

Porcine reproductive and respiratory syndrome – current information on the virus, immune response and laboratory diagnosis

Pejsak Z., Truszczyński M. • National Veterinary Research Institute, Puławy.

Here the results of studies on PRRSV conducted in last few years throughout the world and presented during the 18th Congress of International Pig Veterinary Society in Hamburg 2004, are discussed. Genetic diversity of the virus, the seroepidemiological patterns of PRRSV infections, humoral and cellular immune response and the availability of specific and sensitive diagnostic tests are major topics of this review.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome, immune response, diagnostics.

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań z ostatnich lat, ze szczególnym uwzględnieniem doniesień prezentowanych na 18. Kongresie Specjalistów Chorób Świń w 2004 r. w Hamburgu, dotyczących właściwości wirusa zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRS), humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej zakażonych świń oraz testów diagnostycznych.

Wirus PRRS

Czynnik etiologiczny PRRS jest wirusem RNA zaliczonym do rzędu *Nidovirales*, rodziny *Arteriviridae*, rodzaju *Arterivirus*. Pełna nazwa tego czynnika zakaźnego to: wirus zespołu rozrodczo-oddechowego świń – porcine reproductive-respiratory syndrome virus – PRRSV. Znane są dwa podstawowe podtypy wirusa: europejski (PRRSV-EU), występujący głównie na terenie Europy, chociaż sporadycznie też

Zespół rozrodczo-oddechowy świń – nowe dane na temat właściwości wirusa, odpowiedzi immunologicznej oraz diagnostyki laboratoryjnej*

Zygmunt Pejsak, Marian Truszczyński

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

na terenie innych kontynentów, oraz amerykański (PRRSV-US), stwierdzany w Ameryce Północnej i sporadycznie na terenie Europy. Inne gatunki zwierząt niż świnia nie są wrażliwe na zakażenie PRRSV.

Preferowanymi komórkami zasiedlania się wirusa PRRS są makrofagi pęcherzyków płucnych świń. Poznana została sekwencja jego genomu – długość RNA wynosi 15 kb i koduje 8 otwartych ramek odczytu (open reading frames – ORF). Zidentyfikowano 3 główne białka strukturalne wirusa: białko nukleokapsydu (N; ORF 7), białko błony (M; ORF 6) i glikoproteinę otoczki (E; ORF 5). Zmienność antygenowa między szczepami europejskimi a amerykańskimi w obrębie ORF-5 sięga 50%. Trzy dalsze glikoproteiny są kodowane przez ORF 4, 3 i 2. Przeciw wymienionym białkom przygotowano przeciwciała monoklonalne. Pokrewieństwo antygenowe między szczepami podtypu europejskiego jest bliższe niż w odniesieniu do szczepów podtypu amerykańskiego, co jest konsekwencją większego zróżnicowania genetycznego w tym drugim przypadku. Fakt, że genom wirusa PRRS zbudowany jest z pojedynczej nici RNA, determinuje jego znaczną zmienność genetyczną. W badaniach stosowano szereg metod z zakresu biologii molekularnej, zwłaszcza analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length polymorphism analysis – RFLPA). Okazało się, że zmienność w obrębie genomu dość często nie przekładała się proporcjonalnie na zmienność właściwości fenotypowych, w tym zwłaszcza antygenowych, badanych szczepów wirusa PRRS. Ta ostatnia była z reguły niższego stopnia niż wynikało to ze zmienności genetycznej. Rezultaty te potwierdziły badania Cha i Yoona (1).

Harder i wsp. (2) wskazali na możliwość odróżniania podtypów europejskiego i amerykańskiego za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej z odwróconą transkrypcją (reverse transcription polymerase chain reactions – RT-PCR), natomiast nie udało się, stosując wymienioną metodę, odróżnienie szczepów terenowych podtypu europejskiego od szczepów szczepionkowych tego podtypu.

Również z badań Pescha i Ohlingera (3) wynikało, że odróżnienie szczepów terenowych podtypu europejskiego od szczepu atenuowanego podtypu amerykańskiego, występującego w szczepionce Ingelvac PRRS MLV jest możliwe dzięki stosowaniu

* Zmieniona wersja artykułu zamieszczonego w miesięczniku „Trzoda chlewna”

par genotypowo specyficznych starterów w PCR. W przeciwieństwie do tego, z powodu dużego stopnia genetycznego pokrewieństwa atenuowanego wirusa szczepionki Porcilis PRRS (będącego podtypem europejskim) i terenowych szczepów wirusa PRRS typu europejskiego wymagało dodatkowych badań porównawczych ze zbiorem szczepów Lelystad podtypu europejskiego PRRSV.

Podobnego zagadnienia dotyczyły badania Vazqueza i wsp. (4), a zwłaszcza możliwości odróżniania przy użyciu RFLPA szczepów atenuowanych zawartych w szczepionkach przeciw PRRS od hiszpańskich izolatów terenowych tego wirusa. Zidentyfikowano przy użyciu tej metodyki 18 wzorców RFLPA. Jednak również w tym przypadku nie udało się odróżnienie szczepu szczepionkowego Porcilis PRRS od kilku wyosobnionych w Hiszpanii, z przypadków chorobowych, szczepów terenowych podtypu europejskiego.

Izolaty europejskie wirusa PRRS wykazują znaczną genetyczną różnorodność. Badaniami molekularnymi stwierdzono, że w większości krajów Europy zachodniej występują szczepy wirusa PRRS spokrewnione ze szczepem Lelystad. Natomiast w krajach Europy Centralnej, Wschodniej i Południowej (Włochy) izoluje się szczepy o znacznie większym niż w Europie zachodniej zróżnicowaniu genetycznym.

Humoralna i komórkowa odpowiedź immunologiczna

Przeciwciała neutralizujące wirus PRRS są przede wszystkim skierowane przeciw epitopom, które są zlokalizowane na białku otoczki, kodowanym przez ORF 5 (GP 5). Opisany został udział ektodomeny między wiodącą sekwencją GP5 (aa 1-31) i początkiem pierwszego transmembranowego białka (aa61) tych epitopów. Odpowiadający temu gen ORF5 przedstawia szczególną różnorodność genetyczną wśród europejskich izolatów wirusa PRRS, co wydaje się pogłębiać z upływem czasu (5).

Na tym tle celem innej, niż wcześniej cytowana, pracy Pescha i Ohlingera (3) było badanie wzorców reaktywności surowic ozdrowieńców w stosunku do różnych szczepów PRRSV-EU i ocena ewentualnej korelacji między antygenową reaktywnością a genetyczną różnorodnością przy użyciu danych sekwencji ektodomeny. W badaniach użyto testu neutralizacji, stosując linię komórkową Ma 104 i izolaty wirusa PRRS, zaadaptowane do tej linii komórkowej. Test seroneutralizacji z surowicami ozdrowieńców wykazał, że różnorodność wirusa PRRS jest nie tylko ograniczona do sekwencji nukleotydowych, ale również odnosi się do wzor-

ca antygenowego. Ponieważ ektodomena wydaje się tu istotnie eksponowana, można założyć, że jej wysokie genetyczne zróżnicowanie przekłada się na dużego stopnia różnorodność właściwości antygenowych. Dodatkowo, można się spodziewać, że rosnąca genetyczna różnorodność będzie oddziaływać na zwiększoną heterogenność w przyszłości. Fakt ten może wyjaśniać brak ścisłej korelacji między obecnością neutralizujących przeciwciał i obroną przed zakażeniem wirusem PRRS. Podsumowując, mechanizmy humoralne nie wydają się istotne w ochronie przed zakażeniem wirusem PRRS.

Natomiast odpowiedź komórkowa, jak wykazali Wesley i wsp. (6), połączona z wytwarzaniem interferonu jest szybka i możliwa do wykrycia już 5 dnia po zakażeniu oraz odgrywa, przeciwnie niż odpowiedź humoralna, istotną rolę w ochronie przed zakażeniem wirusem PRRS.

W nawiązaniu do tego Diaz i wsp. (7) wykazali, że 7 dni po zakażeniu świń wirusem PRRS pojawiają się swoiste dla niego komórki G-IFN (gamma-interferon), które wydzielają wirusobójczą cytokinę. Najwyższą ich liczbę wykazano 14 dnia po zakażeniu. Wytwarzana przez nie cytokina wykrywalna jest do 28 dnia po zakażeniu w badaniu testem immunoperoksydazowym. Uzyskane wyniki wskazują, że wzrost liczby specyficznych dla wirusa PRRS komórek sekrecyjnych G-IFN odpowiada zwiększonej liczbie limfocytów T CD8⁺.

Jullard i wsp. (8) badali odpowiedź komórkową po zakażeniu wirusem PRRS i/lub po szczepieniu szczepionką inaktywowaną Progressis PRRS. Z danych tych wynika, że dwa typy limfocytów T biorą udział w odporności przeciwzakaźnej, mianowicie CD4⁺ i CD8⁺.

W nawiązaniu do przedstawionych danych zjawiska odpornościowe obserwowane w zakażonym wirusem PRRS organizmie świń różnią się od występujących w następstwie zakażenia innymi wirusami. Dodać należy, że PRRSV może zakażać świnię wielokrotnie, bowiem w wyniku pierwotnego zakażenia osiedla się w płucach i w tkance limfatycznej, co przeciwdziała szybkiej stymulacji komórek T i B i z tym związanej odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Taki stan może trwać kilka miesięcy, kiedy istnieje możliwość kolejnych zakażeń PRRSV. Analizując to zjawisko cytowani autorzy wykazali, że wirus PRRS zakaża makrofagi i komórki dendrytyczne, koncentrując się sukcesywnie w regionach ich występowania. Przeciwciała neutralizujące pojawiają się po około 3 tygodniach, licząc od zakażenia, czyli później niż przeciwciała dla białka nukleokapsydu, lecz równocześnie z przeciwciałami dla glikoproteiny otoczki (envelope).

Ostre zakażenie PRRSV manifestuje się wiremią, która utrzymuje się przez 4–5 tygodni, a zakaźne wiriony wykrywane są w tkance limfoidalnej przez 3–4 miesiące. W tym okresie odpowiedź swoistych dla wirusa komórek T jest słaba i o zmiennym nasileniu, niezależnie od miejscowej ilości wirusa. W tej sytuacji świnię mogą być odporne albo wrażliwe na reinfekcję homologicznym lub heterologicznym szczepem PRRSV. Ponadto ani humoralna ani komórkowa odpowiedź immunologiczna nie łączy się w proporcjonalnym do ich nasilenia stopniu ze spadkiem ilości lub likwidacją tego wirusa w organizmie zakażonej świni. Nie ma zatem wystarczającej teoretycznej podstawy do udoskonalenia możliwości wywalania odporności przeciwzakaźnej. Niedostateczna jest też wiedza na temat czynnych immunologicznie białek wirusa, tym bardziej że dodatkowo mamy do czynienia z dużą genetyczną zmiennością wirusa PRRS.

Presente i wsp. (9) wskazali, że infekcja oraz reinfekcja homologicznym i heterologicznym szczepem wirusa PRRS zależą od stopnia pokrewieństwa antygenowego poszczególnych wirusów i stopnia odporności krzyżowej. Szczepy PRRSV różnią się też w zakresie zjadliwości, co dodatkowo ma wpływ na poziom przeciwzakaźnej odporności krzyżowej.

Z uprzednio cytowanych badań Presente i wsp. (9) wynika też, że nosiciele wirusa, np. wstawione w ramach remontu zakażone PRRSV pierwiastki, mogą być zagrożeniem dla stada znajdujących się w farmie uodpornionych macior, jeżeli się ją szczep różniący się od szczepu, który dotychczas w farmie występował. Ustalenie w zeskrobinach z jamy ustnej i gardła z jakim szczepem – homologicznym czy heterologicznym – mamy do czynienia, ma zatem istotne znaczenie w ocenie stanu odporności pogłowia.

W ramach tej tematyki znajdują się też badania Joo i wsp. (10). Autorzy oceniali odporność przeciwzakaźną, zakażając uodpornione maciory, w końcowym okresie ciąży, szczepem wysoce heterogennym w stosunku do wirusa szczepionkowego. Okazało się, że w sytuacji wcześniejszych, kilka lat powtarzanych szczepień i obecności przeciwciał neutralizujących wirus, po zakażeniu szczepem genetycznie heterologicznym (>15%) obserwowano u macior przenikanie wirusa PRRS przez łożysko i straty w rozrodzie. Jednak nie stwierdzono u nich wiremii lub była ona przejściowa, a izolacja wirusa od prosiąt nie udawała się. Zatem, mimo niejednoznacznego wyjaśnienia przyczyn strat, jako przypuszczalną przyczynę uznano wysoką genetyczną heterogenność wirusa użytego do zakażenia w stosunku do wirusa szczepionkowego.

Wiele opublikowanych badań sugeruje, że zjadliwy wirus PRRS może negatywnie modulować układ odpornościowy zakażonej świni ponieważ może on w istotnym stopniu wpływać na ekspresję genu IL-10, obniżając wytwarzanie interleukin, a tym samym efektywność mechanizmów odpornościowych. Wykazano, że podobne działanie immunosupresyjne wykazuje wirus zmodyfikowany, używany do produkcji żywej szczepionki przeciw PRRS. Szczepienie tego rodzaju szczepionką może mieć negatywny wpływ na skuteczność innych szczepionek, przede wszystkim szczepionki przeciwko mykoplazmowemu zapaleniu płuc. Poglądy te potwierdziły wyniki uzyskane przez Suradhata i Thanawongnuwecha (11), chociaż cytowani autorzy uważają, że konieczne są dalsze badania dla postawienia bardziej jednoznacznych wniosków.

Jak wynika z przedstawionych danych, dokonał się w ostatnich latach znaczny postęp w dziedzinie poznania mechanizmów immunologicznych, wyzwalanych zakażeniem wirusem PRRS. Miało to miejsce przede wszystkim dzięki zastosowaniu metod z zakresu biologii molekularnej, umożliwiających śledzenie zmienności w obrębie genomu wirusa i w jego ekspresji fenotypowej. Na tym tle uzasadnione jest stwierdzenie, że zjawiska towarzyszące odpowiedzi humoralnej i komórkowej przebiegają w znacznym stopniu różnie niż po zakażeniu świń innymi wirusami. Dodatkowo pozostaje do wyjaśnienia szereg zagadnień, co uzasadnia kontynuowanie prac w tej dziedzinie w celu zwiększenia skuteczności szczepionek i udoskonalania programów zwalczania PRRS.

Diagnostyka PRRS

Identyfikacja wirusa PRRS jest trudna. Może być wyosobniony z krwi, innych płynów ustrojowych lub próbek pobranych z płuc, migdałków, węzłów chłonnych i wątroby. Do izolacji zaleca się makrofagi pęcherzyków płucnych oraz linię komórkową MARC-145, czyli klon MA-104. Ze względu na różnice we wrażliwości poszczególnych linii makrofagów pęcherzyków płucnych należy wybrać do badań diagnostycznych serie szczególnie wrażliwe i zabezpieczyć je w ciekłym azocie do kolejnych badań diagnostycznych. Do identyfikacji wirusa służą też metody immunohistochemiczne, hybrydyzacja *in situ* na skrawkach tkanek utrwalonych i RT-PCR (Podręcznik Testów Diagnostycznych i Szczepionek dla Zwierząt Lądowych, OIE, 2004).

W badaniach serologicznych identyfikujących przeciwciała swoiste zastosowanie znajdują testy, w których jako antygeny używa się zakażonych wirusem PRRS makrofagów pęcherzyków płucnych. Są nimi immunoperoxydazowy test w hodowlach

jednowarstwowych (immunoperoxidase monolayer assay – IPMA), odczyn immunofluorescencji pośredniej (indirect immunofluorescence assay – IFA) i odczyn immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) jako pośredni (indirect) i blokujący (blocking). Wymienione metody są tak zwanymi testami stadnymi. Oznacza to, że przy ich pomocy określa się rozpoznanie PRRS po badaniu wszystkich lub znacznego odsetka osobników w stadzie, a nie jednego zwierzęcia. Najszerze zastosowanie w określaniu przeciwciał swoistych dla PRRS i monitorowaniu zakażenia znalazł test ELISA. Odpowiednie jego zestawu diagnostyczne tak z podtypem europejskim jak też amerykańskim jako antygenem są dostępne w handlu a techniki ich wykonania zostały przedstawione w Podręczniku Testów Diagnostycznych i Szczepionek dla Zwierząt Lądowych, OIE, 2004. W podręczniku tym do diagnostyki PRRS zalecane są również testy: IFA i IPMA.

Do wykrywania i określania przeciwciał neutralizujących wirus PRRS, pojawiających się w późniejszym okresie po zakażeniu niż przeciwciała wykrywane testem ELISA, zastosowanie znajduje odczyn seroneutralizacji, w którym używa się jednowarstwowej hodowli zakażonych wirusem PRRS makrofagów.

Ocena wartości diagnostycznej testów serologicznych identyfikujących swoiste dla wirusa PRRS przeciwciała łączy się z wiedzą na temat znaczenia, w tym kontekście, różnej zjadliwości i patogenności szczepów zakażających oraz roli poszczególnych antygenów wirusa w wyzwalaniu produkcji przeciwciał. Jak wynika z badań Murtaugh'a i wsp. (12) bardziej wyraźna odpowiedź, wyrażająca się pojawieniem się swoistych przeciwciał, ma miejsce w przypadku szczepów o dużej wirulencji, rzadziej natomiast w odniesieniu do szczepów mniej zjadliwych. W takim przypadku przeciwciała pojawiały się zazwyczaj 21 dnia po zakażeniu i osiągały szczyt 28 dni po zakażeniu. Zgodnie z cytowanymi autorami, miano przeciwciał swoistych dla białka N otoczki wirusa obniżał się wyraźnie po 28 dniach, podczas gdy w odniesieniu do innych białek utrzymywał się dłużej. Poziom przeciwciał przeciwko niestrukturalnym białkom wirusowym nsp1 (non structural protein) i nsp2 był równy lub wyższy w porównaniu z poziomem przeciwciał na białko N. Odpowiedź na białko nsp4, kodujące kluczową proteazę, był niski. W przedstawionych badaniach nie wykazano korelacji między poziomem przeciwciał humoralnych na poszczególne antygeny wirusa a poziomem odporności przeciwwakażnej.

Z danych de Wita i wsp. (13) wynika, że skuteczność wykrywania zakażenia przez poszczególne testy diagnostyczne zależy

od: 1) zastosowanej techniki; 2) użytego antygeny; 3) rodzaju wykrywanych przeciwciał i 4) stadium zakażenia. Również zgodnie z danymi cytowanych autorów, żaden z dostępnych testów nie wykrywa przeciwciał przeciw wszystkim szczepom wirusa PRRS oraz szerzej, nie posiada wystarczającej czułości i swoistości koniecznej w diagnostyce w odniesieniu do jednego (indywidualnego) zwierzęcia. Są one zatem testami stadnymi, których wyniki są miarodajne przy badaniu wszystkich osobników w stadzie lub ich znacznego odsetka. W omawianym zakresie testy ELISA na tle innych dają najbardziej miarodajne wyniki. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że 75% zwierząt spośród grupy reagującej po zakażeniu pozytywnie, w teście ELISA okazała się ujemna cztery miesiące po zakażeniu (14). Przeciwnie do ELISA, test seroneutralizacji wykrywał przeciwciała później, licząc od momentu zakażenia, ale przez znacznie dłuższy okres u wszystkich zakażonych osobników.

Większość metod serologicznych służących do identyfikacji przeciwciał swoistych dla wirusa PRRS dotyczy przeciwciał klasy IgG. Jednak wyniki w ten sposób uzyskane są trudne do interpretacji w kategoriach czasu zakażenia, reinfekcji i obecności przeciwciał matczyńskich. Mając to na uwadze, Mieli i wsp. (15) opracowali test służący do identyfikowania przeciwciał klasy IgM, o nazwie IgM IPMA. Antygenem były makrofagi pęcherzyków płucnych od prosiąt SPE, zakażonych typem europejskim wirusa PRRS. Do identyfikacji IgM stosowano mysie przeciwciała monoklonalne. Okazało się, że test IgM IPMA umożliwia różnicowanie między niedawną infekcją/reinfekcją i ustabilizowanym zakażeniem w stadzie świń. Jest też przydatny w odróżnianiu przeciwciał biernych, których źródłem jest siara od przeciwciał powstałych pod wpływem wirusa u prosiąt po odsadzeniu do 10 tygodnia życia. Przedstawione dane stanowią swego rodzaju rewelację, chociaż wydaje się, że wymagają potwierdzenia.

W podsumowaniu można stwierdzić, że mimo badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na świecie wiedza na temat właściwości biologicznych PRRSV i odpowiedzi immunologicznej jest niepełna, co w istotnym stopniu utrudnia opracowanie metod laboratoryjnego rozpoznawania i w pełni skutecznych metod immunoprofilaktyki.

Piśmiennictwo

1. Cha S.H., Yoon K.-J.: Instability of RFLP pattern of PRRSV during pig-to-pig passages. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburg 2004, s. 26.
2. Harder T.C., Beilage E., Pabst T., Hubert P.H.: Porcine respiratory and reproductive syndrome virus- detection and

- differentiation of vaccine like viruses of European (strain DV) and American genotypes in field samples. . *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 74.
3. Pesch S., Ohlinger V.F.: New insights in antigenic variants in European PPRS viruses. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 23.
 4. Vazquez A., Prieto C., Alvarez E., Castro J.M., Fernandez-Garcia A.: Differentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) virus European vaccines from Spanish field isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of ORF5. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 109.
 5. Stankevicius A., Stadejek T., Pejsak Z.: Circulation of two genotypes of PPRSV within swine herd in Lithuania. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 41.
 6. Wessley R.D., Lager K.M., Kehrli M.E.: PPRSV infection stimulates an immediate serum interferon – gamma response. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 90.
 7. Diaz I., Pappaterra G., Dominguez J., Marca J., Pujols J., Mateu E.: Evolution of immunological parameters in experimental infection with an European – type PPRS virus. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 126.
 8. Juillard V., Pitas F., Andreoni C., Charreyre C., Joisel F.: PPRSV-specific persistent T_H1 cell response in pigs following PPRSV infection and/or vaccination with an inactivated PPRS vaccine. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 137.
 9. Pesente P.; Sandri G.P., Giovanardi D., Sperati Ruffoni I., Campagnari E.: Infection and reinfection with homologous heterologous porcine reproductive and respiratory virus (PPRSV) strains: practical aspects. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 24.
 10. Joo H., Titus M., Roggow B.: Challenge exposure a heterogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) virus in immune pregnant sows. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 25.
 11. Suradhat S., Thanawongnuwech R.: Effect of reproductive and respiratory syndrome virus (PPRSV), vaccine strains on the level of porcine Il-10 gene expression. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 147.
 12. Murtaugh M.P., Johnson C.R., Xiao Z., Funes M., Yu W., Johnson W., Roof M.: Comparative antibody response to virulent and attenuated strains of PPRS virus. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 22.
 13. De Witt J.J., Cia C., Bolink G.J., van Maanen C., de Jong M.F., Donadeu M.: Comparison of 4 ELISAs for detection of antibodies against PPRSV in pig herds with different situations of PPRSV infection. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 34.
 14. McCav M., Murtaugh M., Laster S., Roberts J., Erickson E.: PPRSV rORF specific ELISA antibody responses following repeated homologous wild-type virus challenges. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 36.
 15. Mieli L., Baudouard M., Lebon E., Joisel F.: Qualification an evaluation of a new PPRSV IgM IPMA test. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg 2004*, s. 127.