

Test immunoperoksydazowy i AC-ELISA w diagnostyce zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza

ZENON MINTA, KATARZYNA DOMAŃSKA-BLICHARZ,
BARBARA BARTNICKA, KRZYSZTOF ŚMIETANKA

Zakład Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Minta Z., Domańska-Blicharz K., Bartnicka B., Śmietanka K.

Applying immunoperoxidase and Antigen-Capture ELISA methods for rapidly diagnosing infectious bursal disease

Summary

The aim of the study was to compare immunoperoxidase (IP) and Antigen-Capture ELISA (AC-ELISA) tests in detecting infectious bursal disease virus (IBDV) in the Fabricius Bursa (BF) of infected chickens. BFs were collected for 3 days p.i. with IBDVs of low pathogenicity (isolated from a mild form of IBD) as well as very virulent ones (isolated from an acute form of IBD) 1, 3, 6 and 9 days p.i. with vaccinal, low pathogenic and very virulent strains. BFs from broiler chickens suspected of having IBD were also used. BFs were cut into frozen histological sections and, after fixing with formaldehyde, were stained using the IP method. The remainder of BFs was used in AC-ELISA after homogenization and clarification. The sensitivity and specificity of both tests in detecting IBDV antigens were comparable but the amount of viral antigen could be determined only by using the AC-ELISA method. The intensity of reaction and the time during which the viral antigen was detected were strongly correlated with the pathogenicity of the IBDV strain being used. Inoculation with the vaccine strain yielded positive results only on day 6 p.i. and the amount of detectable antigen was very low. Infection with the low pathogenic Polish strain produced more antigens, detectable from days 1 to 6 p.i. The antigen of the very virulent strain was found in the largest amount and could be detected for 9 days beginning on day 1 p.i. The study indicated that the IP method is simple, rapid and less laborious than AC-ELISA. However, AC-ELISA is more useful because it additionally measures the amount of detected antigen in a specimen.

Keywords: infectious bursal disease, Antigen-Capture ELISA test

Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza (choroba Gumboro, IBD) jest wysoce zakaźną, wirusową chorobą kurcząt, w której przebiegu dochodzi do uszkodzenia narządów limfoidalnych, w tym szczególnie torby Fabrycjusza (tF). Ekonomiczne znaczenie IBD związane jest ze stratami bezpośrednimi (śmiertelność zależna od zjadliwości wirusa), jak też ze stratami pośrednimi będącymi wynikiem immunosupresji u kurcząt zakażonych we wczesnym okresie życia (nasilenie wtórnych infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych), zmniejszonych przyrostów masy ciała i wzrostu zużycia paszy (4, 16). Choroba Gumboro, po raz pierwszy opisana w USA (7), szybko rozprzestrzeniła się w świecie (4). Do połowy lat 80. izolowano szczepy klasyczne wirusa IBD (IBDV) o słabej zjadliwości, powodujące specyficzne padnięcia do 2%, a od 1984 r. w USA pojawiły się warianty antygenowe klasycznego wirusa IBD wywołujące postać immunosupresyjną podostrą (14), natomiast w Europie od 1987 r. bardzo zjadliwe szczepy (vv) IBDV wywołujące ostrą formę IBD ze śmiertelnością do 60% u kurcząt typu

nieśnego i do 30% u kurcząt brojlerów (3). Podczas 63. Ogólnej Sesji OIE w Paryżu w 1995 r. chorobę IBD uznano za międzynarodowy problem socjoekonomiczny (2).

W Polsce pierwsze przypadki IBD rozpoznano w 1969 r. (5, 17). Choroba szybko rozprzestrzeniła się w kraju, powodując znaczne straty w produkcji kurcząt brojlerów, przy czym izolowane szczepy cechowała niska zjadliwość i silny efekt immunosupresji (18-20). Ostra postać choroby Gumboro występuje od 1991 r., a wywołujące ją szczepy vvIBDV powodują śmiertelność do 100% u kurcząt SPF (22).

Diagnostyka wirusologiczna IBD opiera się na izolacji wirusa względnie wykrywaniu antygenów wirusowego lub genomu IBDV (16, 25). Najlepszym źródłem wirusa jest torba Fabrycjusza ptaków w ostrej fazie choroby. Ze względu na czaso- i pracochłonność izolacji wirusa na zarodkach lub hodowlach komórkowych w rutynowej diagnostyce większe znaczenie mają szybkie metody bezpośredniego wykrywania antygenów IBDV w tF, jak test precypitacji w żelu agarowym

(AGID), test immunofluorescencji (IF), test immunoperoxydazowy (IP) oraz AC-ELISA (Antigen Capture-ELISA) (16, 25).

Celem badań było określenie przydatności testów IP i AC-ELISA do szybkiej diagnostyki zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza.

Material i metody

Szczepki wirusowe. W badaniach użyto szczepów IBDV: szczepionkowego 228E (słabo atenuowany), klasycznego zjadliwego Faragher 52/70 (F52/70) oraz krajowych – 78/GSi i 80/GA (wyizolowane od kurcząt brojlerów w 1980 z przypadków choroby Gumboro o łagodnym, subklinicznym przebiegu), 91/272, 93/35 (wyizolowane w latach 1991-2000 z przypadków ostrej formy IBD) i 00/28, 00/41, 01/53, 01/75, 01/85 (wyizolowane w latach 2000-2001 z przypadków podejrzenia IBD).

Material wirusowy. a) Wybranymi IBDV: 80/GA, 91/272 i 93/35 inokulowano grupy po 4-5 kurcząt SPF w wieku 4-6 tygodni. Materiały wirusowe w postaci homogenatu torby Fabrycjusza (tF) w rozcieńczeniu 1 : 10 podawano dospojówkowo. Z pobranych 3 dni *p.i.* tF część przeznaczano do przygotowania mrożonych skrawków histologicznych do badania testem IP (po szybkim zamrożeniu w oziębionym izopentanie tF cięto w kriostacie na 5 μ skrawki, które umieszczano na szkiełku podstawowym, suszono, a następnie utrwalano 10% roztworem formaliny), a pozostałą część do testu AC-ELISA (50% homogenat w PBS zmieszany z freonem 1 : 1 (v/v), wirowany przez 15 minut przy 3000 \times g). Podobnie przygotowano material kontrolny z tF kurcząt SPF nie zakażonych (kontrola negatywna). b) Trzy grupy kurcząt SPF w wieku 4 tyg. inokulowano dospojówkowo szczepami IBDV o różnej patogenności: szczepionkowym 228E (1 dawka/ptaka) lub izolatami krajowymi 78/GSi i 00/40 (homogenat tF w rozc. 1 : 10). W 1., 3., 6. i 9. dniu *p.i.* po 2 ptaki z grup zakażonych i po 1 ptaku z grupy kontrolnej (kurczęta SPF z tego samego wylęgu) usypiano i pobierano tF, które zamrażano, a następnie przygotowywano z nich mrożone skrawki histologiczne do testu IP oraz homogenaty do testu AC-ELISA w sposób podany w części a.

Surowica. Surowicę dodatnią (S⁺IBD) uzyskano przez zakażenie kurcząt SPF dwukrotnie donosowo i dospojówkowo szczepem F52/70. Surowicę ujemną (S-IBD) otrzymano od kurcząt SPF.

Wysiłek otrzewnowy. Dodatni wysiłek otrzewnowy (W⁺IBD) uzyskano od myszy Balb/C, którym podawano dootrzewnowo oczyszczony wirus F52/70, a następnie komórki szpiczaka SP₂O w ilości po 10⁶ komórek/szt. Ujemny wysiłek otrzewnowy (W-IBD) pochodził od myszy Balb/C, którym podano dootrzewnowo same komórki szpiczaka.

Test IP. Przeprowadzono wg metodyki podanej przez Kurstaka (15), w skrócie w następujący sposób: na utrwalone preparaty nanoszono 0,5% H₂O₂ celem usunięcia endogennej peroksydazy. Następnie nakładano na nie surowice S⁺ F52/70 IBD lub S- IBD rozcieńczone 1/50 i 1/100 w PBS i inkubowano w wilgotnej komorze przez 30 min. w temp. 37°C. Po trzykrotnym płukaniu w buforze do płukania (PBS+Tween20, PBST) i jednokrotnie w wodzie des-

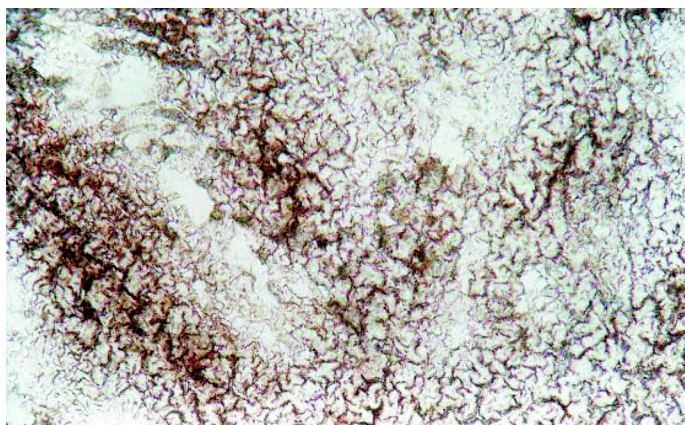
tylowanej preparaty odsączano delikatnie i pokrywano koniugatem (królicze przeciwciała anty IgG kury znakowane peroksydazą chrzanową) rozcieńczonym w PBS. Inkubację prowadzono w wilgotnej komorze przez 60 min. w temp. 37°C, po czym płukano dwukrotnie buforem do płukania, jednokrotnie PBS i ponownie odsączano. Do tak przygotowanych preparatów dodawano roztwór substratu AEC (3-amino 9-ethylcarbazolet) i po 5-15 min. inkubacji w temp. 37°C oraz krótkim płukaniu w bieżącej wodzie celem usunięcia nadmiaru substratu preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym.

Test AC-ELISA. Test AC-ELISA wykonywano wg metodyki Etteradossi i wsp. (10) w sposób następujący (skrótowo): na płytkę 96-dołkową nanoszono kurzą surowicę S⁺IBD rozcieńczoną w PBS (100 μ l/dołek). Po 1 godz. inkubacji w 37°C w komorze wilgotnej baseniki opróżniano, trzykrotnie przemywano buforem do płukania (PBST), a następnie nanoszono po 200 μ l buforu do blokowania (PBST + 10% surowicy płodu cielęcego + 2% mleka odłuszczonego) i inkubowano przez całą noc w temp. 37°C w komorze wilgotnej, ponownie przemywano trzykrotnie PBST i nanoszono po 100 μ l/dołek kolejne, dwukrotne rozcieńczenia przygotowanych uprzednio homogenatów tF. Po 1 godz. inkubacji w 37°C w komorze wilgotnej material wirusowy ostrożnie usunięto, dołki trzykrotnie płukano i po naniesieniu po 100 μ l W⁺IBD ponownie inkubowano w 37°C przez 1 godz. W kolejnym etapie dodano 50 μ l koniugatu (królicze przeciwciała anty IgG myszy znakowane fosfatazą alkaliczną), a na koniec substrat pNPP.

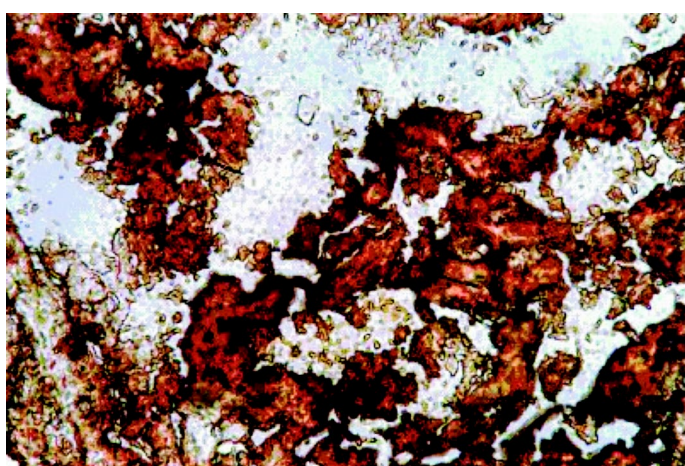
Wyniki i omówienie

Wyniki testu IP odczytywano przy użyciu mikroskopu odwróconego Telaval 3 (Carl Zeiss Jena), natomiast testu AC-ELISA w czytniku Spectra Shell (SLT-Labinstrument GmbH). Dodatkim wynikiem testu IP była obecność ciemnobrazowych ziarnistości (kompleks antygen-przeciwciała) w mrożonych skrawkach histologicznych tF kurcząt zakażonych świadcząca o obecności antygeny IBDV (ryc. 2); nie stwierdzano ich w tF od kurcząt SPF (ryc. 1). Intensywność reakcji barwnej oznaczano przyjmując zakres: + (reakcja barwna w < 25% powierzchni pola widzenia pod mikroskopem), ++ (25-50%), +++ (50-75%) i ++++ (> 75%). Wyniki testu AC-ELISA wyrażono wartością OD, przyjmując za dodatnie OD \geq 0,3. W celu porównania rezultatów uzyskanych w obu testach do określenia wyników testu AC-ELISA przyjęto następujące kryteria oceny: – przy OD < 0,3; + przy OD 0,3-1,0; ++ przy OD 1,1-1,9; +++ przy OD 2,0-2,8 oraz ++++ przy OD > 2,8.

Przeprowadzone wstępne badania optymalizacji testu IP pozwoliły ustalić robocze rozcieńczenia surowicy dodatniej i ujemnej, które wynosiło 1/50 oraz rozcieńczenie koniugatu 1/100. Przy tych rozcieńczeniach nie obserwowano reakcji barwnej w preparatach z torby Fabrycjusza kurcząt zakażonych traktowanych surowicą kurcząt SPF (S-IBD), jak też w preparatach z tF kurcząt kontrolnych (nie zakażonych) traktowanych surowicą dodatnią S⁺IBD. Reakcja barwna ko-



Ryc. 1. Preparat kontrolny. Barwiony metodą IP skrawek histologiczny torby Fabrycjusza ptaka nie zakażonego (brak barwnych złożeń)



Ryc. 2. Barwiony metodą IP skrawek histologiczny torby Fabrycjusza ptaka zakażonego szczepem vvIBDV z widocznymi barwnymi złożami (kompleks antygen–przeciwciało)

mórek zakażonych w teście IP była bezpośrednim wskaźnikiem obecności w nich antygenów wirusa IBDV.

Metodę AC-ELISA wdrażano w oparciu o procedurę stosowaną w laboratorium referencyjnym OIE/UE diagnostyki choroby Gumboro w AFSSA Ploufragan, Francja. Przed przystąpieniem do badań przeprowadzono optymalizację testu AC-ELISA, która obejmowała kalibrację poliklonalnej surowicy kurzej (S⁺IBD) przewidzianej do opłaszczania płytek oraz ustalenie warunków wykrywania antygenów IBDV. Wyniki kalibracji surowicy dodatkowo wskazały, że optymalnym jej rozcieńczeniem do opłaszczania płytek jest rozcieńczenie 1/40 000. Z kolei wyniki optymalizacji warunków detekcji wykazały, że wysięk otrzewnowy myszy W⁺IBD użyty w rozcieńczeniu 1/100 dawał zbyt wysokie tło, którego przyczyną były dodatkowe zanieczyszczenia immunoglobulinami dla białka kurzego. W celu uzyskania czystych mysich przeciwciał poliklonalnych z wysięku otrzewnowego zastosowano specjalną procedurę oczyszczania (13). W rezultacie otrzymano wysięk o wyraźnie mniejszej zawar-

tości immunoglobulin przeciwko białku kurczemu, co pozwoliło na stosowanie większych rozcieńczeń tego immunoreagentu (1/400). Optymalnym rozcieńczeniem użytego koniugatu anty IgG myszy znakowanego fosfatazą alkaliczną było rozcieńczenie 1/1600.

Wyniki testu IP i AC-ELISA do wykrywania antygenów IBDV w tF kurcząt SPF pobranych 3 dni *p.i.* krajowymi izolatami IBDV o różnej zjadliwości oraz w materiale diagnostycznym z lat 2000-2001 pochodzącym z ferm kurcząt brojlerów z podejrzeniem choroby Gumboro przedstawiono w tab. 1. We wszystkich badanych materiałach zarówno od kurcząt SPF zakażonych trzema krajowymi izolatami 80/GA (słabo zjadliwy) oraz 91/272 i 93/35 (wysoce zjadliwe), jak i kurcząt brojlerów pochodzących z pięciu stad, gdzie wystąpiły zachorowania wskazujące na chorobę Gumboro (przełamania poszczepienne), wykrywano antygeny IBDV w obu testach. Czulość i specyficzność obu metod wyrażona wykrywalnością antygenów IBDV i intensywnością reakcji barwnej była porównywalna, przy czym metoda AC-ELISA umożliwiała dodatkowo ilościowe oznaczenie antygenów.

Wyniki porównawczego wykrywania antygenów IBDV w tF kurcząt SPF w różnym czasie *p.i.* szczepami o zróżnicowanej zjadliwości (szczepionkowy 228E, słabo zjadliwy 78/GSi i wysoce zjadliwy 00/40) przy użyciu testów IP i AC-ELISA przedstawiono w tab. 2. Obie metody immunoenzymatyczne pozwalały na

Tab. 1. Porównanie wyników testu IP oraz AC-ELISA zastosowanych do wykrywania antygenów IBDV w torbach Fabrycjusza kurcząt SPF 3 dni *p.i.* krajowymi izolatami IBDV oraz kurcząt brojlerów z podejrzeniem choroby Gumboro

Torba Fabrycjusza	IBDV	IP	AC-ELISA (OD)
Kurczęta SPF	80/GA	++	+++ (2,74)
	91/272	+++	+++ (2,58)
	93/35	+++	+++ (2,58)
Kurczęta brojlery (podejrzenie IBD)	00/28	++	+ (0,76)
	00/41	+++	++++ (3,38)
	01/53	+++	+++ (2,69)
	01/75	++++	++++ (3,08)
	01/85	++++	++++ (3,31)

Tab. 2. Wykrywanie antygenów IBDV w tF kurcząt w różnym czasie *p.i.* szczepami o różnej zjadliwości przy użyciu testu IP oraz AC-ELISA

Dzień <i>p.i.</i>	IBDV					
	228E		78/GSi		00/40	
	IP	AC-ELISA (OD)	IP	AC-ELISA (OD)	IP	AC-ELISA (OD)
1	-	- (0,116)	+	++ (1,588)	+	++ (1,155)
3	-	- (0,265)	++	+++ (2,703)	+++	+++ (2,574)
6	++	+++ (2,483)	+	+ (0,510)	++++	++++ (2,907)
9	-	- (0,157)	-	- (0,098)	+	+ (0,341)

wykrywanie antygenów IBDV w tF w tym samym czasie *p.i.* poszczególnymi szczepami IBDV, przy nieco wyższej czułości testu AC-ELISA (wyższe oceny w przyjętej skali interpretacji wyników). Natomiast wyraźne różnice były w czasie, jak też ilości wykrywanego antygeny w zależności od patogenności szczepu IBDV. Szczep szczepionkowy 228E wykrywano tylko w 6 dniu *p.i.*, szczep słabo patogenny 78/GSi od 1 do 6 dnia *p.i.*, przy czym najwięcej antygeny zarówno w skrawkach mrożonych tF, jak i w homogenatach tF stwierdzano w 3 dniu *p.i.*, natomiast antygen szczepu zjadliwego 00/40 wykrywano przy użyciu obu metod we wszystkich terminach badania (1-9 dzień *p.i.*), przy czym najwięcej antygeny wykrywano w 6. dniu *p.i.*

Metody immunoenzymatyczne, zarówno IP, jak i AC-ELISA zostały z powodzeniem zastosowane w diagnostyce i badaniach epidemiologicznych IBD (6, 8, 11, 26). Również w kraju podejmowano pierwsze próby ich stosowania (9, 21). Obie metody immunoenzymatyczne w porównaniu z konwencjonalnymi metodami izolacji są szybsze, prostsze i tańsze oraz umożliwiają badanie dużej ilości próbek (24), a w porównaniu z AGID i IF są czulsze (1, 23).

W badaniach własnych, zarówno IP, jak i AC-ELISA dawały zbliżone wyniki. Stwierdzane różnice w intensywności reakcji barwnej w obu testach wynikały ze zjadliwości użytych wirusów. Cruz-Coy i wsp. (8) i Etteradossi i wsp. (12) donoszą, że szczepy szczepionkowe w mniejszym stopniu replikują się w zakażonych tkankach niż wirusy vvIBD. Według Van den Berga (3), pojedyncza cząsteczka wirusa klasycznego zjadliwego F52/70 powoduje wzrost miana o 10^2 - 10^3 EID₅₀, natomiast vvIBDV o 10^4 - 10^5 EID₅₀. Wprawdzie test IP jest metodą prostszą i mniej pracochłonną, to jednak test AC-ELISA wydaje się bardziej przydatny, gdyż umożliwia obiektywne ilościowe oznaczanie antygeny IBDV w tF (intensywność reakcji barwnej mierzona jest wartością OD w czytniku ELISA). Ponadto użycie w teście AC-ELISA panelu przeciwciał monoklonalnych umożliwia dodatkowo charakterystykę antygenową izolatów IBDV (9-11, 14, 26).

Reasumując, przeprowadzone badania potwierdzają przydatność zarówno testu IP, jak i AC-ELISA do szybkiej diagnostyki IBD opartej na wykrywaniu antygeny wirusowego w torbie Fabrycjusza zakażonych ptaków, przy czym test AC-ELISA dodatkowo umożliwia antygenową charakterystykę IBDV, co ma istotne znaczenie w badaniach epidemiologicznych i immunoprofilaktyce choroby Gumboro.

Piśmiennictwo

1. Abbas F., Andreasen J. R.: Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* 1996, 40, 290-295.
2. Anon.: OIE Resolution No. XVIII. Progress in the diagnosis and control of serious poultry disease: salmonellosis and Gumboro disease. *Bull. OIE.* 1995, 107, 363-364.
3. Berg T. P. Van den: Acute infectious bursal disease of chicken. A review. *Avian Pathol.* 2000, 29, 175-194.

4. Berg T. P. Van den, Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G.: Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease): *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2000, 19, 527-543.
5. Borzemska W., Golnik W.: Przypadek choroby Gumboro (Bursitis infectiosa) rozpoznany w Polsce. *Medycyna Wet.* 1969, 25, 644-645.
6. Cho B. R., Snyder D. B. Lana D. P., Marquard W. W.: An immunoperoxidase monoclonal antibody stain of rapid diagnosis of infectious bursal disease. *Avian Dis.* 1987, 31, 538-545.
7. Cosgrove A. S.: An apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Dis.* 1962, 6, 385-389.
8. Cruz-Coy J. S., Giambone J. J., Hoerr F. J.: Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody. *Avian Dis.* 1993, 37, 577-581.
9. Domanska K., Rivallan G., Smetanka K., Toquin D., Minta Z., Etteradossi N.: Antigenic characterization of Polish Infectious Bursal Disease Virus strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002, 46, 45-52.
10. Etteradossi N., Toquin D., Rivallan G., Guittet M.: Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 1997, 142, 255-270.
11. Etteradossi N., Arnaud C., Tekcia F., Toquin D., Le Coq H., Rivallan G., Guittet M., Domenech J., van den Berg T. P., Skinner M. A.: Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West-African isolate. *Avian Pathol.* 1999, 28, 36-46.
12. Etteradossi N., Toquin D., Rivallan G., Guittet M.: Tools for detecting and characterising IBDV strains. *World Poultry*, October 2001, Gumboro Special 2, s. 10-11.
13. Harlow E., Lane D.: Using antibody – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999, s. 437.
14. Jackwood D. J., Saif Y. M.: Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 1987, 31, 766-770.
15. Kurstak E., Marusyk R., Salmi A., Babisk L., Kurstak C., Van Regenmortel M.: Detection of viral antigens and antibodies. *Enzyme immunoassays. Sub-Cellular Biochem.* 1989, 15, 1-37.
16. Lukert P. D., Saif Y. M.: Infectious bursal disease, [w:] *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa 2003, s. 161-179.
17. Mazurkiewicz M., Wachnik Z.: Zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza u kurcząt. *Medycyna Wet.* 1970, 26, 165-168.
18. Minta Z., Karczewski W.: Properties of indigenous strains of infectious bursal disease virus. I. Identification of isolates. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1985-1986, 28-29, 64-67.
19. Minta Z., Roszkowski J., Karczewski W., Kozaczyński W.: Properties of indigenous strains of infectious bursal disease virus. II. Pathogenicity. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1985-1986, 28-29, 67-73.
20. Minta Z., Roszkowski J., Karczewski W.: Properties of indigenous strains of infectious bursal disease virus. III. Immunosuppressive effect. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1985-1986, 28-29, 73-76.
21. Minta Z., Coudert F., Karpińska E., Karczewski W.: Wykrywanie wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza w hodowli komórkowej i tkankach zakażonych kurcząt metodą immunofluorescencji i immunoperoxydazową. *Mat. VIII Kongresu PTNW, Warszawa* 1987, s. 229.
22. Minta Z., Daniel A.: Infectious bursal disease in Poland: current situation and vaccinal control. *Mat.: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anaemia, Rauschholzhausen, Germany* 21-24 June 1994, s. 208-214.
23. Naqi S. A.: A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.* 1990, 34, 893-898.
24. Naqi S. A., Karaca K., Barman B.: A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathol.* 1993, 22, 555-564.
25. Rosenberger J. K., Saif Y. M., Jackwood D. J.: Infectious bursal disease, [w:] *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Univ. Pennsylvania, New Bolton 1998, 215-218.
26. Snyder D. B., Lana D. P., Cho B. R., Marquardt W. W.: Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 1988, 32, 527-534.

Adres autora: doc. dr hab. Zenon Minta, ul. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy; e-mail: zminta@piwet.pulawy.pl