

TADEUSZ M. KARPINSKI
Puławy

Wybrane zagadnienia odpowiedzi immunologicznej w przebiegu brucelozy u bydła

Wieloletnie działania służby weterynaryjnej naszego kraju, mające na celu zwalczanie brucelozy bydła i innych gatunków zwierząt gospodarskich sprawiły, że w końcu 1980 r. uznano Polskę za kraj wolny od tej choroby. Fakt ten nie zwalnia służby weterynaryjnej od ciągłej czułości. Konieczne jest również dalsze doskonalenie postępowania w zakresie rozpoznawania brucelozy, zwłaszcza u pojedynczych zwierząt. Liczyć się bowiem należy z występowaniem zarówno sporadycznych przypadków brucelozy, które należy szybko zdiagnozować, jak i narastaniem problemu nieswoistych odczynów wikłających rozpoznawanie, których źródłem są zakażenia drobnoustrojami antygenowo zbliżonymi do pałeczek *Brucella*. Koniecznością więc jest stałe usprawnianie serodiagnostyki brucelozy z ukierunkowaniem tych działań na zwiększenie stopnia swoistości i czułości metod serologicznych przy dążeniu do zmniejszania pracochłonności i uproszczenia metodyki. Wiadomo, że dalszy postęp w tej dziedzinie następować może tylko w przypadku coraz to głębszego poznawania mechanizmów immunologicznej odpowiedzi organizmu zwierzęcia.

Niniejsze opracowanie stanowi próbę syntezy aktualnych dokonań badawczych w zakresie poznawania mechanizmów immunologicznej odpowiedzi u bydła, co być może pozwoli na lepsze zrozumienie wymogów stawianych w przyszłości metodom rozpoznawania i zwalczania brucelozy u bydła.

Immunologiczna odpowiedź humoralna

Głównymi czynnikami odgrywającymi istotną rolę w mechanizmach odporności humoralnej u ssaków są przeciwciała. Stanowią one różne pod względem fizykochemicznym białka immunoglobulinowe, które są obecne w surowicy i wydzielinach i są produkowane przez wyspecjalizowane komórki limfoidalne (66). Mechanizmy humoralnej odpowiedzi u bydła są na ogół zbliżone do wcześniej już zbadanych mechanizmów zachodzących u innych gatunków ssaków (11, 12). Także większość immunoglobulin obecnych w surowicy posiada charakterystykę fizyko-chemiczną zbliżoną do immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA) oraz immunoglobulin M (IgM) występujących u ludzi (10, 43, 46). Na podstawie różnic w ruchliwości elektroforetycznej wyróżniono obecnie w obrębie klasy IgG dwie podklasy IgG₁ i IgG₂ (2, 3, 19, 48). Ujawnienie za

pomocą prób serologicznych różnych klas przeciwciał *anti-Brucella abortus* umożliwia bądź ocenę stanu odporności humoralnej (21, 26, 31, 39), bądź zdolności ochronnej (poszczepiennej). Stąd też testy serologiczne są obecnie uznawane za podstawę wszelkich programów zwalczania brucelozy u bydła i innych zwierząt (14, 49). Jakkolwiek odczyn aglutynacji (OA), jak i odczyn wiązania dopełniacza (OWD), tradycyjnie są używane od początku XX wieku w seriodiagnostyce brucelozy, to jednak w ostatnich latach dokonał się znaczny postęp w udoskonalaniu metod serodiagnostyki, zmierzających do ujawniania zwierząt zakażonych, a także do różnicowania mierników humoralnej odpowiedzi u zwierząt szczepionych oraz uutojonych nosicieli choroby.

Aktualnie panuje powszechny pogląd, że wytworzone u bydła przeciwciała w wyniku pierwotnej odpowiedzi immunologicznej występują w znacznej większości w klasie IgM, zaś wtórna odpowiedź charakteryzuje się w znacznej mierze produkcją przeciwciał w klasie IgG (27, 73).

Rose i Roepke (67, 68) oraz Rice i wsp. (62) stwierdzili, że pierwszymi przeciwciałami ujawnionymi u bydła szczepionego były aglutyniny, których maksymalny poziom występował już w 13 dni po szczepieniu. Przeciwciała te notowano wśród immunoglobulin klasy IgM i były one dominującym typem przeciwciał w ciągu 91 dni obserwacji. Tylko pomiędzy 28—42 dniem po szczepieniu zanotowano niskie miana przeciwciał w klasie IgG. Natomiast u zwierząt szczepionych, a następnie doświadczalnie zakażonych drogą dośpojkową zjadliwym szczepem *Br. abortus*, miana przeciwciał klasy IgG znacznie przewyższały miana przeciwciał klasy IgM w okresie pomiędzy 25 a 45 dniem po zakażeniu i utrzymywały się na niezmiennym poziomie do 63, a w niektórych przypadkach nawet do 83 dnia obserwacji.

Dalsze badania jakościowe i ilościowe nad występowaniem różnych klas przeciwciał u zwierząt szczepionych oraz zakażonych *Br. abortus* pozwoliły na dokonanie pewnych uogólnień. Wniosek pierwszy dotyczy stwierdzenia, że poziom przeciwciał klasy IgM narasta po szczepieniu gwałtownie w ciągu 11—16 dni. W tym czasie około 30—40% całości immunoglobulin klasy IgM są to przeciwciała *anti-Brucella* (7). Wniosek drugi to znacznie wolniejsze narastanie poziomu immunoglobulin IgG₁, których szczyt występuje zazwyczaj w 32 dni po szczepieniu, a przeciwciała *anti-Bru-*

cella osiągają koncentrację 20—30% immunoglobulin tej podklasy. U zwierząt dorosłych dynamika ta jest bardziej zróżnicowana. Mniejsze też wartości stwierdza się wśród przeciwciał w obrębie immunoglobulin klasy IgG₂.

U zwierząt zakażonych w warunkach naturalnych, Allan i wsp. (1), Diaz i Levieux (20), Beh (5) oraz Patterson i wsp. (57) stwierdzili natomiast, że przeciwciała *anty-Brucella* w zależności od przynależności do poszczególnych klas immunoglobulin mogą różnie reagować w trzech, głównie dotychczas stosowanych próbach serologicznych, tj. w odczynie aglutynacji (OA), odczynie wiązania dopełniacza (OWD) oraz Rose-Bengal Teście (RBT). Dzięki tym i wielu innym wynikom badań obecnie przyjmuje się, że przeciwciała wiążące dopełniacz są związane z IgG₁ oraz IgM. Przeciwciała klasy IgM są bardziej aktywne w OWD, niż IgG₁, jednakże, jak wiadomo, są one ciepłochwienne i jako takie ulegają w znacznej części inaktywacji w trakcie ogrzewania stanowiącego nieodłączny etap przygotowania surowic zwierząt do badania w OWD, mającego za cel unieczynnienie dopełniacza zawartego w badanej próbce surowicy.

Z osiągnięć naukowych na tym polu należy również wskazać na opracowanie metody różnicowania mian przeciwciał poszczepiennych od przeciwciał powstałych jako skutek zakażenia naturalnego. Wprawdzie w naszym kraju metoda szczepień jako jedna z metod zwalczania i zapobiegania brucelozie wśród zwierząt nie jest stosowana, to jednak warto, jak się wydaje, przytoczyć poniższe wyniki badań.

Otóż w ostatnich latach w wielu krajach wdrożono do praktyki szczepionkę zabitą sporządzoną na szorstkim, nieaglutynogennym szczepie *Brucella abortus* 45/20. Użycie tej szczepionki u bydła cechuje wytworzenie niewielkiej ilości aglutynin, a także przeciwciał wiążących dopełniacz (65). Diaz i Jones (22), a także inni autorzy (6, 7) wykazali, że w surowicy bydła szczepionego tym preparatem występują przede wszystkim precypityny przeciw powierzchniowym antygenom szorstkich form *Br. abortus*, które mogą utrzymywać się w surowicy do 6 miesięcy po szczepieniu. Badania nad klasową swoistością przeciwciał poszczepiennych doprowadziły do opracowania zasad różnicowania wyników prób serologicznych u bydła zakażonego od wyników spotykanych u bydła szczepionego 45/20. Zasady te opierają się na kontroli poziomu przeciwciał niekompletnych, po podaniu tzw. dawki anamnestycznej szczepionki, za pomocą odczynu antyglobulinowego (19), oraz alternatywnie na badaniu surowic w OWD z antygenem sporządzonym z szorstkiego szczepu *Br. abortus*. Istnieją pewne ograniczenia tego systemu diagnostyki zwłaszcza u zwierząt szczepionych uprzednio szczepionką *Br. abortus* S-19, gdyż przeciwciała poszczepienne po szczepionce 45/20

nakładają się w tym przypadku na przetrwała odporność w wyniku szczepienia S-19 (47).

Bierna odporność humoralna

Badania Feya (cyt. wg 2) oraz Logana (37) dostarczyły dowodów na to, że nowo narodzone cielęta w pierwszych godzinach życia są pozbawione prawie całkowicie białek globulinowych, co spowodowane jest między innymi tym, że łożysko typu kosmówkowo-owodniowego nie przepuszcza w ogóle, lub wymiana w życiu płodowym matczynej immunoglobulin jest minimalna. Białka immunoglobulinowe są więc przekazywane drogą siary i następnie wchłaniane w jelitach cienkich noworodka (42). McDiarmid (38) wykazał, że surowica cieląt noworodków pochodzących od matek dotkniętych brucelozą bydła jest pozbawiona jakichkolwiek przeciwciał i dopiero ich obecność, niekiedy w wysokich mianach, stwierdzano po podaniu im siary. Z kolei Peiris (58) oraz Morgan (49) wykazali u cieląt pojonych siarą wprost proporcjonalną zależność między wysokością miana przeciwciał potomstwa a wysokością miana tych przeciwciał u chorych matek; przeciwciała te reagowały w OWD i RBT i niekiedy miały zdolność przetrwania w surowicy do 5—6 miesięcy. Jedynie aglutyniny kompletne występowały u tych cieląt przez okres 2 miesięcy.

Zjawisko biernego przekazywania przeciwciał matczynej może interferować z mechanizmami czynnej odporności uruchomionej na skutek dodatkowej immunizacji niektórymi antygenami bakteryjnymi (63, 69, 72). Hoerlein (28) wykazał między innymi, że podanie z siarą przeciwciał matczynej przytłumiło u noworodków produkcję przeciwciał *anty-Brucella*. Cunningham (18) potwierdził te obserwacje, wykazując, że cielęta bezsiarowe są zdolne do czynnej odpowiedzi na podaną szczepionkę S-19 już w pierwszym dniu po urodzeniu. Ostatnio ten sam autor (19) badał ochronny efekt matczynej przeciwciał przekazywanych drogą siary u cieląt eksponowanych na zakażenie masywną liczbą pałeczek *Brucella abortus* i stwierdził, że 85% doświadczalnych cieląt mimo to nie uległo zakażeniu po wcześniejszym podaniu siary.

Należy jednak zaznaczyć, że obecnie przeważa pogląd, iż u cieląt biernie przekazywanie odporności nie nosi cech podobieństwa do podobnych mechanizmów zachodzących u bydła dorosłego. Dotychczas bowiem nie wykazano, by biernie przeniesienie surowicy zwierząt immunizowanych *Br. abortus* mogło mieć ochronny wpływ na organizm biorcy, w tym przypadku — bydła nie szczepionego (cyt. za 23, 25, 29, 70). Istnieją pewne nie potwierdzone jeszcze dane (4, 55, 56), wskazujące na związek tempa rozprzestrzeniania się zakażenia w

organizmie dorosłego osobnika z czynnikami humoralnymi typu immunoglobulin. Wydaje się również prawdopodobne współdziałanie tych czynników z mechanizmami obrony komórkowej w procesie mobilizacji odporności żywiciela.

Immunologiczna odpowiedź komórkowa

Jedną z głównych cech charakteryzujących pałeczki z rodzaju *Brucella* jako fakultatywnych pasożytów śródkomórkowych jest zdolność tych drobnoustrojów do namnażania się w dojrziałych fagocytach żywiciela, co niejako stwarza warunki do niewrażliwości ich na hamujący wpływ humoralnych przeciwciał (9, 16, 30, 71, 74). Jednakowoż niektóre czynniki obrony komórkowej, takiej jak np. czynnik stymulacji makrofagowej (MSF — macrophag stimulating factor) oraz inhibitor rozwoju *Brucella* (BIF — Brucella inhibiting factor) wydają się odgrywać istotną rolę w pożeraniu pałeczek i obniżaniu tempa ich namnażania śródkomórkowego (60, 61). Z powyższych danych wynika również ogólny pogląd, że mechanizmy humoralnej obrony żywiciela nie zapewniają mu właściwego poziomu odporności w przypadku zakażenia zjadliwymi pałeczkami *Brucella* (8, 44).

Znacznie bardziej efektywne w niszczeniu tych bakterii są mechanizmy odporności komórkowej, antygenowo swoistej odpowiedzi organizmu kierowanej niejako zdalnie przez grasiczo-zależne limfocyty T. Wydzielają one całą gamę zróżnicowanych czynników zwanych ogólnie limfokinami (45). Limfocyty T, co wykazano już wielokrotnie w eksperymentach *in vitro* (16, 25, 29, 41), odgrywają ważną rolę w aktywacji właściwości bakteriostatycznych nabywanych przez otrzewnowe makrofagi na śródkomórkowe zakażenie. Zachodzące *in vivo* procesy aktywacji makrofagów przez immunokompetentne limfocyty T wydają się mieć związek z hamowaniem, a niekiedy blokowaniem mechanizmu odpowiedzi immunologicznej, co może być przyczyną rozwoju chronicznego typu choroby zakaźnej (13).

Do oceny stanu odporności komórkowej u zakażonych zwierząt najszersze zastosowanie mają obecnie takie próby, jak: test stymulacji limfocytów oraz test zahamowania migracji makrofagów. Na szerokim materiale przy użyciu naturalnie zakażonego bydła wykazano, że test stymulacji limfocytów, będący próbą swoistą dla oceny ogólnej funkcji limfocytów T, pozwala ujawniać zwierzęta zakażone *Brucella abortus* równie dokładnie jak próby bakteriologiczne i serologiczne (32). Wykazano również przydatność tego testu do różnicowania zwierząt szczepionych S-19 od zwierząt zakażonych oraz wolnych od brucelozy (36).

Natomiast próby wykorzystywania do ce-

łów diagnostycznych innych mechanizmów odporności komórkowej jak np. nadwrażliwości typu późnego, stosując metodę alergiczną, pozwoliły stwierdzić pewną ograniczoną wartość rozpoznawczą w diagnostyce naturalnych zakażeń pałeczkami *Brucella*. Wydaje się, że najbliższe lata rozstrzygną kwestię przydatności tej ostatniej metody do badań w dużych stadach zwierząt hodowlanych. Otwartym pozostaje również do chwili obecnej problem korelacji wskaźników odpowiedzi komórkowej i faktycznej osobniczej odporności na zakażenie *Brucella*. Sugerowane w tym zakresie rozwiązania mogłyby, zdaniem ich autorów, w istotny sposób przyczynić się do usprawnienia metod rozpoznawania i zwalczania brucelozy w stadach bydła.

Reasumując należy zauważyć, że obecnie generalnie został zaakceptowany pogląd co do ważnej roli mechanizmów obrony komórkowej w odporności przeciwzakaźnej w przebiegu brucelozy u bydła. Bezpośrednio po wniknięciu zjadliwego zarazka następuje znaczne mnożenie makrofagów, a także produkcja przeciwciał przez komórki plazmatyczne. Jest zupełnie prawdopodobne, że stymulacja komórkowej odpowiedzi następuje równocześnie i niezależnie od produkcji przeciwciał.

Problem utajonego nosicielstwa

W programach zwalczania brucelozy wielu krajów, również i w Polsce, oddzielne miejsce zajmuje zagadnienie postępowania w przypadkach występowania utajonego nosicielstwa. W stadach, w których w przeszłości nie notowano brucelozy, dotyczy wystąpienia przypadków brucelozy u pierwiastek serologicznie ujemnych i objawia się najczęściej ronieniem w ostatnim trymestrze ciąży (14, 15, 69). Stada, w których występują takie przypadki, przyjęło się określać jako stada tzw. „problemowe” (52, 53), zaś zwierzęta, u których stwierdza się nosicielstwo, jako „bezobjawowych nosicieli” lub „chroników” (51, 64). Badania nad patogenizacją latentnego nosicielstwa, wykonane w ostatnich latach, dostarczyły wielu danych, które pozwalają określić czynniki mające wpływ na wytworzenie się takiego stanu (24, 50, 54, 64). Okazuje się bowiem, że zakażenie cieląt następuje bądź przed urodzeniem, w łonie matki, bądź w chwili urodzenia (50). Miana przeciwciał pobranych z matczyną siarą utrzymują się przez okres 4—6 tygodni po czym zanikają (42, 58). Inne mechanizmy obrony komórkowej i humoralnej, co już wcześniej podano, powodują zahamowanie namnażania się pałeczek *Brucella* w makrofagach i to zjawisko jest prawdopodobną przyczyną „uśpienia” zakażenia. W tym stanie jałówki — aż do czasu uzyskania dojrzałości płciowej — pozostają serologicznie ujemne. Dopiero zapłodnienie i pierwsza ciąża przyczyniają się do ujawnienia

zakazania, co najczęściej objawia się ronieniem (54). Hipoteza ta, wprowadziona w oparciu o wyniki badań terenowych, doczekała się w ostatnich latach potwierdzenia swej słuszności w drodze eksperymentów naukowych. Plomet i wsp. (59) badania swe wykonali na 22 jałówkach urodzonych z matek sztucznie zakażonych *Brucella abortus*. Wszystkie jałówki były serologicznie ujemne do 1 roku. Wychowywano je w całkowitej izolacji, przy czym po urodzeniu pozbawiono je siary ich matek. Po uzyskaniu dojrzałości piciowej podawano je sztucznej inseminacji, po czym w 6 tygodni po porodzie lub poronieniu badano jałówki, ich potomstwo oraz ewentualnie poronione płody. Okazało się, że spośród 22 jałówek 4 były bakteriologicznie dodatnie. Z ich płodów wyizolowano *Br. abortus*. Należy zaznaczyć, że wszystkie jałówki w okresie ciąży były również serologicznie ujemne, aż do 8 tygodnia przed terminem porodu.

Zjawisko latentnego nosicielstwa brucelozy u jałówek następuje dodatkowo kłopoty w zwalczaniu brucelozy. W praktyce bowiem u takich osobników zdarzać się mogą przypadki nadkażenia zjadliwym szczepem terenowym. Wówczas interpretacja wyników badań serologicznych oraz ich różnicowanie natrafiają na znaczne trudności. Cunningham (19), jak i Reich i Harvey (24) zaproponowali rozwiązanie tego zagadnienia poprzez stosowanie szczepionki Duphvac 45/20 do wywołania tzw. anamnestycznej odpowiedzi u latentnych nosicieli. U tych zwierząt miano przeciwciał niekompletnych stwierdzanych odczynem antyglobulinowym (OAG) po podaniu dawki szczepionki gwałtownie narasta, co stanowi sygnał o wystąpieniu brucelozy w tym stadzie. Obecnie jednakże niemożliwe jest różnicowanie mian poszczepiennych S-19 od mian po zakażeniu *Br. abortus* lub mian stwierdzanych u latentnych nosicieli brucelozy.

Dokonany przegląd piśmiennictwa na temat wybranych problemów immunologii brucelozy pozwala stwierdzić, że ujawnianie pojedynczych zwierząt dotkniętych brucelozą może nadal natrafiać na znaczne trudności. Przybliżając opinie i aktualne poglądy można mieć nadzieję, że okażą się one pomocne w podejmowaniu środków zaradczych w zwalczaniu i zapobieganiu nawrotom brucelozy bydła w naszym kraju.

Piśmiennictwo

1. Allan G. S., Chappel R. J., Williamson P., McNaught D. J.: J. Hyg. Camb. 76, 287, 1976.
2. Alton G. G., Jones L. M., Pietz D. E.: WHO Monogr. Ser. No. 55, 1975.
3. Alton G. G., Maw J., Rogerson B. A., McPherson G. G.: Aust. vet. J. 51, 57, 1975.
4. Bascoul S., Cannat A., Huguet M. F., Serre A.: Immunology 35, 213, 1978.
5. Beh K. J.: Res. vet. Sci. 14, 381, 1973.
6. Beh K. J.: Aust. vet. J., 51, 481, 1975.
7. Beh K. J.: Res. vet. Sci., 14, 239, 1973.
8. Blander R. V., Mackaness G. B., Collins F. M.: J. exp. Med. 124, 585, 1966.
9. Braude A. I.: J. inf. Dis. 89, 76, 1951.
10. Butler J. E.: J. Dairy Sci., 52, 1885, 1969.

11. Butler J. E., Maxwell C. F.: J. Dairy Sci. 55, 151, 1971.
12. Butler J. E., Winter A. J., Wagner G. G.: J. Dairy Sci. 54, 1309, 1963.
13. Cheers C., Pagram F.: Infect. Immun. 23, 197, 1979.
14. Christie T. E.: Vet. Rec. 80, 268, 1969.
15. Christie T. E., Kerr W. R., McCaughey W. J.: Vet. Rec. 82, 176, 1968.
16. Collins F. M.: Bact. Rev. 38, 371, 1974.
17. Corbet M. J.: Devs. Biol. Standard. 31, 141, 1976.
18. Cunningham B.: Vet. Rec. 100, 525, 1976.
19. Cunningham B., O'Connor M.: Vet. Rec. 89, 680, 1971.
20. Diaz R., Levieux D.: C.R. Acad. Sci. 274D, 1592, 1972.
21. Edwards S. J., De Ropp R. S., McLeod D. H.: Vet. Rec. 57, 259, 1945.
22. Edwards S. J., McDiarmid A., De Ropp R. S., McLeod D. H.: Vet. Rec. 58, 141, 1946.
23. Elberg S. S., Schneider P., Fong J.: J. exp. Med. 106, 545, 1957.
24. Fitch C. P., Boyd W. L., Kelly M. D., Bishop L. M.: J. Am. vet. med. Ass. 99, 413, 1941.
25. Fitzgeorge R. B., Solotorovsky M., Smith H.: Br. J. exp. Path. 48, 522, 1967.
26. Gordon W. S.: Proc. 15th int. vet. Congr., Stockholm 1953, vol. II, s. 177, 1953.
27. Herbert W. J.: Veterinary immunology. Blackwell, Oxford s. 42, 1970.
28. Hoerlein A. B.: J. Immun. 78, 112, 1957.
29. Holland J. J., Pickett M. J.: J. exp. Med. 108, 343, 1958.
30. Jenkin C. R., Rowley D.: Bact. Rev. 27, 391, 1963.
31. Jenness R., Anderson R. K., Gough P. M.: Fedn. Proc. 24, 503, 1965.
32. Jones F. S., Orcutt M.: J. Immun. 27, 215, 1974.
33. Jones L. M.: Annis Rech. vet. 5, 189, 1974.
34. Jones L. T., Berman D. T.: J. Infect. Dis. 124, 47, 1971.
35. Jones L. M., Berman D. T.: Infect. Immun. 111, 360, 1975.
36. Kiesius P. H., Kramer T. T., Swann A. L., Christenberry C. C.: Am. J. vet. Res. 39, 883, 1978.
37. Logan E. F.: Br. vet. J. 130, 405, 1974.
38. McDiarmid A.: Vet. Rec. 58, 146, 1946.
39. McEwen A. D., Priestley F. W., Patterson J. D.: J. comp. Path. 52, 116, 1939.
40. McEwen A. D.: Vet. Rec. 62, 83, 1950.
41. McGregor D. D., Hahn H. H., Mackaness G. B.: Cell. Immun. 6, 186, 1973.
42. McGirr J. L.: Vet. J. 103, 345, 1947.
43. Mach J. P., Pahud J. J.: J. Immun. 106, 552, 1971.
44. Mackaness G. B.: J. exp. Med. 120, 105, 1964.
45. Mackaness G. B.: J. infect. Dis. 123, 439, 1971.
46. Mehta P. D., Tomasi T. B.: Fedn. Proc. 28, 820, 1969.
47. Miller J. K., Kelly J. I., Roerink J. H. G.: Vet. Rec. 98, 210, 1976.
48. Milstein C. P., Feinstein A.: Biochem. J. 107, 559, 1968.
49. Morgan W. J. B.: Proc. R. Soc. Med. 62, 1059, 1969.
50. Morgan W. J. B.: Irish vet. J. 25, 214, 1971.
51. Morgan W. J. B., Mackinnon D. J., Lawson J. R., Cullen G. A.: Vet. Rec. 85, 636, 1969.
52. Nelson C. J., Anderson R. K., Kimberling C. V., Pietz D. E.: Am. J. vet. Res. 27, 1515, 1966.
53. Nicoletti P.: J. Am. vet. med. Ass. 151, 1778, 1967.
54. Nicoletti P., Murascht T. F.: Am. J. vet. Res. 27, 689, 1966.
55. Pardon P.: Bull. Acad. vet. France 50, 335, 1977.
56. Pardon P., Marley J.: Annis Rech. vet. 7, 297, 1976.
57. Patterson J. M., Deyoe B. L., Stone S. S.: Am. J. vet. Res. 37, 319, 1976.
58. Peiris G. S.: Ceylon vet. J. 20, 18, 1972.
59. Plomet M., Fensterbank R., Reonour G., Gestin J., Philippon A.: Annis Rech. vet. 4, 419, 1973.
60. Ralston D. J., Elberg S. S.: Br. J. exp. Path. 49, 586, 1968.
61. Ralston D. J., Elberg S. S.: J. reticuloendothel. Soc. 6, 109, 1969.
62. Rice C. E., Boyes B.: N. Z. vet. J. 19, 146, 1971.
63. Richardson M., Beck C. C., Clark D. T.: J. Immun. 101, 1363, 1963.
64. Robertson F. J.: Vet. Rec. 86, 313, 1971.
65. Roernik J. H. G.: Development of the nonagglutinogenic killed *Brucella abortus* adjuvants vaccines and its applicability in the control of bovine brucellosis. Praca dokt. Rijksuniversiteit, Utrecht, 1966.
66. Roitt I. M.: Essential immunology. Blackwell, Oxford, 1974.
67. Rose J. E., Lambert G., Roepke M. H.: Am. J. vet. Res. 25, 329, 1964.
68. Rose J. E., Roepke M. H.: Am. J. vet. Res. 25, 325, 1964.
69. Smith A. N., Ingram D. G.: Can. vet. J. 6, 226, 1965.
70. Sultzeanu D.: Nature, Lond. 205, 1086, 1965.
71. Suter E.: Bact. Rev. 20, 94, 1956.
72. Wigzell H.: J. exp. Med. 124, 953, 1966.
73. Wilkinson P. C.: J. Immun. 96, 457, 1966.
74. Woolcock J. B.: Aust. vet. J. 49, 307, 1973.

Adres autora: dr Tadeusz M. Karpiński. Al. Partyzantów 57. 24-100 Puławy.