

# Strategia DIVA w zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt

WOJCIECH SZWEDA

Katedra Epizootiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Szweda W.

## DIVA strategy in the eradication of infectious diseases of animals

Summary

The article discusses the essence, purposes, methods of realizing and benefits of applying DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the eradication of infectious diseases of animals. Various types of marker vaccines and compatible serological tests suitable for use in this strategy are characterized.

The article presents possibilities, principles, results and perspectives of applying DIVA strategy to eradicate Aujeszky's disease, infectious bovine rhinotracheitis, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and mucosal disease, foot and mouth disease, avian influenza, porcine parvovirus infection, bluetongue, equine influenza and African horse sickness.

Through the application of marker vaccines which enable differentiation between infected and vaccinated animals as well as detection of asymptomatic carriers and shedders, DIVA strategy makes it possible to rid the population of many dangerous pathogens causing epizootics and panzootics. In appreciating the considerable importance of modern marker vaccines in the comprehensive eradication programmes for infectious diseases, this strategy not only considerably reduces economic losses and restores possibilities of international trade in animals and animal products, but also constitutes an alternative to the extremely expensive and sometimes strongly criticized administrative eradication method. That is why DIVA strategy should be more and more often applied for the eradication of infectious diseases in animals, but some of its elements, concerning mainly vaccine evaluation and the monitoring of infections in vaccinated and non-vaccinated groups of people, could also be utilized in public health protection.

**Keywords:** infectious diseases, eradication, DIVA strategy

Choroby zakaźne stanowią ciągle ważną przyczynę znacznych strat w chowie i hodowli zwierząt w skali świata, wpływając jednocześnie na pogorszenie ich dobrostanu oraz obniżenie jakości żywności pochodzenia zwierzęcego (9, 16). W ochronie przed chorobami zakaźnymi niezwykle istotną rolę odgrywa immunoprofilaktyka swoista z wykorzystaniem coraz doskonalszych generacji szczepionek (38).

Szczepionki, stworzone początkowo dla zabezpieczenia przed zachorowaniem, stanowią nadal jedno z najsilniejszych profilaktycznych narzędzi w ochronie zdrowia zwierząt i ludzi. Jako ważny element kontroli chorób pozwalają na utrzymywanie dobrego stanu zdrowia zwierząt w intensywnych i ekstensywnych systemach chowu. Znajdują wreszcie coraz większe zastosowanie w programach zwalczania chorób zakaźnych, umożliwiając całkowitą eliminację danego zarazka z populacji ludzi czy zwierząt (33). Przykładami tego typu działań może być uwolnienie populacji człowieka od wirusa ospy prawdziwej, ogłoszone przez WHO w 1980 r., czy zakończone sukcesem w wielu krajach uwolnienie populacji świń od wirusa choroby

Aujeszky'ego (chA) (37). Skuteczna realizacja programu zwalczania chA, który w maju 2008 r. został wdrożony w naszym kraju, stała się możliwa dzięki opracowaniu nowej generacji szczepionek (25, 30).

Liczne badania i obserwacje terenowe dowodzą, że szczepionki są niezbędne nie tylko w procesie ekonomicznego chowu i hodowli zwierząt gospodarskich, ale także w ochronie zdrowia zwierząt domowych i wolno żyjących, a poprzez zapobieganie rozprzestrzenianiu zoonoz i redukcji siewstwa drobnoustrojów chorobotwórczych – również w ochronie zdrowia publicznego i ochronie środowiska. Stosowanie szczepionek w przypadku wielu jednostek chorobowych umożliwia krajowy i międzynarodowy obrót oraz handel zwierzętami i produktami pochodzenia zwierzęcego, a w niektórych sytuacjach pozwala unikać zabijania zwierząt podejrzanych o zakażenie w zwalczaniu chorób, gdzie z reguły stosuje się metody administracyjne.

W profilaktyce chorób zakaźnych zwierząt od dawna były i nadal są stosowane szczepionki konwencjonalne w celu nie dopuszczania do zakażenia bądź wy-

stąpienia objawów choroby lub przynajmniej zmniejszenia ich natężenia po zakażeniu. Szczepionki te, mimo redukcji siewstwa zjadliwego zarazka oraz ograniczenia jego krążenia w środowisku, nie dają jednak możliwości jego eliminacji z populacji zwierząt, ze względu na niemożność odróżnienia osobników zakażonych od szczepionych. Zatem stosowanie szczepionek konwencjonalnych, aczkolwiek o dużym znaczeniu ekonomicznym i nawet epizootycznym, uniemożliwia ocenę występowania, stopnia rozprzestrzenienia i krążenia zjadliwego zarazka wśród zwierząt szczepionych, a tym samym zwalczanie choroby w rozumieniu eliminacji zarazka z populacji.

Przełomowym momentem w zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt przy pomocy szczepień było stworzenie w latach 80. ubiegłego wieku szczepionek delecyjnych przeciw chA. Szczepionki te, należące do grupy szczepionek znakowanych lub markerowych (marker vaccines), powstały z potrzeby opracowania metody serologicznego różnicowania świń szczepionych przeciw chA i zakażonych zjadliwym *Herpesvirus suis* typ 1 (SHV-1) w krajach stosujących masowe szczepienia jako metodę zwalczania chA (15, 25, 30, 40). W ślad za chA szczepionki markerowe opracowano również przeciw innym chorobom zakaźnym i tak narodziła się strategia DIVA, jako nowa metoda zwalczania chorób zakaźnych zwierząt. Termin DIVA pochodzi od pierwszych liter słów: Differentiating Infected from Vaccinated Animals (8) lub Differentiating Infected from Vaccinated individuals (23) i oznacza „odróżnianie zwierząt zakażonych od szczepionych”. W realizacji tej strategii zwalczania mogą być stosowane różne szczepionki markerowe, dlatego van Oirschot (23) zaproponował dla nich określenie szczepionki diva (diva vaccines).

Szczepionki delecyjne stosowane w strategii DIVA są oparte na drobnoustrojach pozbawionych zwykle jednego lub kilku białek (glikoprotein) antygenowych, które posiada zarazek zjadliwy (marker ujemny). Natomiast wprowadzenie do zarazka szczepionkowego dodatkowego białka (marker dodatni) jest nieprzydatne, ponieważ istotą tej strategii jest wykrywanie zwierząt zakażonych wśród szczepionych, a nie zwierząt szczepionych. Celowi temu służą specjalne testy serologiczne do wykrywania przeciwciał przeciwko antygenom usuniętym z zarazków szczepionkowych, które występują u zwierząt zakażonych, a nie występują u zwierząt szczepionych, nie zakażonych. Testy te umożliwiają także ocenę krążenia zjadliwych szczepów danego zarazka w populacjach zwierząt szczepionych oraz ocenę skuteczności szczepionek w warunkach terenowych (26, 28). Klasycznymi przykładami szczepionek markerowych są delecyjne szczepionki przeciw chA oraz zakaźnemu zapaleniu nosa i tchawicy bydła (IBR) (14, 25, 27). W strategii DIVA mogą być jednak z powodzeniem stosowane również inne szczepionki, np. podjednostkowe, DNA, wektorowe czy nawet konwencjonalne inaktywowane i od-

powiadające im testy serologiczne do różnicowania zwierząt zakażonych i szczepionych. Jako przykłady można podać strategie zwalczania pomoru klasycznego świń (pkś), wirusowej biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD), pryszczycy czy grypy ptaków (7, 8, 13, 18, 31).

Pierwszymi szczepionkami, które umożliwiły wdrożenie strategii DIVA do zwalczania chorób zakaźnych, były szczepionki delecyjne przeciw chA (15, 25). Ich opracowanie było możliwe dzięki gwałtownemu rozwojowi biologii molekularnej w latach 80. XX wieku, opracowaniu technik mapowania genomu wielu wirusów, w tym tych z rodziny *Herpesviridae* (SHV-1, BHV-1) oraz określeniu roli poszczególnych glikoprotein otoczkowych i enzymów w zjadliwości, wnikanii, replikacji i transmisji wirusów oraz mechanizmów patogenezы i stymulacji odpowiedzi immunologicznej (20, 21). Konstrukcja tych szczepionek była oparta na mutantach delecyjnych, tzn. zjadliwych szczepach wirusa pozbawionych genów (delecja) odpowiedzialnych za ekspresję określonych glikoprotein otoczkowych (25, 30). Dla ujednocnienia programów zwalczania chA w mutantach SHV-1 najczęściej dokonywano delecji genu dla glikoproteiny gE (ujemny marker serologiczny). Świnie immunizowane takimi szczepionkami nie wytwarzają wówczas przeciwciał anti-gE, co pozwala na odróżnienie zwierząt zakażonych od szczepionych przy pomocy testu gE-ELISA (29). Oprócz tej właściwości szczepionki delecyjne ograniczają siewstwo zjadliwego SHV-1 do środowiska i są bezpieczne dla płodów, a szczepy szczepionkowe nie szerzą się w populacji świń i wykazują stabilność genetyczną wyrażającą się brakiem rewersji do zjadliwości. Istotne jest, aby glikoproteina wykorzystywana jako marker serologiczny nie obniżała znacząco immunogenności mutantu delecyjnego, występowała we wszystkich szczepach terenowych wirusa oraz stymulowała po zakażeniu szybko powstające, długo utrzymujące się i łatwo wykrywalne przeciwciała (24). Zasadniczą cechą szczepionki delecyjnej jest zatem wywołanie określonej, charakterystycznej, różnicowej reakcji immunologicznej, będącej rezultatem podania odpowiedniego wirusa szczepionkowego lub zakażenia (28). Dlatego, zdaniem van Oirschota (24), szczepionka delecyjna powinna być raczej określana terminem: szczepionka ARD (Antibody Response Differentiable). Właśnie tę różnicową reakcję serologiczną poszczepienną i pozakaźną wykorzystuje się w strategii DIVA również do zwalczania innych chorób zakaźnych przy użyciu odmiennych od delecyjnych rodzajów szczepionek.

Strategia DIVA zwalczania chA oparta na stosowaniu szczepionek delecyjnych i kompatybilnych testów serologicznych w ramach programu „szczepienie–eliminacja” (vaccination–eradication programme) (35, 36) doprowadziła już w wielu krajach europejskich i w USA do uwolnienia populacji świń od wirusa chA, w innych program ten jest bliski pozytywnego zakoń-

czenia lub mocno zaawansowany. Wdrożony w 2008 r. w Polsce program zwalczania chA, realizowany intensywnie i prawidłowo z wykorzystaniem strategii DIVA powinien, podobnie jak w innych krajach, przynieść oczekiwane rezultaty w realnej perspektywie czasowej (37).

W analogiczny sposób strategia DIVA jest wykorzystywana w niektórych krajach do zwalczania IBR. Uwalnianie populacji bydła od BHV-1 jest również dokonywane przy pomocy programu „szczepienie–eliminacja”, realizowanego w oparciu o żywe i inaktywowane delecyjne szczepionki gE-negatywne i odpowiadające im testy gE-ELISA (14, 26, 27). Może być ona realizowana także w oparciu o podjednostkową szczepionkę zawierającą glikoproteinę gD, a pozostałe immunogenne proteiny otoczkowe BHV-1, które indukują długo utrzymującą się reakcję humoralną, włączając gE, mogą być użyte jako marker w testach serologicznych do różnicowania zwierząt szczepionych od zakażonych (5, 11).

Strategia DIVA może stanowić alternatywę metody administracyjnej w zwalczaniu pomoru klasycznego świń (pkś). W Unii Europejskiej od 1992 r. obowiązuje zakaz szczepień przeciw pkś, ale opracowano kilka typów nowoczesnych szczepionek markerowych i odpowiadających im testów serologicznych, możliwych do zastosowania w przypadku trudności z opanowaniem epizootii pkś metodą administracyjną (2). Konstrukcja tych szczepionek oparta jest na otoczkowej proteinie E2, uznawanej za główny immunogen wirusa o aktywności neutralizującej, produkowanej lub eksponowanej w różnych systemach ekspresyjnych, a ich skuteczność jest podobna do konwencjonalnych, żywych, zmodyfikowanych szczepionek przeciw pkś (2). Do tej grupy należą: szczepionki podjednostkowe zawierające pojedyncze peptydy lub mieszaninę peptydów z antygenowych domen BC lub A proteiny E2, szczepionki DNA na bazie plazmidów wyposażonych w sekwencje kodujące E2, szczepionki wektorowe z genem E2 włączonym w genom wirusów krowianki, chA, adenowirusa, parapoxwirusa lub wirusa ospy świń. Opracowano również szczepionki zawierające chimery pestiwirusowe z sekwencjami kodującymi E2 wirusa pkś, włączonymi do genomu wirusa BVD, albo odwrotnie z sekwencjami dla E2 wirusa BVD lub wirusa choroby granicznej (BD), włączonymi w genom wirusa pkś, a także trans-komplementarne replikony z delecjami w regionach kodujących proteiny E2 lub E<sup>RNS</sup> (2). Serologiczne różnicowanie zwierząt szczepionych wymienionymi szczepionkami od zakażonych oparte jest głównie na wykrywaniu przeciwciał przeciw proteinie otoczkowej E<sup>RNS</sup> (12). Testy wykrywające przeciwciała przeciw niestrukturalnej proteinie NS3 są mniej przydatne, ponieważ wykrywają zakażenie pestiwirusami innymi niż wirus pkś (23).

W podobny sposób można wykorzystać strategię DIVA w zwalczaniu BVD-MD przy pomocy podjednostkowej szczepionki zawierającej proteinę E2 i kom-

plementarnego testu serologicznego (7). Zwierzęta szczepione od zakażonych można także odróżnić, stosując szczepionkę inaktywowaną i test ELISA, który wykrywa w próbkach surowicy lub mleka przeciwciała swoiste przeciwko proteinie niestrukturalnej NS3, produkowanej przez żywe szczepy zjadliwe, a nie produkowanej przez inaktywowane szczepy szczepionkowe (19).

Na szczepionkach inaktywowanych oparta jest również strategia DIVA zwalczania pryszczycy. Zasada różnicowania zwierząt zakażonych od szczepionych uwzględnia fakt, że wirus żywy ma zdolność replikacji i oprócz strukturalnych białek kapsydu (VP1-VP4) produkuje również szereg białek niestrukturalnych (2A-C, 3A-D), natomiast inaktywowany wirus szczepionkowy, na bazie którego wytwarzane są aktualne szczepionki przeciw pryszczycy, oprócz białek kapsydu produkuje jedynie proteinę 3D (3, 22). Zatem wykrycie przeciwciał przeciw najbardziej immunogennemu polipeptydowi 3ABC umożliwia odróżnienie zwierząt zakażonych od szczepionych. Przeciwciała te utrzymują się nawet do 560 dni po zakażeniu i są najbardziej wiarygodnym, serologicznym wskaźnikiem zakażenia wirusem pryszczycy, na którym oparto większość aktualnie dostępnych testów serologicznych (10, 17).

Wobec problemów, jakie stwarza influenza ptaków, czynione są próby zastosowania strategii DIVA do zwalczania tej choroby z wykorzystaniem szczepionek podjednostkowych i wektorowych (34). Bardziej obiecujące są metody oparte na stosowaniu szczepionek inaktywowanych, w których szczepy szczepionkowe i zjadliwy mają identyczną hemaglutyninę, ale różne neuraminidazy, np. H7N3 i H7N2, wówczas wykrywając przeciwciała anty-N3 można odróżnić ptaki szczepione od zakażonych (8). W podobny sposób można dokonać tego różnicowania, wykrywając przeciwciała przeciw proteinie niestrukturalnej NS1, którą produkują szczepy zjadliwe, a nie inaktywowane szczepy szczepionkowe (39). Wykrywanie przeciwciał anty-NS1 wykorzystuje się również do różnicowania świń zakażonych parwowirusem (32), małych przeżuwaczy – wirusem choroby niebieskiego języka (1) i koni – wirusami grypy koni (4) oraz afrykańskiego pomoru koni (6).

Nową, obiecującą perspektywę stanowi genetyczna strategia DIVA (genetic DIVA strategy), w której dopuszcza się stosowanie zarówno szczepionek nowoczesnych, jak i konwencjonalnych, a różnicowanie zwierząt zakażonych i szczepionych odbywa się metodami bezpośrednimi (wykrywanie zarazka), a nie pośrednimi (wykrywanie przeciwciał) (2).

Podsumowując należy stwierdzić, że strategia DIVA, poprzez wykorzystanie szczepionek markerowych, umożliwiających różnicowanie zwierząt zakażonych i szczepionych oraz wykrywanie bezobjawowych nosicieli i siewców, stwarza szansę uwolnienia populacji od wielu niebezpiecznych patogenów, powodują-

cych epizootie i panzootie. Doceniając znaczącą rolę nowoczesnych szczepionek markerowych w kompleksowych programach zwalczania chorób zakaźnych strategia ta wpływa nie tylko na znaczne obniżenie strat ekonomicznych i przywrócenie możliwości międzynarodowego obrotu zwierzętami i produktami pochodzenia zwierzęcego, ale stanowi również alternatywę niezwykle kosztownej i mocno czasami krytykowanej administracyjnej metody zwalczania. Dlatego strategia DIVA powinna być coraz częściej stosowana w zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, a pewne jej elementy, dotyczące zwłaszcza oceny szczepionek i monitorowania zakażeń w grupach ludzi szczepionych i nie szczepionych, mogą być również wykorzystane w ochronie zdrowia publicznego (23).

### Piśmiennictwo

- Anderson J., Martens P. P. C., Herniman K. A. J.: A competitive ELISA for the detection of anti-tubule antibodies using a monoclonal antibody against Bluetongue virus non-structural protein NS1. *J. Virol. Methods* 1993, 43, 167-176.
- Beer M., Reimann I., Hoffmann B., Depner K.: Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 2007, 25, 5665-5670.
- Berger H. G., Straub O., Ahl R., Tesar M., Marquardt O.: Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structural proteins. *Vaccine* 1990, 8, 213-216.
- Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Binns M.: Expression of the non-structural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *J. Virol. Methods* 1997, 65, 255-263.
- Bosch J. C., de Jong M. C., Franken P., Frankena K., Hage J. J., Kaashoek M. J., Maris-Veldhuis M. A., Noordhuizen J. P., van der Poel W. H., Verhoeff J., Weerdmeester K., Zimmer G. M., van Oirschot J. T.: An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* 1998, 16, 265-271.
- Bougrine S. J., Fehri O. F., Fehri M. M.: Western immunoblotting as a method for the detection of African horse sickness virus protein-specific antibodies: differentiation between infected and vaccinated horses. *Arch. Virol. Suppl.* 1998, 14, 329-336.
- Bruschke C. J. M., Moormann R. J. M., van Oirschot J. T., van Rijn P. A.: A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine* 1997, 15, 1940-1945.
- Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez J. F.: Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 2003, 32, 47-55.
- Cohen M. L.: Changing patterns of infectious diseases. *Nature* 2000, 406, 762-767.
- Diego M. de, Brocchi E., Mackay D., de Simone 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.
- Drunen Little van -van den Hurk S.: Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 2006, 113, 275-282.
- Floegel-Niesmann G.: Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISA. *Vet. Microbiol.* 2001, 83, 121-136.
- Harpin S., Talbot B., Mbikay M., Elazhary Y.: Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 146, 229-234.
- Kaashoek M. J., Moerman A., Medic J. A., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M. A., Rijsewijk F. A. M., van Oirschot J. T.: An inactivated vaccine based on a glycoprotein gE-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 1995, 13, 342-346.
- Kit S.: Genetically engineered vaccines for control of Aujeszky's disease (pseudorabies). *Vaccine* 1990, 8, 420-424.
- Kita J.: O ciągłości chorób zakaźnych, czyli dawne i nowe epidemie-epizootie. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 529-533.
- 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.
- Mackay D. K. J.: Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. Quart.* 1998, 20, 20-24.
- Makoschey B., Sonnemans D., Munoz Bielasa J., Franken P., Mars M., Santos S., Alvarez M.: Ein inaktivierter Impfstoff gegen die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) hat Eigenschaften einer Markervakzine. 6. Stendaler Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberculose-Bekämpfung. Stendal 2007, s. 56.
- Mulder W. A. M., Pol J. M. A., Gruys E., Jacobs L., De Jong M. C. M., Peeters B. P. M., Kimman T. G.: Pseudorabies virus infection in pigs. Role of viral proteins in virulence, pathogenesis and transmission. *Vet. Res.* 1997, 28, 1-17.
- Nauwynck H. J.: Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 3-11.
- Niedbalski W., Kęsy A.: Serologiczne różnicowanie zwierząt szczepionych od zakażonych wirusem pryszczycy. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 20-23.
- Oirschot J. T. van: Diva vaccines that reduce virus transmission. *J. Biotechnol.* 1999, 73, 195-205.
- Oirschot J. T. van: Marker vaccines (deleted or not, criteria for the choice of deletion, associated diagnosis reagents), [w:] Pastoret P. P. et al. (Eds): *Veterinary Vaccinology*. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands 1997, s. 267.
- Oirschot J. T. van, Gielkens A. L. J., Moormann R. J. M., Berns A. J. M.: Marker vaccines, virus protein-specific assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* 1990, 123, 85-101.
- Oirschot J. T. van, Kaashoek M. J., Maris-Veldhuis M. A., Weerdmeester K., Rijsewijk F. A. M.: An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods* 1997, 67, 23-34.
- Oirschot J. T. van, Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A. M., Stegeman J. A.: The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J. Biotechnol.* 1996, 44, 75-81.
- Oirschot J. T. van, Rziha H. J., Moonen P. J. L. M., Pol J. M. A., van Zaane D.: Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J. Gen. Virol.* 1986, 67, 1179-1182.
- Oirschot J. T. van, de Waal C. A. H.: An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. First experience with its use in a vaccinated herd. *Vet. Rec.* 1987, 121, 305-306.
- Quint W. G. V., Gielkens A. L. J., Berns A. J. M., van Oirschot J. T., Cuypers H. T.: Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of „live” vaccines. *J. Gen. Virol.* 1987, 68, 523-534.
- Rijn P. A. van, Gennip H. G., Moormann R. J.: An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* 1999, 17, 433-440.
- Smedegaard Madsen E., Madsen K. G., Nielsen J., Holm Jensen M., Lei J. C., Have P.: Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS1 may distinguish between vaccinated and infected pigs. *Vet. Microbiol.* 1997, 54, 1-16.
- Stegeman J. A.: Pseudorabies virus eradication by area-wide vaccination is feasible. *Praca dokt.*, Utrecht University 1995.
- Suarez D. L.: Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals* 2005, 33, 221-226.
- Szweda W., Lipowski A., Bączek W., Dadun M., Platt-Samoraj A., Siemionek J., Ciecierski H., Procajlo Z.: Wyniki uwalniania ferm świń od wirusa choroby Aujeszky'ego po 5 latach stosowania programu „szczepienie-eliminacja”. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 386-391.
- Szweda W., Lipowski A., Bączek W., Platt-Samoraj A., Siemionek J., Ciecierski H., Procajlo Z.: Skuteczność programu „szczepienie-eliminacja” w utrzymywaniu statusu ferm świń wolnej od wirusa choroby Aujeszky'ego. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 447-451.
- Szweda W., Lipowski A., Pejsak Z.: Strategia uwalniania państw Unii Europejskiej, w tym Polski, od choroby Aujeszky'ego. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1156-1160.
- Truszczyński M., Pejsak Z.: Szczepionki nowej generacji. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 855-859.
- Tumpey T. M., Alvarez R., Swayne D. E., Suarez D. L.: Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 676-683.
- Wardley R. C., Post L. E.: The use of the gX deleted vaccine PRV<sub>ΔTKgX-1</sub> in the control of Aujeszky's disease, [w:] Oirschot J. T. van (Ed.): *Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, ECSC, EEC, EAEC. Brussels and Luxembourg 1989, s. 13.

Adres autora: prof. dr hab. Wojciech Szweda, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn; e-mail: szweda@uwm.edu.pl