągnie wartość w granicach od 0,4 do 1,4.

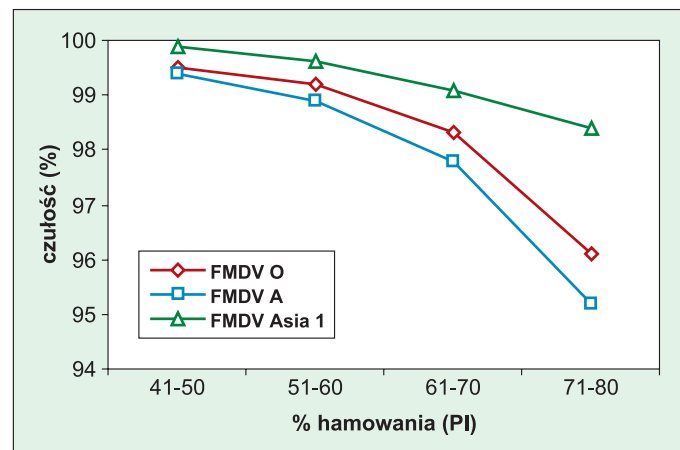
**Hamowanie reakcji.** Do wszystkich zagłębień płytki dodać po 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wynik odczytać spektrofotometrycznie przy długości fali 492 nm.

**Wyniki.** Procent hamowania (PI) oblicza się wg następującego wzoru:

$$PI = 100 - \left( \frac{OD_{492} \text{ surowicy badanej lub kontrolnej} - \text{średnia } OD_{492} \text{ kontroli koniugatu}}{\text{średnia } OD_{492} \text{ kontroli antygeny} - \text{średnia } OD_{492} \text{ kontroli koniugatu}} \right) \times 100.$$

### Wyniki i omówienie

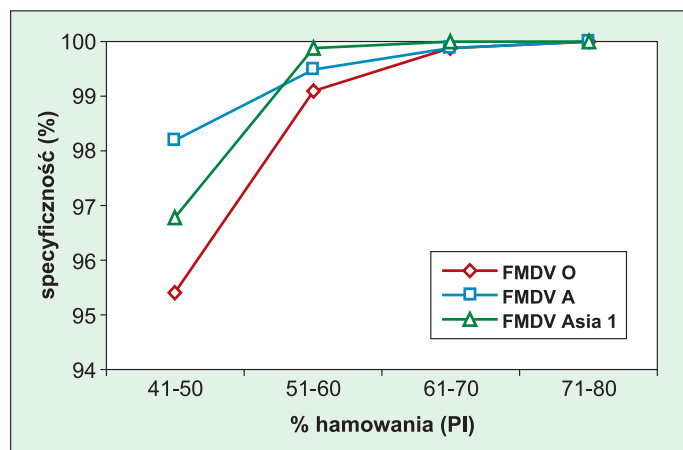
**Czułość metody SPCE.** Do badań użyto surowic dodatnich od zwierząt ozdrowieńców i szczepionych przeciwko pryszczycy. Badanie czułości wykonano w czterech zakresach PI (ryc. 1). Najwyższą czułość – powyżej 99% dla wszystkich serotypów wirusa pryszczycy stwierdzono przy PI 41-50, a w kolejnych, wyższych zakresach PI obserwowano obniżanie się czułości metody. Przy wartości progowej PI 60, spośród 212 surowic dodat-



Ryc. 1. Czułość metody SPCE

nich w odczynie SN i/lub LPBE, 209 (98,6%) oznaczono jako dodatnie w kierunku przeciwciał dla serotypu A i 210 (99,1%) dla serotypu O wirusa pryszczycy. Nieco wyższą czułość – 99,6%, wykazano w przypadku serotypu Asia 1, co mogło wynikać z użycia surowic pochodzących wyłącznie od ozdrowieńców, po zakażeniu doświadczalnym. Podobne wyniki otrzymali Chenard i wsp. (6), badając surowice od zwierząt po zakażeniu i po szczepieniu – z ogólnej liczby 238 badanych surowic wynik dodatni uzyskano w odniesieniu do 96,9-99,8% próbek, przy czym wyższą czułość stwierdzono w przypadku surowic od zwierząt zakażonych. Prawdopodobnie spowodowane jest to silniejszą odpowiedzią immunologiczną organizmu na zakażenie niż na szczepienie. W kilka dni po zakażeniu występuje wiremia, której towarzyszy serokonwersja (1), a miano powstałych przeciwciał zależy od czasu, który upłynął od zakażenia. Jest ono najniższe (poniżej przyjętej wartości progowej metody) we wczesnym stadium zakażenia (4-5 dni), a następnie rośnie gwałtownie (2). Można przypuszczać, że wysoka czułość metody SPCE stwierdzona w badaniach własnych w kierunku przeciwciał dla serotypu Asia 1 wirusa pryszczycy wynika z użycia surowic pobranych co najmniej 2 tygodnie po zakażeniu zwierząt. Badając surowice referencyjne od ozdrowieńców, czułość SPCE bliską 100% dla wszystkich serotypów wirusa pryszczycy wykazali także inni badacze (12). Na podstawie wyników badań własnych i danych piśmiennictwa można stwierdzić, że czułość metody SPCE zależy od przyjętej wartości progowej PI, od której surowice uznaje się za dodatnie. Wraz ze wzrostem wartości PI czułość ulega obniżeniu (3, 6).

**Ocena specyficzności metody SPCE.** Do badania wykorzystano surowice od zwierząt zdrowych, których nigdy nie szczepiono przeciwko pryszczycy i które nigdy nie miały kontaktu z wirusem pryszczycy. Podobnie jak w przypadku oceny czułości, badanie specyficzności wykonano w czterech różnych zakresach PI (ryc. 2). Wykazano, że w odróżnieniu od czułości metody SPCE, jej specyficzność wzrasta w kolejnych badanych zakresach PI. Dla wartości progowej PI równej 50 specyficzność wynosi 95,4% dla serotypu O, 98,2% dla serotypu A i 96,8% dla serotypu Asia 1 wirusa pryszczycy. W zakresie wartości PI 51-60 specyficzność dla wszystkich serotypów wirusa pryszczycy wynosi > 99%, natomiast



Ryc. 2. Specyficzność metody SPCE

przy PI 61-70 jest bliska 100% (serotypy O i A – 99,9%) lub równa tej wartości (serotyp Asia 1). Przy PI powyżej 70, specyficzność dla wszystkich serotypów wirusa pryszczycy wynosi 100%. Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność stosowania dla metody SPCE wartości progowej PI co najmniej 60, przy której odsetek wyników nieswoiście dodatnich jest minimalny (< 1%). Na potrzebę weryfikacji wartości progowej PI określonej dla metody SPCE na 30% (12) wskazywał już wcześniej Dekker (dane nie publikowane), podczas spotkania przedstawicieli laboratoriów referencyjnych pryszczycy w Brukseli w marcu 2001 r. Dalsze badania jego zespołu wykonane z użyciem surowic referencyjnych wykazały znaczny wzrost specyficzności metody przy wartości progowej PI 60, przy jednoczesnym nieznacznym spadku czułości (6). Podobne wyniki otrzymano także w WRL FMD, gdzie dla serotypów A i C wirusa pryszczycy czułość metody SPCE równą 100% uzyskano już przy PI 50 (16). Wyniki zbiorcze badania specyficzności metody SPCE wykonane przez kilka laboratoriów na około 5000 próbkach surowic w ramach fazy XVIII międzylaboratoryjnych testów doskonałości, wskazują na potrzebę podniesienia wartości progowej metody SPCE do PI 60. Stosowanie takiej wartości progowej zaleca się wszystkim laboratoriom, które rutynowo wykorzystują metodę SPCE do badań monitoringowych (17).

**Ocena precyzji metody.** Wykorzystując surowice referencyjne dostarczone z WRL FMD dla potrzeb porównań międzylaboratoryjnych badano powtarzalność metody, wyrażaną jako współczynnik wariacji (CV) wyników badania próbek surowicy referencyjnej przeprowadzonych tego samego dnia (5-krotnie) oraz w różnych dniach przez okres 2 miesiące (8-krotnie) przez tę samą osobę, przy wykorzystaniu tego samego sprzętu i w tych samych warunkach (tab. 1). Wartości CV dla 9 z 10 surowic referencyjnych silnie dodatnich (++) i słabo dodatnich (+) mieściły się w zakresie od 6,6% do 9,8%, czyli poniżej 10% przyjętej za maksymalną dla akceptowalnej powtarzalności metody (10). Tylko w przypadku

Tab. 1. Powtarzalność metody SPCE

Surowica referencyjna – serotyp	Badania wykonane w tym samym dniu			Badania wykonane w różnych dniach		
	PI	S	CV	PI	S	CV
O (++)	96	8,2	8,5	98	8,6	8,7
O (+)1	82	7,1	8,6	86	7,3	8,4
O (+)2	64	6,3	9,8	68	5,6	8,2
A (++)	90	6,4	7,1	95	7,1	7,5
A (+)1	48	4,7	9,8	53	5,0	9,4
A (+)2	37	4,2	11,3	42	4,8	11,4
Asia 1 (++)	98	8,4	8,6	99	7,2	7,3
Asia 1 (+)1	89	7,7	8,6	92	6,2	6,7
Asia 1 (+)2	77	5,3	6,9	81	5,4	6,7
ujemna (-)	3,0	0,2	6,6	2,0	0,1	5,0

Objaśnienia: (++) – silnie dodatnia; (+) – słabo dodatnia; (-) – ujemna; PI – średnia wartość hamowania (%); S – odchylenie standardowe; CV – współczynnik wariacji (%)

Tab. 2. Odtwarzalność metody SPCE

Surowica referencyjna – serotyp	PI	S	CV
O (++)	98	8,9	9,1
O (+)1	87	8,1	9,3
O (+) 2	67	6,7	10,0
A (++)	93	7,7	8,3
A (+)1	53	7,1	13,3
A (+)2	45	6,8	15,1
Asia 1 (++)	98	8,2	8,4
Asia 1 (+)1	91	7,8	8,6
Asia 1 (+) 2	79	7,7	9,7
ujemna (-)	2,5	0,1	4,0

Objaśnienia: jak w tab. 1.

jednej surowicy słabo dodatniej dla serotypu A wirusa pryszczycy uzyskano wartość CV wyższą od granicznej (11,3%). Należy jednak zaznaczyć, że wartość PI obu surowic słabo dodatnich dla tego serotypu określona przez większość laboratoriów uczestniczących w badaniach doskonałości była znacznie niższa od oczekiwanej i zgodnie z podjętą decyzją, standardy te zostaną wkrótce zastąpione innymi o odpowiednim statusie (17). Powtarzalność metody SPCE określona w naszym laboratorium jest zbliżona do uzyskanej ostatnio przez Paibę i wsp. (16) oraz nieco wyższa od metody solid-phase blocking ELISA (6). Badanie odtwarzalności wykonuje się standardowo określając zmienność wyników badań uzyskanych w kilku różnych laboratoriach. Zakład Pryszczycy w Zduńskiej Woli jest jedynym laboratorium w Polsce uprawnionym do wykonywania badań z zakresu pryszczycy, dlatego badanie odtwarzalności metody SPCE mogło być przeprowadzone wyłącznie na podstawie wyników uzyskanych w naszym laboratorium. W związku z tym do oceny odtwarzalności metody SPCE wykorzystano wyniki 6 kolejnych badań tych samych próbek surowicy, wykonanych w czasie 6 miesięcy przez różnych pracowników. Odtwarzalność metody charakteryzowała się większą zmiennością wyników niż stwierdzono podczas badania jej powtarzalności – dla wszystkich badanych surowic wartość CV była wyższa, a w przypadku dwóch próbek (surowice referencyjne słabo dodatnie dla serotypu A wirusa pryszczycy) przekroczyła akceptowalną wartość maksymalną (tab. 2). Ocena odtwarzalności metody SPCE wykonana w WRL FMD na podstawie wyników badań uzyskanych w czterech krajowych laboratoriach w Wielkiej Brytanii wykazała, że wszystkie laboratoria właściwie określiły wartość PI surowic referencyjnych. Tylko w przypadku jednej z dwóch surowic referencyjnych słabo dodatnich, wartości te znacznie odbiegały od prawidłowych (16). Chenard i wsp. (6) z powodu braku wyników z różnych laboratoriów, do oceny odtwarzalności metody solid-phase blocking ELISA wykorzystali wyniki uzyskane po dwukrotnym badaniu dużej liczby surowic (289, w tym 247 dodatnich) z użyciem zestawów do testu ELISA wyprodukowanych w różnym czasie. Wykazano podobieństwo wy-

ników obu badań na poziomie 97% i wysoki indeks zgodności (współczynnik kappa równy 0,94).

Reasumując, można stwierdzić, że określone w niniejszej pracy parametry metody SPCE predysponują ją do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej pryszczycy. Decydują o tym: wysoka czułość i precyzja a przede wszystkim specyficzność metody. Z tego powodu jest ona szczególnie przydatna do oceny statusu immunologicznego zwierząt w związku z badaniami monitoringowymi i międzynarodowym handlem zwierzętami.

## Piśmiennictwo

- Alexandersen S., Kitching R. P., Mansley L. M., Donaldson A. I.: Clinical and laboratory investigations of five reported outbreaks during the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2003, 152, 489-496.
- Alexandersen S., Quan M., Murphy C., Knight J., Zhang Z.: Studies on the quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.* 2003, 129, 268-282.
- Anderson J., Corteyn M., Gibson D., Hamblin P., Paton D.: Further validation of the solid-phase competitive ELISA for FMDV types A, C and Asia 1. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Gerzensee, Berne, Switzerland 16-19 September 2003, s. 157-165.
- Anon.: Report of the Meeting on Foot and Mouth Disease Serology at the Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (PVET/EN/97/1739R1), Tübingen, Germany 22-23.01.1997.
- Anon.: Foot-and-mouth disease, [w:] OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004, 111-128.
- Chenard G., Miedema K., Moonen P., Schrijver R. S., Dekker A.: A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology. *J. Virol. Methods* 2003, 197, 89-98.
- Haas B.: Application of the FMD liquid-phase blocking sandwich ELISA. Problems encountered in import/export serology and possible solutions. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Vienna 19-22 September 1994, s. 124-127.
- Hamblin C., Barnett I. T. R., Crowther J. R.: A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. *J. Immunol. Methods* 1986, 93, 123-129.
- Hamblin C., Barnett I. T. R., Hedger R. S.: A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods* 1986, 93, 115-121.
- Jacobson R. H.: Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1998, 17, 469-486.
- Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G.: Występowanie przeciwciał pryszczycowych u bydła eksportowanego z Polski w latach 1993-1995. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 520-522.
- Mackay D. K. J., Bulut A. N., Rendle T., Davidson F., Ferris N. P.: A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods* 2001, 97, 33-48.
- Mackay D. K. J., Rendle T., Armstrong R. M.: FAO/OIE Collaborative Study Phase XIII: Standardization of the FMD antibody detection ELISA. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Vienna 19-22 September 1994, s. 128-145.
- Niedbalski W.: Comparison of different ELISA methods for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2004, 48, 5-9.
- Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G., Kęsy A.: Application of liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1994, 38, 105-114.
- Paiba G. A., Anderson J., Paton D. J., Soldan A. W., Alexandersen S., Corteyn M., Wilsden G., Hamblin P., Mackay D. K. J., Donaldson A. I.: Validation of foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods* 2004, 115, 145-158.
- Paton D. J., Armstrong R. M., Fernandez R., Hamblin P. A., Turner L., Corteyn M., Gibson D., Parida S., Wright C., Anderson J.: FAO Phase XVIII serological standardization; progress and future prospects. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Chania, Crete, Greece 11-15 October 2004, s. 77-94.

Adres autora: doc. dr hab. Wiesław Niedbalski, ul. Zielona 48/4, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: wieslaw@piwzp.invar.net.pl