

21. OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Second edition, 1992.
22. Rebhun W. C., Smith J. S., Post J. E., Holden H. R.: Cornell Vet. 68, 297, 1978.
23. Reisinger L., Reiman H.: Wien. tierarztl. Mschr. 15, 249, 1928.
24. Roizman B.: Arch. Virol. 123, 425, 1992.
25. Roizman B., Baines J.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 14, 63, 1991.
26. Schwartz A. J. E., York C. J., Zirbel L. W., Estella L. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 453, 1957.
27. Schultz R. D., Adams L. S., Letchworth G., Sheffy B. E., Manning T., Bean B.: Theriogenology 17, 115, 1982.
28. Straub O. C.: Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 14, 175, 1991.
29. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A.: Virology 144, 204, 1985.
30. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A.: J. Virol. 59, 401, 1986.
31. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Gifford G. A., Babiuk L. A.: Vaccine 8, 358, 1990.
32. Van Engelenburg F. A. C., Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A. M., Van den Burg L., Moerman A., Gielkens A. L. J., Van Oirschot J. T.: J. gen. Virol. 75, 2311, 1994.
33. Van Engelenburg F. A. C., Maes R. K., Van Oirschot J. T., Rijsewijk F. A. M.: J. of Clinical Microbiology 31, 3129, 1993.
34. Whetstone C. A., Miller J. M., Seal B. S., Bello L. J., Lawrence W. C.: Arch. Virol. 122, 207, 1992.
35. Wiedman M., Brandon R.: J. Virol. Methods 44, 129, 1993.
36. Wittmann G.: Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Kluwer Academic Publishers, 1989.

Adres autora: dr Jerzy Rola, ul. Kościuszki 19/16, 24-100 Puławy

MAREK LIPIEC

artykuł przeglądowy

Testy aktualnie stosowane w rozpoznawaniu paratuberkulozy bydła

Pracownia Immunologii Gruźlicy Państwowego Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Paratuberkuloza (choroba Johnego) jest przewlekłą chorobą przeżuwaczy wywołaną przez *Mycobacterium paratuberculosis*. Zarazek wykazuje powinowactwo do błony śluzowej i podśluzowej jelit gdzie namnaża się obficie, wywołując przerostowy stan zapalny ściany jelita prowadzący do biegunki, stopniowego wyniszczenia organizmu i śmierci zwierzęcia.

Choroba powoduje znaczne straty ekonomiczne. Są one spowodowane spadkiem mleczności oraz koniecznością wcześniejszej eliminacji zwierząt z hodowli, stanowiących niekiedy cenny materiał genetyczny (2, 8, 9, 30, 68, 71). Ponadto paratuberkuloza predysponuje do występowania schorzeń towarzyszących, głównie zapalenia gruczołu mlekowego i niepłodności (2). Znaczne koszty powoduje konieczność osobnego odchowu cieląt pochodzących od krów ze stad dotkniętych paratuberkulozą (30). Straty powstałe w następstwie paratuberkulozy bydła ocenia się w USA na 1,5 mld dolarów rocznie (38).

Zwalczanie paratuberkulozy jest trudne z uwagi na długi okres inkubacji choroby, wynoszący od kilku miesięcy do kilku lat oraz na brak swoistych i czułych metod rozpoznawania. Nie u wszystkich zakażonych zwierząt rozwija się kliniczna postać choroby. Prawdopodobieństwo wystąpienia objawów jest tym większe, im we wcześniejszym okresie życia doszło do zakażenia. Na infekcję i rozwój choroby znacznie bardziej narażone są zwierzęta 1-3 tygodniowe niż 1-2 letnie. Zwierzęta zakażone w starszym wieku mogą być bezobjawowymi nosicielami zarazka przez wiele lat (70).

Podstawę rozpoznawania paratuberkulozy stanowi próba izolowania zarazka z tkanek, pobranych w badaniu sekcyjnym, biopsji lub z kału (7, 66). Próba ta posiada 100% swoistość (52, 62, 69), a jej wyniki stanowią podstawę do oceny wyników testów serologicznych stosowanych w rozpoznawaniu tej choroby (19). Unowocześnienie metod izolowania *M. paratuberculosis* z kału spowodowało 2-3-krotne zwiększenie czułości próby, jednakże czułość ta wynosi nie więcej niż 50% (69). Jest to spowodowane okresowym brakiem siewstwa u nosicieli

M. paratuberculosis. Jeszcze mniejszą czułość i swoistość posiada mikroskopia preparatów z kału. W preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena nie mamy bowiem możliwości odróżniania *M. paratuberculosis* od saprofitycznych prątków kwasoopornych (70). Niewielkie zastosowanie praktyczne do rozpoznawania choroby Johnego posiadają też testy hemaglutynacji (34), zahamowania migracji leukocytów (6), stymulacji limfocytów (9, 23), transformacji limfocytów (21), immunofluorescencyjny (1, 25, 32), czy immunoperoksydazowy (46). Śródskórny test z użyciem joniny posiada także ograniczoną wartość, z uwagi na występowanie reakcji fałszywie dodatnich (infekcje *M. avium*) i fałszywie ujemnych (67, 70).

W wielu laboratoriach na całym świecie prowadzi się badania mające na celu zwiększenie czułości i swoistości testów służących do rozpoznawania paratuberkulozy przeżuwaczy, szczególnie we wczesnym okresie choroby. Utrzymywanie się ognisk choroby Johnego w woj. bydgoskim oraz import i eksport zwierząt hodowlanych stworzył konieczność podjęcia prac mających na celu udoskonalenie diagnostyki tej choroby w naszym kraju. Do przyżyciowego rozpoznawania paratuberkulozy bydła usiłowano zaadaptować szereg testów dających dobre wyniki w rozpoznawaniu innych chorób zakaźnych. Niektóre z nich, jak OWD, weszły do rutynowych badań, inne traktowane są jako testy uzupełniające lub ich przydatność jest przedmiotem dyskusji i ocen.

Odczyn wiązania dopełniacza

Spośród metod serologicznych próbą najczęściej stosowaną od wielu lat w rozpoznawaniu paratuberkulozy jest odczyn wiązania dopełniacza (OWD) (19, 32, 63, 67). Po raz pierwszy został on zastosowany przez Banga i Andersena (cyt. za 28), którzy wysoko ocenili jego przydatność w rozpoznawaniu choroby Johnego. OWD zyskał wielu zwolenników, a niektórzy uznawali ten test za jedyny pozwalający wykryć zwierzę będące we wczesnym okresie choroby (51). Niektórzy autorzy uznali jednak, że test ten jest zbyt mało swoisty i podjęli

prace nad uzyskaniem odpowiednio aktywnych antygenów i modyfikacją próby (11, 37, 49, 57).

Liczni autorzy, pomimo znacznego postępu w technice wykonywania i zwiększeniu swoistości próby, podkreślają możliwość wystąpienia reakcji zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych (2, 13, 19, 63, 73). W przebiegu infekcji *M. paratuberculosis* swoiste przeciwciała wykrywane są tym testem stosunkowo późno. Larsen i wsp. (33) a także Merkal i wsp. (40) wykazali, że przeciwciała wiążące dopełniacz pojawiają się w surowicach zwierząt chorych niejednokrotnie dopiero po upływie 1 roku od chwili zakażenia. Obserwacje niektórych badaczy (33, 35) wykazały ponadto znaczne wahania miana przeciwciał w przebiegu choroby, a nawet czasowy ich zanik. Stąd też OWD jest uważany za przydatny przede wszystkim do potwierdzania klinicznych przypadków choroby, z biegunką i wydalaniem *M. paratuberculosis* z kałem (26, 64). De Lisle i wsp. (20) wykazali w swoich badaniach dużą korelację wyników uzyskanych w OWD z wynikami posiewów kału od zwierząt chorych. W grupie zwierząt wydających prątki z kałem uzyskiwano u wszystkich osobników dodatni wynik OWD. Natomiast spośród 37 zwierząt zakażonych, będących siewcami okresowymi lub nie wykazujących obecności *M. paratuberculosis* w kale, test był dodatni tylko u 3 osobników. Colgrove i wsp. (13) porównywali przydatność różnych testów serologicznych w rozpoznawaniu paratuberkulozy bydła i stwierdzili, że czułość OWD jest wyższa niż odczynu immunodiffuzji w żelu agarowym, szczególnie u krów będących siewcami zarazka w zaawansowanym stadium choroby. U zwierząt tych czułość testu określili na około 90%. Whitlock (67) uważa, że zwierzęta wykazujące dodatnie wyniki w odczynie wiązania dopełniacza przy rozcieńczeniach surowicy < 1:32 są zwykle siewcami *M. paratuberculosis* z kałem. Mała czułość odczynu wiązania dopełniacza w początkowym stadium infekcji oraz brak dostatecznej swoistości nie pozwala na zwalczanie paratuberkulozy tylko w oparciu o wyniki tego testu (32). OWD jest obecnie używany rutynowo w Polsce do rozpoznawania paratuberkulozy u importowanego bydła i owiec.

Test immunodiffuzji w żelu agarowym

Na ogół uznawany jest jako test pomocny tylko do potwierdzania klinicznych przypadków choroby, gdyż wykazuje małą czułość u zwierząt zakażonych, u których nie obserwuje się spadku wagi ciała lub biegunki (56, 64). Sweeney (62) określa czułość testu immunodiffuzji w żelu u bezobjawowych nosicieli *M. paratuberculosis* na około 10% a u zwierząt z pełnymi objawami choroby na 70-90%. Ocena wartości diagnostycznej omawianej próby przez różnych badaczy jest różna. Colgrove i wsp. (13) przyjmują, że czułość testu w późniejszym stadium infekcji nie przekracza 54,5%. Odmienne zdanie wyraża Sherman (55) stwierdzając, że test ten wykrywa blisko 100% zwierząt chorych. Autor ten twierdzi też, że dodatni wynik testu znajduje zwykle potwierdzenie w dodatnich wynikach próby hodowlanej z kałem. Whitlock (67, 70) podkreśla korelację między objawami choroby a wynikami testu. Często bowiem u bezobjawowych siewców *M. paratuberculosis* próba ta daje ujemne wyniki. Mikromodyfikacje próby immunodiffuzji w żelu agarowym nieznacznie tylko podniosły jej czułość (64). Swoistość testu jest określana zwykle na 80-90%. Omawiany test posiada pewne znaczenie w rozpoznawaniu choroby u pojedynczych osobników. Podobnie jak odczyn wiązania

dopełniacza nie może stanowić podstawy zwalczania paratuberkulozy i nie powinien być stosowany jako test stada (67).

ELISA i DIA

W ostatnim okresie, znaczny postęp w rozpoznawaniu paratuberkulozy była i owiec stanowi adaptacja ELISA (1, 10, 15, 20, 27, 31, 37, 54, 58, 59, 60, 73, 74). Zasadą testu jest stwierdzenie obecności swoistych przeciwciał na podstawie pomiaru natężenia reakcji barwnej zachodzącej w następstwie wiązania przez te przeciwciała odpowiedniego koniugatu i substratu. Test ten, uważany za najbardziej czuły i swoisty w wykrywaniu przeciwciał w surowicy zwierząt zakażonych *M. paratuberculosis* jest obecnie zalecany przez OIE do rozpoznawania choroby Johnego (47). Pozwala on wykryć w surowicy zwierząt immunoglobuliny różnych klas. W przypadku paratuberkulozy bydła użycie koniugatów antybydłych IgM nie pozwala na precyzyjne rozpoznawanie choroby (73, 74). Znacznie lepsze wyniki uzyskuje się wykrywając powstałe w przebiegu infekcji swoiste przeciwciała klasy IgG1 (3, 73).

Istotnym udogodnieniem w stosowaniu tej metody jest mniejsze zużycie odczynników niż w przy OWD, możliwość wykonania znacznej liczby prób jednocześnie, krótki czas oczekiwania na wynik, znacznie mniejszy jednostkowy koszt próby, a przede wszystkim wyeliminowanie subiektywnej oceny wizualnej. Metoda wymaga jednak kosztownego wyposażenia (czytnik) i jest możliwa do przeprowadzenia tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach. Obecnie dostępne są już gotowe zestawy do ELISA, stanowiące podstawę programu badań zmierzających do uzdrawiania stad, w których stwierdzono infekcję *M. paratuberculosis* (45, 48). Testy te opierają się na antygenie ze szczepu *M. paratuberculosis* 18. W badaniach wykorzystywany jest też antygen D, lipoarabinomannanowy, protoplazmatyczny i protoplazmatyczny oczyszczony (1, 13, 25, 58, 59, 60, 61), co może stanowić istotną trudność w porównywaniu wyników badań uzyskanych w laboratoriach stosujących różne modyfikacje ELISA. Czułość tej metody u zwierząt wykazujących kliniczne objawy paratuberkulozy jest porównywalna z czułością odczynu wiązania dopełniacza (47). Jednakże znacznie większą wartość niż OWD posiada ELISA w rozpoznawaniu wczesnych zakażeń bezobjawowych. Przegląd piśmiennictwa dostarcza szeregu danych na temat czułości tej metody. Whitlock (67) określa czułość testów handlowych (Idexx Corporation) na 10-50%. Inni autorzy donoszą, że ELISA wykrywa 40-90% zwierząt chorych (16, 17, 62, 64). Większa jednomyślność panuje w ocenie swoistości tego testu, którą określa się zwykle na 60-90% (15, 16, 17, 42, 67). Yokomizo (73) stwierdza jednak, że nawet w teście o tak wysokiej swoistości istnieje możliwość reakcji fałszywie dodatnich, wywołanych infekcją organizmu zwierząt prątkami grupy *M. avium-intracellulare*. Znacznie rzadziej spotykane są reakcje fałszywie ujemne. Mogą one wystąpić u części zwierząt we wczesnym stadium zakażenia, zanim zostaną wytworzone swoiste, wiążące antygen, przeciwciała. Brak reakcji może być spowodowany także anergią, w procesie tolerancji immunologicznej a także w wyniku utworzenia w przebiegu infekcji kompleksów immunologicznych skutecznie maskujących swoiste przeciwciała lub antygen (12, 38, 39, 41, 43).

Swoistość ELISA można zwiększyć stosując wcześniejszą inkubację badanych surowic z zawiesiną *M. phlei*. Zwiększa to swoistość testu, ale powoduje ograniczenie jego czułości (41, 42). Tsai i wsp. (64) stwierdziła, że dla około 6% badanych

surowic, pochodzących od zwierząt z ujemnym wynikiem badania hodowlanego, następowała zmiana wyników ELISA na dodatni po wcześniejszej inkubacji surowic z zawiesiną *M. phlei*. Świadczyć to może o przerwach w siewstwie *M. paratuberculosis* z kałem u pewnego odsetka zwierząt, lub też o wytwarzaniu przez część zwierząt przeciwciał przed wystąpieniem siewstwa zarazków. Niedostateczna może być także czułość stosowanych metod hodowlanych. Inkubacja surowic z zawiesiną *M. phlei*, wprowadzając dodatkowe czynności laboratoryjne, nieco komplikuje próbę i wydłuża czas oczekiwania na wyniki. Niezmiernie ważne dla oceny wyników tego testu jest prawidłowe ustalenie wartości, dla której wynik próby jest dodatni. Podstawę stanowi odpowiednio szeroki zestaw wzorcowych surowic ujemnych. Yokomizo (74) porównując dwie metody wyznaczania tej wartości, sugeruje, że znacznie lepiej stosować kryterium $2 \times$ średnia wyników wzorcowych surowic ujemnych, niż średnia + 3 odchylenia standardowe. Wyznaczenie niższej wartości, od której surowice uznawane są za dodatnie, powoduje zwiększenie czułości testu, jednakże wyznaczenie wartości wyższej i zwiększenie swoistości próby wydaje się bardziej użyteczne w zwalczaniu paratuberkulozy (64).

Testem pokrewnym ELISA, opartym na tych samych zasadach, jest DIA (Dot Immunobinding Assay). Reakcja barwna zachodzi w obrębie kropli antygeny w różnych rozcieńczeniach naniesionego na pasek nitrocelulozowy. Wartość tego testu w rozpoznawaniu paratuberkulozy jest porównywalna z klasycznym testem ELISA (18, 41, 42, 64, 72). Metoda ta ma szereg zalet. Test jest znacznie prostszy do wykonania, tańszy oraz szybszy niż ELISA. Może być przeprowadzony w laboratoriach terenowych w oparciu o wizualną ocenę intensywności zabarwienia kropli, bez użycia kosztownego wyposażenia. Gotowe do przeprowadzenia próby paski nitrocelulozowe z antygenem mogą być przechowywane przez dłuższy czas w temperaturze 4°C bez utraty wartości (64). Potwierdzają to wyniki niepublikowanych badań własnych. Paski z wynikami dają zapis trwały i może być z nich tworzona dokumentacja badań przechowywana przez szereg tygodni. Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość zastosowania na jednym pasku kilku antygenów i jednoczesne rozpoznawanie kilku jednostek chorobowych (26). Powierzchnia paska nitrocelulozowego wydaje się znacznie stabilniejszą powierzchnią dla reakcji niż gładkie ścianki basenika płytki. Woodruff i wsp. (72) stwierdzają, że swoistość tego testu jest porównywalna z ELISA, a jego czułość określa się na 85% u zwierząt z objawami paratuberkulozy i na 65% w bezobjawowym przebiegu choroby. Badania Tsai i wsp. (64) wykazały, że swoistość DIA, wynosząca 84% może być zwiększona do około 94% po zastosowaniu wcześniej inkubacji badanych surowic z zawiesiną *M. phlei*. Jednocześnie dochodzi jednak do obniżenia czułości próby z 68 do 59%. Bech-Nielsen i wsp. (5) stwierdzili, że proces ten jest jeszcze intensywniejszy. Po adsorpcji surowic *M. phlei* swoistość próby wzrosła co prawda do 97,8% ale czułość spadła do 34,1%. Autor ten podkreśla też dużą subiektywność w wizualnej interpretacji wyników. Odczyt bez użycia specjalnej aparatury wskazywał na czułość testu 66%. Po zastosowaniu analizatora kolorymetrycznego wartość ta wzrosła do 87,5%. Spostrzeżenia własne wskazują, że należy zachować dużą ostrożność przy wizualnej ocenie wyników tego testu. Znaczną trudność sprawiają niezbyt jasne, trudne do oceny wyniki DIA, szczególnie w przypadku stad proble-

mowych i przy większych rozcieńczeniach (1:30) nakropłego na pasek antygeny.

Test gamma interferonowy

Oprócz powszechnie stosowanych testów serologicznych, pewien postęp w rozpoznawaniu paratuberkulozy stanowi zastosowanie testu gamma interferonowego, wykorzystującego zjawisko odporności komórkowej. Pod wpływem inkubacji krwi z dwoma różnymi mitogenami (*M. avium* i *M. bovis*) stymulowane limfocyty T wytwarzają gamma interferon. Pomiar jego poziomu oparty jest na zasadach ELISA. Na podstawie porównania poziomu jego produkcji w czasie obu inkubacji można wnioskować o istnieniu choroby. Limfocyty zwierząt, które zetknęły się z *M. paratuberculosis* będą cechowały się znaczną produkcją gamma interferonu w czasie inkubacji z *M. avium*. W USA produkowane są gotowe zestawy do przeprowadzenia testu. Test ten ma jednak znacznie większe wymagania techniczne niż ELISA i może być przeprowadzany tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach. Znaczenie ma też wysoki koszt jednostkowy próby.

Testy genetyczne

W ostatnich latach ukazało się wiele prac na temat zastosowania testów genetycznych do diagnostyki paratuberkulozy (4, 22, 29, 44, 65). Testy te polegają na znalezieniu w badanym materiale sekwencji kwasu nukleinowego charakterystycznej dla *M. paratuberculosis*. Wyjściowa ilość materiału genetycznego może być niewielka, gdyż uwolniony w trakcie lizy komórki bakteryjnej kwas nukleinowy jest sekwencjonowany a odpowiedni jego fragment jest namnażany do ilości umożliwiającej jego wykrycie. Pewną trudność przy prowadzeniu tego typu badań stanowi duże pokrewieństwo antygenowe *M. paratuberculosis* i *M. avium*. McFadden (36) stwierdził identyczność 98% DNA obu tych drobnoustrojów. Niemniej jednak pewne fragmenty występują tylko u *M. paratuberculosis*. Szereg prac opisuje testy z użyciem różnych sond DNA. Większość używanych obecnie testów genetycznych bazuje na fragmencie IS900 (22, 44, 53, 65). W USA produkowane są też gotowe zestawy diagnostyczne produkcji Idexx Corporation. Próby genetyczne posiadają nieporównywalnie większą swoistość niż próby serologiczne, jednakże ich użycie do wykrywania charakterystycznych fragmentów kwasów nukleinowych w kale obniża znacznie czułość próby. Van der Giessen (65) stwierdził, że test bazujący na fragmencie IS900 pozwala na potwierdzenie choroby przy obecności 10 komórek *M. paratuberculosis* w 1 g kału a czułość próby określił na 3-23%. Testy genetyczne są przydatne głównie do badania prób „czystych” – krwi lub tkanek. Ich użycie u ludzi chorych na chorobę Crohne’a pozwoliło na potwierdzenie udziału *M. paratuberculosis* w wywoływaniu schorzenia (22, 24). Znaczne przyspieszenie w uzyskaniu 100% pewnych wyników potwierdzających paratuberkulozę jest możliwe po zastosowaniu testów genetycznych do prób z wczesnych (1-2 tyg.) hodowli *M. paratuberculosis* na podłożach Herrolda. Wymagania techniczne i duży koszt jednostkowy badania (15-20\$) powoduje, że testy genetyczne w rozpoznawaniu paratuberkulozy była są wykonywane tylko przez niektóre, wyspecjalizowane laboratoria. Należy podkreślić, że swoiste przeciwciała w przebiegu paratuberkulozy była pojawiają się stosunkowo późno, a odpowiedź immunologiczna przed wystąpieniem klinicznych objawów choroby jest zwykle słaba (20). Stąd też wszystkie testy sero-

logiczne stosowane w rozpoznawaniu choroby Johnego mają ograniczoną wartość. Cechuje je znaczna swoistość, jednakże czułość zwiększa się znacznie dopiero po wystąpieniu objawów klinicznych lub wraz z rozpoczęciem siewstwa *M. paratuberculosis* z kałem. W tych przypadkach czułość testów stosowanych od wielu lat (OWD, immunodyfuzja) ogólnie biorąc niewiele ustępuje czułości testów nowoczesnych (ELISA). Wielką zaletą omawianych prób jest ich prostota i krótki czas oczekiwania na wyniki. Stąd też próby te stanowią podstawę programów zwalczania paratuberkulozy bydła (45, 47). Spośród omówionych testów do rozpoznawania i potwierdzania paratuberkulozy, u zwierząt z objawami wskazującymi na istnienie choroby, zalecane są testy immunodyfuzji w żelu agarowym, ELISA oraz genetyczne. Z kolei do rozpoznawania choroby w stadzie najbardziej przydatny jest ELISA, a badaniu poddaje się wszystkie zwierzęta w wieku powyżej 24 miesięcy. Zwalczanie paratuberkulozy nie może jednak opierać się tylko na wynikach testów serologicznych. W ślad za dodatnim wynikiem ELISA zaleca się wykonanie badania hodowlanego. O uwolnieniu stada od choroby możemy mówić po uzyskaniu u wszystkich zwierząt ujemnego wyniku badania hodowlanego z kału i kolejnych 2-3 ujemnych testach ELISA w ciągu 12-18 miesięcy.

Piśmiennictwo

1. Abbas B., Riemann H. P., Lonnerdal B.: Am. J. vet. Res. 44, 2229, 1983.
2. Abbas B., Riemann H. P., Hird D. W.: California Vet. 8, 20, 1983.
3. Abbas B., Riemann H. P.: Comp. Immun. infect. Dis. 11, 171, 1988.
4. Ambrosio R. E., Harris Y., Huchzermeyer H. F. A. K.: Vet. Microbiol. 26, 89, 1991.
5. Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., Frandsen P. L., Jorgensen J. B., Feld N. C., Ahrens M. S.: Am. J. vet. Res. 53, 1386, 1992.
6. Bendixen P. H.: Am. J. vet. Res. 38, 2027, 1977.
7. Benedictus G., Bosma J.: Vet. Qtr. 7, 217, 1985.
8. Benedictus G., Dijkhuizen A. A., Stelwagen J.: Vet. Rec. 121, 142, 1987.
9. Buergelt C. D., Duncan J. R.: J. Am. vet. med. Ass. 173, 478, 1978.
10. Burnside D. M., Rowley B. O.: Am. J. vet. Res. 55, 465, 1994.
11. Chandler R. L.: N. Z. vet. J. 3, 145, 1955.
12. Chiodini R. J., Van Kruiningen H. J., Merkall R. S.: Cornell Vet. 74, 218, 1984.
13. Colgrove G. S., Thoen G. O., Blackburn B. O., Murphy C. D.: Vet. Microbiol. 19, 183, 1989.
14. Collins D. M., Stephens D. M., De Lisle G. W.: Vet. Microbiol. 36, 289, 1993.
15. Collins M. T., Angulo A., Buergelt C. D., Hennager S. G., Hietala S. K., Jacobson R. H., Whipple D. L., Whitlock R. H.: J. vet. Diagn. Invest. 5, 52, 1993.
16. Collins M. T., Stephens D. M., De Lisle G. W.: Vet. Microbiol. 36, 289, 1993.
17. Collins M. T., Sockett D. C., Ridge S., Cox J. C.: J. clin. Microbiol. 29, 272, 1990.
18. Delia S., Vullo V., Mastroianni C. M., Contini C., Massetti A. P., Cignarella L., Sorce F.: J. infect. Dis. 14, 88, 1987.
19. De Lisle G. M., Sequin P., Samagh B. S., Corner A. H., Duncan J. R.: Can. J. comp. Med. 44, 177, 1980.
20. De Lisle G. W., Samagh B. S., Duncan J. R.: Can. J. comp. Med. 44, 183, 1980.
21. De Lisle G. W., Duncan J. R.: Can. J. comp. Med. 45, 304, 1981.
22. DelLisla B., Poyart C., Goulet O., Mougnot J. F., Sadounjourno E., Brousse N., Schmitz J., Ricour C., Berche P.: J. infect. Dis. 169, 449, 1994.
23. Elksen L. A., Nonnecke B. J.: Am. J. vet. Res. 47, 1513, 1986.
24. Fidler H. M., Thurrel W., Johnson N. M., Rook G. A. W., Mc Fadden J. J.: Gut 35, 506, 1994.
25. Goudswaard J., Gilmore N. J. L., Ban Beck J. J.: Vet. Rec. 98, 461, 1976.
26. Hawkes R., Niday E., Gordon J.: Ann. Biochem. 119, 142, 1982.
27. Hilbink F., West D. M., De Lisle G. W., Kittelberger R., Hosie B. D., Hutton J., Cooke M. M., Penrose M.: Vet. Microbiol. 41, 107, 1994.
28. Hole N. H.: Adv. vet. Sci. 4, 341, 1958.
29. Hurley S. S., Splitter G. A., Welch R. A.: J. clin. Microbiol. 27, 1582, 1989.
30. Hutchinson L.: John's manual for veterinarians, University of Pennsylvania Press, 1993, s. 2.
31. Jorgensen J. B., Jensen P. T.: Acta vet. scand. 19, 310, 1979.
32. Karpiński T., Żórawski C.: Biul. Inf. I. Wet., Puławy 1976, s. 16.
33. Larsen A. B.: J. Am. vet. med. Ass. 163, 902, 1973.
34. Larsen A. B., Porter D. A., Vardman T. H.: Am. J. vet. Res. 14, 362, 1953.
35. Larsen A. B., Vardman T. H., Merkall R. S.: Am. J. vet. Res. 24, 948, 1963.
36. Mc Fadden J. J., Butcher P. D., Thompson J., Chiodini R., Hermon-Taylor J.: Mol. Microbiol. 1, 283, 1987.
37. Mc Nabb W. B., Meek A. H., Duncan J. R., Brooks B. W., Van Dreumel A. A., Martin S. W., Nielsen K. H., Sugden E. A., Turcotte C.: Can. J. vet. Res. 55, 252, 1991.
38. Merkall R. S.: J. Am. vet. med. Ass. 184, 939, 1984.
39. Merkall R. S., Kopecky K. E., Larsen A. B., Ness R. D.: Am. J. vet. Res. 31, 475, 1970.
40. Merkall R. S., Larsen A. B., Kopecky K. E., Kluge J. P., Monlux W. S., Lehmann R. P., Quin L. Y.: Am. J. vet. Res. 29, 963, 1968.
41. Milner A. R., Lepper A. W. D., Symonds W. N., Gruner E.: Res. vet. Sci. 42, 140, 1987.
42. Milner A. R., Mack W. N., Coates K. J., Hill J., Gill I., Sheldrik P.: Vet. Microbiol. 25, 193, 1990.
43. Momotani E., Ishikawa Y., Yoshino T.: J. comp. Path. 96, 659, 1985.
44. Moss M. T., Green E. P., Tizard M. L., Malik Z. P., Hermon-Taylor J.: Gut 32, 395, 1991.
45. New York State Three Disease Herd Testing Programs, Cornell University, Univ. Press, 1994.
46. Nguyen H. T., Buergelt C. D.: Am. J. vet. Res. 44, 2173, 1983.
47. OIE Manual: Volume III, 1990, s. 7/16.
48. Pennsylvania Certified Paratuberculosis Test-Negative Herd Program: Northeast Regional John's Meeting, Dubois, 1994.
49. Rankin J. D.: Res. vet. Sci. 2, 89, 1961.
50. Riemann H. P., Babiker A.: Adv. vet. Sci. 27, 481, 1983.
51. Rigdal G.: Nord. vet. Med. 16, 89, 1964.
52. Ris D. R., Hamel K. L., Ayling J. M.: N. Zeland vet. J. 36, 112, 1988.
53. Sanderson J. D., Moss M. T., Tizard M. L. V., Hermon-Taylor J.: Gut 33, 890, 1992.
54. Sanftleben P.: J. Am. vet. med. Ass. 197, 299, 1990.
55. Sherman D. M., Markham R. J. F., Bates F.: J. Am. vet. med. Ass. 185, 179, 1984.
56. Sherman D. M., Bray B., Gay J. M.: Am. J. vet. Res. 50, 525, 1989.
57. Sigurdsson B.: Bact. Rev. 20, 1, 1956.
58. Spangler L., Bech-Nielsen S., Heider L. E.: Acta vet. scand. 84, 243, 1988.
59. Sugden E. A., Brooks B. W., Young N. M., Watson D. C., Nielsen K. H., Corner A. H., Turcotte C., Michaelides A., Steward R. B.: J. clin. Microbiol. 29, 1659, 1991.
60. Sugden E. A., Samagh B. S., Bundle D. R., Duncan J. R.: Infect. Imm. 55, 762, 1987.
61. Sugden E. A., Corner A. H., Samagh B. S., Brooks B. W., Turcotte C., Nielsen K. H., Stewart R. B., Duncan J. R.: Am. J. vet. Res. 50, 850, 1989.
62. Sweeney R., Whitlock R. H.: Bov. Pract. 25, 50, 1990.
63. Thoen C. O., Muscoplat C. C.: J. Am. vet. med. Ass. 174, 838, 1979.
64. Tsai J. S., Hutchinson L. J., Zarkower A.: Can. J. vet. Res. 53, 405, 1989.
65. Van der Giessen J. W. B., Haring R. M., Venclare E., Eger A., Haagsma J., Van der Zeijst B. A. M.: J. clin. Microbiol. 30, 1216, 1992.
66. Whipple D. L., Merkall R. S.: Proc. 89th Ann. Meet. US Animal Health Ass. 475, 1985.
67. Whitlock R. H.: John's manual for veterinarians, University of Pennsylvania Press, 1993, s. 6.
68. Whitlock R. H., Hutchinson L. T., Glickman L. T., Meinersmann R., Rossiter C., Bruce J., Merkall R., Dick J.: Proc. Am. Ass. bov. Pract. 21, 24, 1986.
69. Whitlock R. H., Rosenberger A. E., Sweeney R. W., Hutchinson L. J.: Proc. The Third Int. Coll. Paratub., Orlando 1991, s. 94.
70. Whitlock R. H.: Proc. The Third Int. Coll. Paratub., Orlando 1991, s. 1.
71. Whitlock R. H., Hutchinson L. J., Merkall R. S.: Proc. Ann. Meeting U. S. Animal Health Ass. 89, 984, 1985.
72. Woodruff T. S., Shulaw W. P., Bech-Nielsen S., Hoffsis G. F., Spangler E., Heider L. E.: Am. J. vet. Res. 52, 217, 1991.
73. Yokomizo Y., Merkall R. S., Lyle P. A. S.: Am. J. vet. Res. 44, 2205, 1983.
74. Yokomizo Y., Yugi H., Merkall R. S.: Jap. J. vet. Sci. 47, 111, 1985.

Adres autora: dr Marek Lipiec, ul. Kościuszki 12/20, 24-100 Puławy