

KRZYSZTOF SZULOWSKI, JÓZEF PILASZEK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Ocena testu ELISA w porównaniu do metod konwencjonalnych w rozpoznawaniu brucelozy bydła

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Evaluation of ELISA in comparison with conventional methods used for diagnosis of bovine brucellosis

The purpose was to compare the results obtained by ELISA and the following conventional methods used for the diagnosis of bovine brucellosis: Rose Bengal test (RBT), serum agglutination test (SAT) and complement fixation test (CFT).

Three different ELISA test kits from various producers were used. The same 362 sera from cattle were examined by each kit. The sera were represented by: 35 sera positive in RBT, 19 sera coming from naturally infected cattle (received from Great Britain), 3 sera recognized as positive or doubtful in national routine examination and 305 sera negative in RBT.

In ELISA, depending on the kit used: 18, 19 and 26 positive and respectively 0.2 and 5 doubtful results were obtained. All remaining sera were negative. A high degree of correlation between ELISA and CFT was obtained. This indicates a high value ELISA diagnosis of bovine brucellosis.

Diagnostyka serologiczna brucelozy bydła jest pracochłonna i kosztowna. W Polsce inicjuje ją odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP). Surowice reagujące dodatnio w tej próbie, badane są odczynem aglutynacji próbówkowej (OA) i odczynem wiązania dopełniacza (OWD). Dodatni wynik w OWD wskazuje na brucelozę. W przypadku otrzymania wyników wątpliwych w tych odczynach lub dodatnich w OA, badania powtarza się po 21 dniach. Gdy wtedy otrzymane rezultaty nie są jednoznaczne, wykonuje się badania dodatkowe stosując odczyn z 2-merkaptotanołem (OME) i odczyn antyglobulinowy (OAG). Dodatni wynik w tych odczynach świadczy o zakażeniu. Ujemne natomiast wyniki w OWD oraz OME i OAG pozwalają uznać przeciwciała wykrywane w OA, za nieswoiste dla *Brucella (Br.) abortus* (14, 20).

Masowość diagnostyki serologicznej w kierunku brucelozy bydła sprawia, że w badaniach tych dąży się do stosowania metod, które cechują się wysoką wartością diagnostyczną, są proste w wykonaniu i stosunkowo tanie. Jak wynika z piśmiennictwa coraz liczniejsze laboratoria za granicą wprowadzają test ELISA do rutynowej diagnostyki brucelozy bydła (1, 6, 17, 22). Podkreślana jest czułość (1, 8, 17, 21) i swoistość tego testu (12, 17) a także łatwość i szybkość wykonania. Dane te stały się podstawą do podjęcia badań, zmierzających do jego oceny w naszych warunkach.

Celem pracy było porównanie wartości diagnostycznej trzech różnych zestawów testu ELISA z wartością OKAP, OA i OWD.

Materiał i metody

Surowice. Do badań użyto 362 surowice bydła. Stanowiły je: grupa I, surowice ujemne w OKAP, w liczbie 305; grupa II* i III**, surowice dodatnie w OKAP, w liczbie odpowiednio 23 i 12; grupa IV, surowice pochodzące od zwierząt naturalnie zakażonych, w liczbie 19***, grupa V, surowice uznane jako wątpliwe lub dodatnie w badaniach OWD, w liczbie 3. Oprócz wymienionych surowic stosowano surowice standardowe dodatnie, takie jak: Krajowy Standard Surowicy anty-*Brucella abortus* (KSSaBa) do OWD, Roboczy Standard Surowicy anty-*Brucella abortus* (RSSaBa) do OWD i surowicę kontrolną dodatnią o znanym mianie w OWD.

Testy stosowane w badaniach rutynowych w kraju. W celu stwierdzenia w badanych surowicach obecności przeciwciał swoistych dla *Br. abortus* zastosowano OKAP, OA i OWD – według obowiązujących instrukcji (9, 10, 11).

Test ELISA. Użyto zestawy diagnostyczne pochodzące od trzech różnych producentów. Oznakowano je jako zestawy A, B i C. Test wykonywano według załączonych do poszczególnych zestawów instrukcji.

W zestawie A, na opłaszczoną lipowielocukrem *Br. abortus* mikropłytkę nakładano po 0,2 ml surowic badanych oraz dołączone do zestawu kontrolną surowicę ujemną i słabo dodatnią, wszystkie w rozcieńczeniu 1:200. Następnie mikropłytkę przykrywano i przetrzymywano 1,5 godz. w komorze wilgotnej, w temp. pokojowej. Po inkubacji 3-krotnie płukano mikropłytkę, używając pipety wielokanałowej. Następnie do każdej próby dodawano po 0,2 ml rozcieńzonego 1:100 koniugatu, który stanowiły anty-bydłce IgG i peroksydaza chrzanowa. Po dodaniu koniugatu następowała inkubacja w komorze wilgotnej przez 1,5 godz. w temp. pokojowej. Następnie ponownie 3-krotnie płukano mikropłytkę. Po tym zabiegu do każdego zagłębienia dodawano 0,2 ml roztworu chromogenu, zawierającego zielony barwnik ABTS, czyli kwas 2,2-azyno dwu (3-etylo-benzo-tiazolowo-6-sulfonowy). Posiadał on temp. pokojową. Kolejna inkubacja w tej temperaturze miała miejsce do chwili wytworzenia się intensywnego zabarwienia słabo dodatniej próby kontrolnej. Odczytu wyników dokonywano, gdy różnica ekstynkcji między tą próbą i ujemną była wyraźna (po ok. 10-30 min. od chwili dodania chromogenu). Korzystano z czytnika Multiskan MCC/340, stosując filtr dla długości fali 405 nm, zwracając uwagę, aby wartość ekstynkcji słabo dodatniej kontroli zawarta była w przedziale 0,3-0,8. Po osiągnięciu tego warunku dodawano do każdego zagłębienia po 0,05 ml roztworu zatrzymującego reakcję.

W zestawie A, podstawą oceny przeprowadzonego testu była wartość ekstynkcji słabo dodatniej surowicy. Wartość tą uznano jako 100%. W stosunku do tej kontroli obliczano w procentach wartość ekstynkcji badanych prób. Wszystkie wartości poniżej 85% kwalifikowano jako ujemne. Wszystkie wartości powyżej 115% kwalifikowano jako dodatnie. Wszystkie wartości zawarte pomiędzy 85-115% oceniano jako wątpliwe.

Między porównywanymi zestawami ELISA było szereg mniej lub bardziej istotnych różnic natury technicznej. Dotyczyły one: wykorzystania innych dla każdego zestawu surowic kon-

* surowice otrzymano z różnych Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW)

** surowice pochodzące z I lub II badania rutynowego (bad. odwoławcze wykonane w Instytucie Weterynarii w Puławach)

*** surowice otrzymano z W. Brytanii (Dr A. P. MacMillan – Central Veterinary Laboratory – Weybridge)

trolnych dodatnich i ujemnych, rodzaju i pH używanych buforów, stopnia rozcieńczenia badanych i kontrolnych surowic, czasu i temperatury inkubacji, sposobu płukania mikroplutek. Również odczyt i interpretacja wyników opierały się o nieco inne zasady. Przykładowo w zestawie B odczytywano wyniki po 20 min. od dodania chromogenu. Surowice, których wartość ekstynkcji była niższa niż wartość kontrolnej surowicy dodatniej, oceniano jako pochodzące od zwierzęcia, które nie miało kontaktu z *Br. abortus*, zaś surowice, których wartości ekstynkcji przekraczały wartość ekstynkcji kontrolnej surowicy dodatniej, kwalifikowano jako pochodzące od zwierzęcia, które miało kontakt z tym zarazkiem. W przypadku, gdy wyniki kolejnych powtórzeń badanych prób leżały po różnych stronach wartości granicznej, wynik oceniano jako wątpliwy. W zestawie C odczytu dokonywano po 10 min. od dodania chromogenu i wyzerowaniu czytnika na zagłębieniu H-12 (próba ślepa – bez surowic). Wartość graniczną (cut – off point) pomiędzy wynikami dodatnimi i ujemnymi obliczano jako 10% średniej wartości ekstynkcji kontrolnej surowicy dodatniej nastawionej w ośmiu dołkach. Podobnie jak w poprzednim przypadku, gdy wyniki kolejnych powtórzeń badanych prób leżały po różnych stronach wartości granicznej, wynik oceniano jako wątpliwy.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 porównano wyniki badań otrzymane trzema zestawami ELISA pięciu różnych grup surowic. W przypadku grupy I (surowice ujemne w OKAP) uzyskane wyniki potwierdziły, że w badanych surowicach nie ma przeciwciał anty-Brucella. W grupie II (surowice dodatnie w OKAP), na 23 surowice badane jedynie zestawem C 4 surowice okazały się dodatnie, zaś 2 wątpliwe. W badaniu zestawami A i B wszystkie były ujemne. Surowice grupy III, również reagujące dodatnio w OKAP, w badaniu zestawem A okazały się wszystkie ujemne, w badaniach zestawem B 1 była wątpliwa a w przypadku zestawu C 3 okazały się wątpliwe. W kolejnym doświadczeniu badano surowice grupy IV, które zgodnie z informacją Central Veterinary Laboratory, Weybridge były dodatnie. Zestawem C wynik ten w odniesieniu do wszystkich 19 surowic został potwierdzony. W przypadku zestawów A i B 1 surowica okazała się ujemna. Surowice grupy V, uznane

Tab. 1. Wyniki badania surowic bydła zestawami ELISA trzech różnych firm (oznaczonych jako A, B, C)

Grupa surowic	Liczba badanych surowic	Wyniki								
		dodatni			wątpliwy			ujemny		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	305							305	305	305
II	23			4			2	23	23	17
III	12				1	3		12	11	9
IV	19	18	18	18				1	1	
V	3		1	3	1			3	1	
Razem	362	18	19	26	2	5		344	341	331

Objaśnienia: grupa: I. Surowice ujemne w OKAP, II. Surowice dodatnie w OKAP, otrzymane z różnych ZHW, III. Surowice dodatnie w OKAP, pochodzące z I lub II badania rutynowego wykonanego w Instytucie Wet. w Puławach, IV. Surowice pochodzące od zwierząt naturalnie zakażonych, otrzymane z W. Brytanii, V. Surowice pochodzące z badań rutynowych, reagujące wątpliwie lub dodatnio w OWD

za wątpliwe lub dodatnie w OWD, w trzech przypadkach były dodatnie przy zastosowaniu zestawu C i w 1 przypadku w zestawie B, zaś 1 surowica reagowała wątpliwie w tym ostatnim zestawie. Badając surowice zestawem A uzyskano wszystkie wyniki ujemne.

Kolejne doświadczenia miały na celu ocenę zestawów ELISA A, B i C w porównaniu z OKAP, OA i OWD przy badaniu surowic otrzymanych z różnych ZHW, określonych jako dodatnie w OKAP.

Jak wynika z danych tab. 2, wykazano identyczność wyników uzyskanych przy pomocy zestawów ELISA A i B oraz OWD a bardzo dużą zgodność z OWD wyników otrzymanych przy zastosowaniu zestawu C.

Wyniki zawarte w tab. 2 wykazały, że OKAP we wszystkich surowicach badanych dał wynik fałszywie dodatni, jeżeli wyniki OWD uznaje się za miarodajne, co jest wielokrotnie w

Tab. 2. Wyniki badań różnymi metodami surowic grupy II*

Numer surowicy	OKAP	OA (mj/ml) ^x	OWD	ELISA		
				A	B	C
1	+	116,25	-	-	-	-
2	+	66,25	-	-	-	-
3	+	33,12	-	-	-	-
4	+	100,00	-	-	-	+
5	+	58,13	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	29,06	-	-	-	-
8	+	33,12	-	-	-	-
9	+	33,12	-	-	-	-
10	+	100,00	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	+/-
12	+	58,13	-	-	-	+/-
13	+	58,13	-	-	-	-
14	+	66,25	-	-	-	-
15	+	25,00	-	-	-	-
16	+	100,00	-	-	-	+
17	+	100,00	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	+
19	+	58,13	-	-	-	-
20	+	50,00	-	-	-	+
21	+	50,00	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-
23	+	50,00	-	-	-	-

Objaśnienia: * – surowice otrzymane z różnych ZHW w Polsce dodatnie w OKAP, ^x – międzynarodowe jednostki w 1 ml surowicy. Za dodatni – według normy krajowej, uważa się wynik co najmniej 100,00 mj/ml; 50,00 – 100,00 mj/ml to wynik wątpliwy, a poniżej 50,00 mj/ml – ujemny

Tab. 3. Wyniki badań różnymi metodami surowic grupy III*

Numer surowicy	OKAP	OA (mj/ml) ^x	OWD	ELISA		
				A	B	C
1	+	116,25	-	-	-	-
2	+	29,06	-	-	-	-
3	+	200,00	-	-	-	+/-
4	+	50,00	-	-	-	-
5	+	29,06	-	-	-	-
6	+	50,00	-	-	+/-	+/-
7	+	100,00	-	-	-	-
8	+	100,00	-	-	-	-
9	+	116,25	-	-	-	-
10	+	100,00	-	-	-	-
11	+	29,06	-	-	-	-
12	+	25	-	-	-	+/-

Objaśnienia: * - surowice pochodzące z I lub II badania rutynowego, dodatnie w OKAP, ^x - międzynarodowe jednostki w 1 ml surowicy

Tab. 4. Wyniki badań surowic grupy IV* uzyskane w OWD oraz ELISA

Numer surowicy	ELISA			OWD (mjwd) ^x
	A	B	C	
1	229 ^{xx}	194	135	640
2	141	195	119	67
3	233	203	110	106
4	196	198	85	186
5	211	192	83	53
6	120	152	97	424
7	162	162	79	46,5
8	196	196	72	46,5
9	130	130	56	20
10	199	199	83	33,5
11	193	193	82	160
12	192	192	46	20
13	41(-)	38(-)	10	16,8(+/-)
14	141	177	62	186
15	257	168	120	40
16	128	152	105	33,5
17	211	117	80	20
18	282	213	95	>424
19	138	133	57	20

Objaśnienia: * - surowice pochodzące od naturalnie zakażonych zwierząt. Wszystkie reagowały dodatnio w OKAP, A, B, C - zestawy użyte do badania, ^x - międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz; za dodatni uważa się wynik co najmniej 20 mjwd; 10 - 20 mjwd to wynik wątpliwy, a poniżej 20 mjwd - ujemny, ^{xx} - procentowa wartość ekstynkcji badanej surowicy w stosunku do wartości ekstynkcji kontroli dodatniej zawartej w zestawie

piśmiennictwie światowym potwierdzone (1, 7, 12, 16, 22). Odczyn aglutynacji, poza czterema wynikami ujemnymi, w pozostałych przypadkach także dał wynik fałszywie dodatni.

Rezultaty przedstawione w tab. 3, dotyczące również surowic dodatnich w OKAP, w pełni potwierdzają rezultaty zawarte w tab. 2.

Tabela 4 zawiera wyniki badań 19 surowic. Pochodziły one od naturalnie zakażonych zwierząt. Zbadano je 3 różnymi zestawami ELISA oraz OWD i OKAP. Ze względu na niewielkie ilości surowic nie badano ich metodą aglutynacji probówkowej. W tabeli tej przedstawiono wartości ekstynkcji (OD), uzyskane w ELISA, wyrażone w procentach w stosunku do wartości OD kontroli dodatnich zawartych w poszczególnych zestawach oraz wyniki OWD. W 18 przypadkach we wszystkich zestawach uzyskano wynik dodatni, podobnie jak w OKAP i OWD. Jedna surowica (nr 13) dała wynik ujemny w badaniu przy użyciu zestawów A i B oraz wynik wątpliwy w OWD - 16,8 międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz (mjwd). Według kryteriów oceny wyników testu ELISA zestawem C, surowicę tę uznano jako dodatnią, chociaż wartość OD była zdecydowanie niższa niż pozostałych prób, nieznacznie przekraczając graniczną wartość 10%.

Podobnie jak poprzednio wykazano bardzo dużego stopnia zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi w OWD i ELISA. W tym przypadku odnosi się ona do wyników dodatnich. Równocześnie stwierdzono brak prostej zależności pomiędzy wysokością miana wyrażoną w mjwd w OWD a wartością ekstynkcji w ELISA. Na przykład badając surowicę nr 6 uzyskano w OWD 424 mjwd i dość niskie wartości w ELISA (120%, 152% i 97%), z kolei w przypadku surowicy nr 15 uzyskano wysokie wartości w ELISA (257%, 168%, 120%) przy stosunkowo niskich wartościach w OWD (40 mjwd).

Wyniki zawarte w tab. 5, dotyczące surowic dodatnich lub wątpliwych w OWD, potwierdziły (z wyjątkiem zestawu A), poprzednie spostrzeżenia odnośnie korelacji wyników uzyskanych w teście ELISA i OWD.

Tabela 6 przedstawia wyniki uzyskane w badaniach trzema zestawami ELISA surowic standardowych dodatnich oraz su-

Tab. 5. Wyniki badań różnymi metodami surowic grupy V*

Numer surowicy	OKAP	OA (mj/ml) ^x	OWD (mjwd) ^{xx}	ELISA		
				A	B	C
1	+	33,12	11,63	-	-	+
2	+	58,13	11,63	-	+/-	+
3	+	400,00	40,00	-	+	+

Objaśnienia: * - surowice pochodzące z badań rutynowych, reagujące wątpliwie lub dodatnio w OWD, ^x - międzynarodowe jednostki w 1 ml surowicy, ^{xx} - międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz

Tab. 6. Wyniki badania zestawami ELISA różnych firm dodatnich surowic wzorcowych, używanych w pracowni brucelozy

Surowica	Zestaw A	Zestaw B	Zestaw C
KSSaBa-OWD	+	+	+
RSSaBa-OWD	+	+	+
Kontrolna dodatnia	+	+	+

rowicy krwi zakażonej *Br. abortus*. W tym przypadku nie stwierdzono żadnych różnic, zależnych od użytego zestawu, ze względu na to, iż były to surowice jednoznacznie dodatnie.

Z omówionych doświadczeń wynika, że stosując OWD i ELISA uzyskuje się wyniki identyczne lub bardzo zbliżone, natomiast rezultaty otrzymane próbą aglutynacji próbówkowej i OKAP, wskazują na niedostateczną swoistość obu odczynów. Stosowanie mimo to w diagnostyce rutynowej testu OKAP wydaje się być uzasadnione. Zapewnia on bowiem wykrycie możliwie dużego odsetka zwierząt podejrzanych o zakażenie a przy tym jest prosty technicznie. Wśród uzyskanych wyników są niestety również wyniki fałszywie dodatnie. Te jednak identyfikuje obligatoryjnie w tym wypadku wykonywane w kraju OWD. Zatem z merytorycznego punktu widzenia można obecny sposób badania w kierunku brucelozy uznać za możliwy do przyjęcia. Mimo to OKAP można by zastąpić testem ELISA, który wydaje się być równorzędny w sensie wyniku dodatniego lub ujemnego z OWD. Natomiast na podstawie przeprowadzonych badań odczyn aglutynacji próbówkowej należałoby wycofać z zestawu testów stosowanych w kraju w rutynowej diagnostyce brucelozy bydła. Wniosek ten znajduje potwierdzenie w pracach autorów zagranicznych (16).

Brak korelacji między wynikami uzyskanymi przy pomocy ELISA a OKAP i OA można między innymi tłumaczyć użyciem w tym pierwszym przypadku lipowielocukru *Br. abortus* a w tym drugim komórek bakteryjnych. Na ich powierzchni znajdują się różne antygeny, w tym również takie, które są pokrewne z antygenami innych bakterii, jak np. *Yersinia enterocolitica* O:9 lub *Escherichia coli* O:157. Istnieje zatem znacznie większa możliwość łączenia się ich z przeciwciałami krzyżowo reagującymi, niż w przypadku lipowielocukru, reprezentującego zespół antygenowy bardziej wyselekcjonowany w porównaniu do komórki bakteryjnej. Bardziej istotne jest wykrywanie przez koniugat zestawów ELISA selektywnie przeciwciał klasy IgG. Fakt ten czyni test ELISA bardziej swoistym niż OKAP i OA, w których znaczną rolę odgrywiają przeciwciała IgM, o szerszej niż przeciwciała IgG swoistości (2, 3, 18). Przeciwciałom tym obok niewątpliwie ważnej roli jako wskaźnika wczesnego zakażenia przypisuje się właściwość uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Są one następstwem reakcji krzyżowych lub odczynów niespecyficznych (12, 13, 19).

Niepełna zgodność wyników OWD i ELISA może być wyjaśniona wykrywaniem w tym pierwszym odczynie oprócz przeciwciał IgG również przeciwciał IgM (4, 18). Te ostatnie nie są wykazywane przy zastosowaniu ELISA. OWD mimo, że uznawane jest za test wysoce swoisty daje z tego powodu w bardzo małym odsetku wyniki fałszywie dodatnie. Są one rezultatem reakcji krzyżowych pomiędzy antygenami *Br. abortus* a przeciwciałami indukowanymi obecnością drobnoustrojów pokrewnych antygenowo z bakteriami *Brucella* (7). Istotną rolę odgrywiają też wzajemne proporcje IgM w stosunku do IgG. W przypadku dużej koncentracji swoistych (anty-*Brucella*) przeciwciał IgM w stosunku do niewielkiej ilości IgG może dojść do zablokowania aktywności tych ostatnich i reakcji ujemnej w ELISA przy dodatnim wyniku w OWD (13, 19). Z tych samych prawdopodobnie przyczyn wynika stwierdzony w badaniu surowic grupy IV brak prostej zależności pomiędzy wysokością miana w OWD a wartością ekstynkcji w ELISA. Niektórzy autorzy wskazują też na rolę jaką odgrywa różny poziom powinowactwa poszukiwanych przeciwciał względem antygenów *Brucella*, różnych w ELISA i OWD (4, 22).

Zaobserwowane niewielkie różnice wyników pomiędzy ocenianymi w pracy zestawami ELISA mogą mieć kilka przyczyn. Pierwsza z nich to swoistość używanych koniugatów. Pomimo tego, że są one wszystkie skierowane przeciwko IgG, to jednak producenci zestawów nie podają dokładnie czy wykrywają one wszystkie IgG, czy IgG1 lub IgG2. Ponadto koniugaty anti-IgG mogą jednak posiadać różnego stopnia swoistość anti-IgM (5, 19). Zależy to od sposobu otrzymywania i poziomu oczyszczenia omawianych frakcji globulin. Bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na występowanie różnic między wynikami poszczególnych zestawów ELISA jest też sposób wyznaczania wartości granicznych pozwalających zakwalifikować daną surowicę jako ujemną bądź dodatnią oraz ściśle z tym związane różne miana kontrolnych surowic dodatnich dołączonych do zestawów (5, 6).

Mimo wymienionych zastrzeżeń, uzyskane wyniki wskazują na dużą wartość diagnostyczną testu ELISA i uzasadniają jego wykorzystanie w rutynowej diagnostyce brucelozy bydła. Potwierdzają jednocześnie spostrzeżenia innych autorów (1, 5, 12, 15) wskazujące na konieczność standaryzowania reagentów i procedur w teście ELISA tak, aby uzyskane wyniki były porównywalne i umożliwiały jednoznaczną interpretację.

Piśmiennictwo

1. Alton G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M.: Techniques for the Brucellosis Laboratory, INRA, Paris, 1988.
2. Beh K. J.: Res. Vet. Sci. 14, 381, 1973.
3. Beh K. J.: Res. Vet. Sci. 17, 1, 1974.
4. Butler J. E., Feldbush T. L., McGivern P. L., Stewart J.: Immunochemistry 15, 131, 1978.
5. Byrd J. W., Heck F. C., Hidalgo R. J.: J. Vet. Res. 40, 896, 1979.
6. Cavigill C. M., Lee K., Clarke I.: Aust. Vet. J. 62, 49, 1985.
7. Fensterbank R.: Brucellosis in Cattle, Sheep and Goats: Diagnosis, Control and Vaccination. OIE, 54th General Session, Paris, 1986.
8. Heck F. C., Williams J. D., Pruett J.: J. Clin. Microbiol. 11, 398, 1980.
9. Instrukcja tymczasowa nr 15 Min. Roln. – Dep. Wet. z dn. 27.10.1964 r. w sprawie zasad wykonywania badań na brucelozę za pomocą aglutynacji próbówkowej.
10. Instrukcja nr 52 Min. Roln. – Dep. Wet. z dn. 31.05.1980 r. wykonywania odczynu wiązania dopełniacza w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
11. Instrukcja nr 55 Min. Roln. Gosp. Żywn. Dep. Wet. z dn. 2.02.1984 r. wykonywania odczynu kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
12. Joint FAO/WHO Expert Comm. Brucellosis, Sixth Report, WHO, Geneva, 1986.
13. Jones L. M.: Brucella Antigens and Serologic Test Results, w: Bovine Brucellosis – An International Symposium, red. Crawford R. P., Hidalgo R. J., Texas A and M University Press, College Station, 1977, s. 40.
14. Królak M., Chyliński G., Stryżak A., Nowosielski T., Marciniński W.: Medycyna Wet. 37, 72, 1981.
15. Lamb V. L., Jones L. M., Schurig G. G.: Infect. Immun. 26, 240, 1979.
16. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Lists A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees, OIE, Paris, 1992.
17. Nielsen K., Gall D., Kelly W., Hennig D., Garcia M.: Enzyme Immunoassay Application to Diagnosis of Bovine Brucellosis, Agriculture Canada, Nepean, 1992.
18. Peterson J. M., Deyoe B. C., Stone S. S.: J. Vet. Res. 37, 319, 1976.
19. Stenshorn B. W., Nielsen K., Samagh B. S., Forbes L. B., Ingram D. G.: Am. J. Vet. Res. 41, 1779, 1980.
20. Stryżak A., Królak M.: Medycyna Wet. 37, 328, 1981.
21. Sutherland S. S.: J. Clin. Microbiol. 22, 44, 1985.
22. Williamson C. C., Oberem P. T., Poestamper C., De Waal D. T., Matthee O., Brett O. L.: Onderstepoort J. Vet. Res. 55, 1, 1988.

Adres autora: lek. wet. Krzysztof Szulowski, ul. Partyzantów 1, 24-123 Janowice