

Przeciwciała dla *Salmonella enteritidis* w surowicy, żółtku i tkance mięśniowej ptaków wykrywane metodą ELISA*)

JERZY RZEDZICKI, JÓZEF PILASZEK*, STANISŁAW TOKARZEWSKI, KRZYSZTOF SZULOWSKI*, WOJCIECH IWANIAK*

Katedra Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
*Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rzedzicki J., Pilaszek J., Tokarzowski S., Szulowski K., Iwaniak W.

Antibodies to *Salmonella enteritidis* in serum, egg yolk and muscles from poultry detected by ELISA

Summary

Indirect ELISA is being used increasingly more often in serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* in poultry. Tests are conducted on sera as well as to detect anti-*S. enteritidis* antibodies in egg yolk and in muscles. The aim of this study was to assess the usefulness of an ELISA kit produced in the authors' laboratory in detecting anti-*S. enteritidis* antibodies in sera, egg yolk and muscles from poultry. The lipopolisaccharide (LPS) antigen obtained from the *S. enteritidis* phage type 1 strain was used in the kit as well as anti-chicken IgG conjugated to horseradish peroxidase and ABTS which was used as the substrate. Sera, egg yolk and meat juice were tested in a flock of hens suspected to be infected by *Salmonella*. The results obtained showed that some egg yolk and meat juice samples had low values of absorbency in ELISA, whereas others had high values. A high degree of correlation was obtained between the results of the tests carried out on egg yolk, meat juice and sera. The results of the investigations indicate that the above devised ELISA test based on LPS was useful for testing sera, egg yolk and muscles from poultry for the presence of anti-*S. enteritidis* antibodies.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, chicken, egg yolk antibodies, ELISA.

W ostatnich latach, w wielu krajach odnotowuje się znaczny wzrost liczby zakażeń i zatruc pokarmowych wywołanych przez pałeczki *Salmonella*. W Polsce bakterie te w latach 1993-1994 były przyczyną 92,5% zatruc pokarmowych u ludzi (16). Główną odpowiedzialność za większość przypadków salmonelozy ponosi *S. enteritidis*, która jest obecnie najczęściej izolowanym serotypem pałeczek *Salmonella* u ludzi (6, 12, 17, 20, 21). Główne źródło rozprzestrzeniania *S. enteritidis* stanowią ptaki, a w szczególności mięso drobiowe i jego przetwory oraz jaja i przetwory jajczarskie. W tej sytuacji konieczne jest jak największe ograniczenie zakażeń drobiu tymi drobnoustrojami.

Do identyfikacji nosicieli pałeczek *Salmonella* w stadach ptaków znalazła zastosowanie immunoenzymatyczna technika ELISA (1, 2, 8, 10, 12, 13, 15, 21, 22, 25). Jest to bardzo czuła metoda pozwalająca na jakościowe i ilościowe oznaczanie antygenów lub przeciwciał w materiale biologicznym. W diagnostyce chorób drobiu stosuje się głównie pośrednią metodę ELISA z użyciem znakowanych antyglobulin do wykrywania przeciwciał. Pozwala ona na wykrywanie obec-

ności przeciwciał zarówno dla urzęsionych pałeczek *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*), jak i nieurzęsionych (*S. gallinarum*, *S. pullorum*) (1, 6, 10, 15, 21, 22).

W technice ELISA, w celu wykrycia nosicieli *S. enteritidis* i *S. typhimurium*, wykorzystuje się różne antygeny, między innymi, organelle zewnątrzkomórkowe, takie jak rzęski oraz fimbrie (SEF 14), a także białka błony zewnętrznej oraz lipopolisacharydy (1, 3, 6, 7, 15, 17, 24-27). Spośród tych antygenów najczęściej stosowany jest antygen lipopolisacharydowy. Zapewnia on dobrą czułość testu, ale przy jego użyciu możliwe jest powstawanie reakcji krzyżowych pomiędzy serotypami grup B i D (1, 3, 14, 20, 22). Jest to związane z obecnością antygeny somatycznego O = 12. Metodą immunoblottingu stwierdzono, że antygen ten jest dominującym epitopem *S. enteritidis* i innych serotypów pałeczek *Salmonella* (6).

U drobiu technika ELISA znalazła zastosowanie do badania obecności przeciwciał w surowicy oraz żółtku. Szczególnie w ostatnim okresie wielu autorów podkreśla możliwość wykorzystania przeciwciał żółtkowych w diagnostyce serologicznej. Czynniki przemawiającymi za określaniem poziomu przeciw-

*) Badania częściowo finansowane przez KBN

ciał w żółtkach jaj jest łatwość ich pozyskania i nieograniczony dostęp do materiału oraz brak wywołania stresu u ptaków, co ma miejsce przy pobieraniu krwi (9, 11-13, 18, 21, 24). Elementem utrudniającym wykonanie badania testem ELISA jest konieczność oczyszczenia żółtka.

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności przygotowanego we własnym zakresie testu ELISA do wykrywania przeciwciał anti-*Salmonella enteritidis* w surowicy, żółtku i tkance mięśniowej ptaków. Do stwierdzenia obecności przeciwciał anti-*S. enteritidis* wykorzystano sok uzyskany z tkanki mięśniowej ptaków. Wzorem do zastosowania tego materiału były badania stad świń prowadzone w Danii, w których dla określenia kontaktu zwierząt z drobnoustrojami *Salmonella* badano poziom przeciwciał w soku mięsny (5, 19).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na:

- surowicy, żółtku jaj i soku z tkanki mięśniowej pochodzących od kur rasy Isa Brown, w wieku ok. 20 miesięcy, ze stada ptaków reagujących pozytywnie w aglutynacji płytowej przy użyciu Pullognostu – do badań użyto po 30 prób każdego materiału. W badaniu bakteriologicznym prób kału i żółtek jaj pobranych od tego stada nie wyizolowano pałeczek *Salmonella*,

- surowicy, żółtku jaj i soku z tkanki mięśniowej pochodzących od kur rasy Isa Brown, w wieku ok. 12 miesięcy, ze stada uznanego za wolne od zakażenia pałeczkami *Salmonella* – do badań użyto po 10 prób każdego materiału; badanie serologiczne przy użyciu Pullognostu od ptaków z tego stada nie wykazało wyników pozytywnych. Negatywne wyniki dało również badanie bakteriologiczne,

- surowicy i soku mięśniowym pochodzących od brojlerów ras Lohman i Arbor Acres, w wieku od 6 do 8,5 tygodnia z 20 stad – do badań użyto po 23 próby z każdego stada.

Próby krwi oraz tkanki mięśniowej pobierano losowo w zakładach drobiarskich. Zastosowano następujące metody:

1. Test ELISA

Szczep bakteryjny. Do otrzymania wyciągu lipopolisacharydowego (LPS) użyto szczep terenowy *S. enteritidis*, typ fagowy 1 (określony przez Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni). W celu namnożenia bakterie z agaru skośnego przenoszono do 10 ml bulionu odżywczego Oxoid CM 67. Następnie hodowlę inkubowano przez 24 godziny w 37°C w termostacie-wytrząsarce (100 wstrząśnięć/min.). Otrzymywano zawiesinę bakterii w koncentracji ok. 10⁹ CFU/ml. 10 ml tak otrzymanej zawiesiny przenoszono do 1 l podłoża TSB (Sigma, USA), po czym inkubowano 12 godzin w 37°C.

Otrzymywanie LPS. Antygen lipopolisacharydowy przygotowano w oparciu o metodę Hassana i wsp. (15).

Przygotowanie materiału do badań. Żółtko przygotowano w oparciu o metodę Bollen i wsp. (4). Uzyskany supernatant używano do badań w teście ELISA w rozcieńczeniu 1:10. Sok mięsny przygotowano do badań poprzez zamrożenie prób tkanki mięśniowej (mięśnie udowe lub piersio-

we), a następnie poprzez rozmrożenie w temperaturze pokojowej. Wyciekający sok zbierano i używano do testu ELISA w rozcieńczeniu 1:10. Surowice w teście ELISA badano w rozcieńczeniu 1:100.

Wykonanie testu ELISA. Do badania użyto mikroplitek PolySorp Nunc (Dania). Baseniki opłaszczano preparatem LPS, stosując jego roztwór w buforze węglanowym o pH 9,6 w stosunku 0,9 µg/ml. Opłaszczanie wykonywano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Po tym czasie płytki płukano w PBST (PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20). Następnie dodawano badany materiał w ilości 100 µl/basenik, w podwójnej liczbie baseników. Na każdej płytce umieszczano jako kontrolę, surowicę dodatnią (S+) pochodzącą od kury zakażonej pałeczkami *Salmonella*, dla której wartość ekstynkcji (OD) w ELISA pokrywa się z OD surowicy kontrolnej zawartej w zestawie komercyjnym do badania surowic kur na obecność przeciwciał anti-*S. enteritidis* firmy Bommeli oraz surowicę ujemną (S-). Po 60 min. inkubacji pod przykryciem, w temperaturze pokojowej płytkę 3-krotnie płukano w PBST, używając do tego płuczki automatycznej (Labsystems Multiwash, Finlandia). Kolejno dodawano do każdego basenika koniugat przeciwciał przeciw immunoglobulinom kurzym klasy IgG (Jackson ImmunoResearch, USA) w rozcieńczeniu roboczym 1:5000, w ilości 100 µl/basenik, po czym inkubowano 60 min., pod przykryciem w temperaturze pokojowej. Następnie płukano mikroplityki jak poprzednio, a potem dodawano substrat enzymatyczny ABTS (Sigma, USA) z H₂O₂ w ilości 100 µl/basenik. Wyniki odczytywano w czytniku do mikroplitek (Multiskan Multisoft, Labsystems), przy długości fali 405 nm, w chwili, gdy wartość OD kontroli S+ przekraczała 0,400. W celu klasyfikacji prób na dodatnie, wątpliwe i ujemne zastosowano następujące kryteria:

– obliczono współczynnik S/P = $\frac{OD_{\text{badanc}} - OD_{S-}}{OD_{S+} - OD_{S-}} \times 100\%$

– próby surowic i soku mięsnego o wartości S/P < 25% traktowano jako ujemne, S/P 25-35% jako wątpliwe i S/P > 35% jako dodatnie.

2. Badanie serologiczne

Odczyn aglutynacji płytowej ze świeżą kroplą krwi (i/lub surowicy) wykonano z użyciem 3 różnych antygenów – Pullognostu, Typhignostu M i wykonanego we własnym zakresie Enterognostu. Ten ostatni antygen przygotowano w oparciu o metodę Charta i wsp. (6).

3. Badanie bakteriologiczne

Do badania używano 1-2 gramowych prób kału. W celu przednamnożenia umieszczano je w 10 ml podłoża TSB (Sigma, USA) i inkubowano przez okres 12 godzin. Następnie pobierano 1 ml płynu i przenoszono do 10-15 ml podłoża SF, po czym inkubowano przez okres od 12 do 24 godzin w temp. 35°C. Kolejno 2 krople hodowli przenoszono na podłoże SS i inkubowano przez 12 godzin w 37°C. Namnożone bakterie przenoszono na podłoże McConkeya i inkubowano przez okres 12 godzin w 37°C. Identyfikację przeprowadzano przy użyciu testu API 20E. Stwierdzono obecność następujących gatunków bakterii: *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*. Obecności pałeczek *Salmonella* nie stwierdzono.

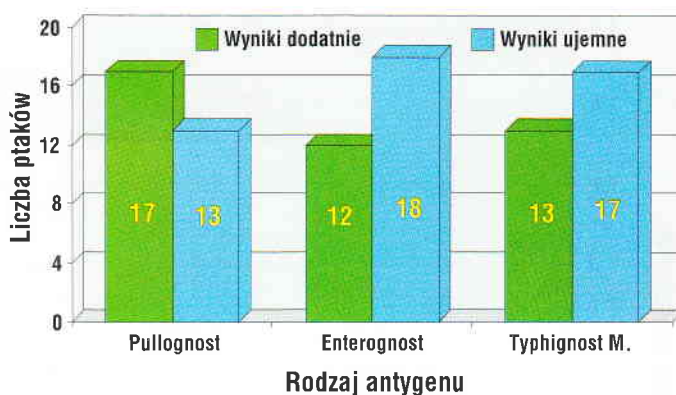
Żółtka jaj posiewano na podłoże SS. Obecności bakterii nie stwierdzono.

Wyniki i omówienie

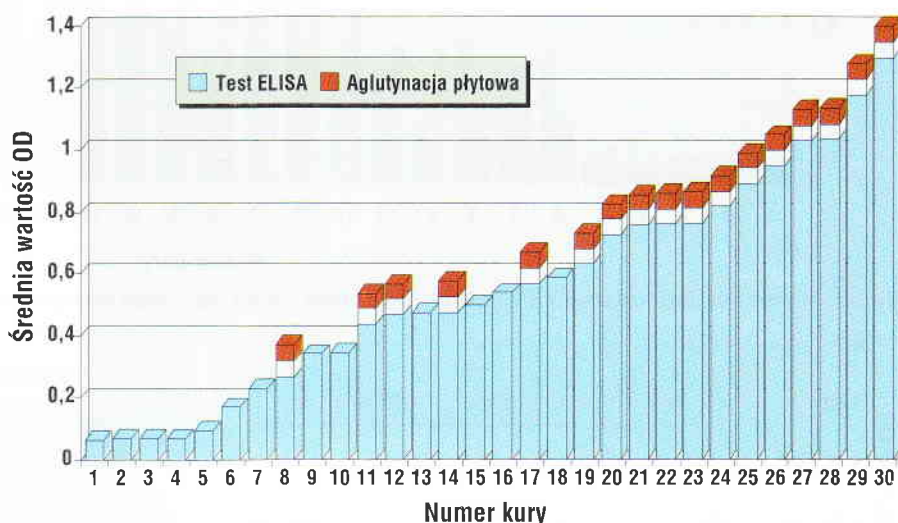
Możliwość skutecznego i szybkiego wykrywania zarówno swoistych przeciwciał jak i antygenów pozwala w krótkim czasie na ocenę stanu immunologicznego ptaków w stadzie. Dzięki zastosowaniu badań serologicznych, w tym techniki ELISA oraz wykorzystaniu różnego rodzaju materiału pochodzącego od ptaków znacznie ułatwione jest podjęcie właściwej decyzji diagnostycznej.

W przeprowadzonych doświadczeniach w pierwszym etapie przebadano materiał pochodzący od 30 kur ze stada podejrzanego o zakażenie. W odczynie aglutynacji płytowej ze świeżą kroplą krwi wykorzystano 3 różne antygeny. Stosując Pullognost uzyskano 17 wyników dodatnich, stosując Enterognost takich wyników uzyskano 12 i stosując Typhignost M uzyskano 13 wyników dodatnich (ryc. 1). Zbliżone rezultaty przy użyciu różnych antygenów uzyskali Chart i wsp. (6) w odczynie aglutynacji płytowej. Wykorzystali oni 2 antygeny, tj. Pullognost i wykonany we własnym zakresie Enterognost. Spośród przebadanych ptaków większość reagujących dodatnio przy użyciu Pullognostu, reagowała także dodatnio przy użyciu Enterognostu. Wyniki te są związane z występującym pokrewieństwem antygenowym salmoneli między serotypami grup B i D (1, 3, 14, 20, 22). Pokrewieństwo to jest warunkowane wspólnym antygenem somatycznym O = 12 dla takich serotypów jak: *S. enteritidis* (O: 1, 9, 12; H: g, m), *S. typhimurium* (O: 1, 4, 5, 12; H: i, 1, 2) i *S. pullorum* (O: 9, 12).

Z kolei badając surowice od tych samych kur testem ELISA (ryc. 2), w 24 przypadkach stwierdzono znacznie podwyższone średnie wartości OD, co stanowiło 80% badanych ptaków (surowice od nr 7 do nr 30, których średnia wartość OD przekraczała 0,200). Spośród surowic o podwyższonej średniej wartości OD w teście ELISA, 17 z nich reagowało dodatnio w aglutynacji płytowej przy użyciu Pullognostu, co stanowiło 57% badanej grupy. Te wyniki znajdują potwierdzenie w pracach różnych autorów. Nicholas i wsp. (21) wykazali, że w stadzie, w którym izolowano od ptaków pałeczki *S. enteritidis* 75% przebadanych próbek surowic miało podwyższony poziom przeciwciał anti-*S. enteritidis* określony przy użyciu LPS-ELISA. Natomiast w wykonanej aglutynacji płytowej 37% próbek surowic dawało wynik dodatni przy użyciu Pullognostu. Zbliżone wyniki uzyskali Furrer i wsp. (10). Autorzy ci w stadzie badanym w kierunku *S. enteritidis* stwierdzili 62% wyników dodatnich przy zastosowa-



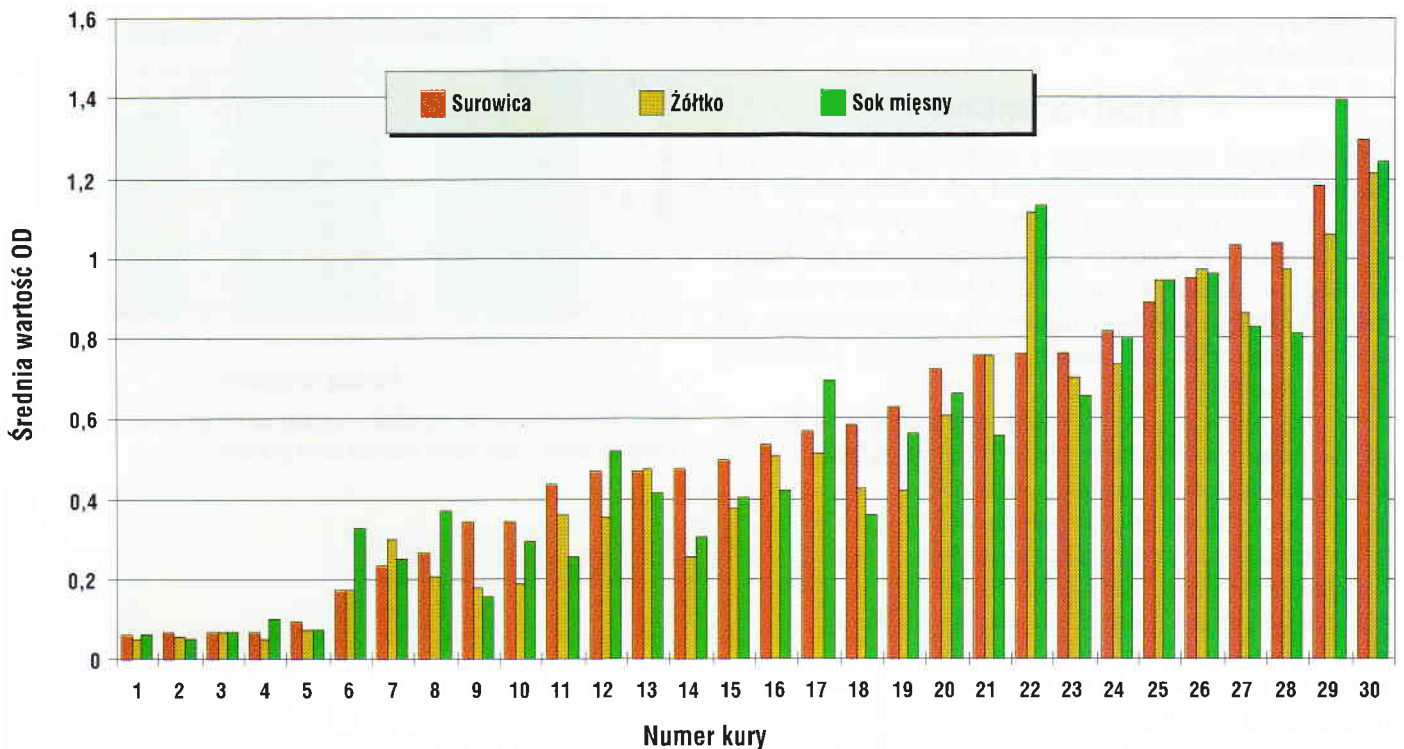
Ryc. 1. Zestawienie wyników aglutynacji płytowej ze świeżą kroplą krwi z użyciem trzech antygenów



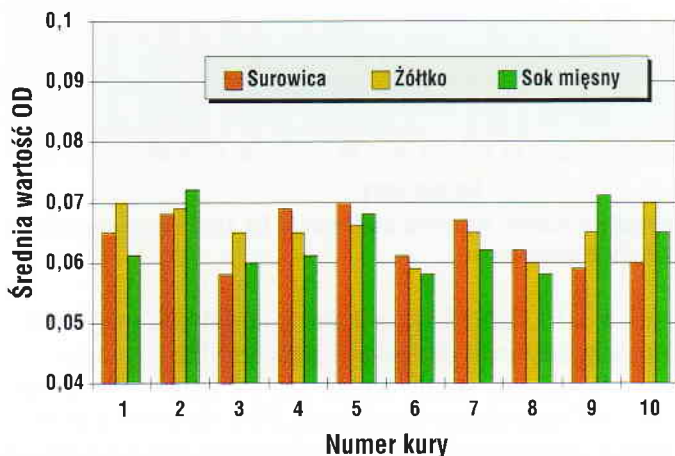
Ryc. 2. Porównanie wyników badań surowic kur testem ELISA i metodą aglutynacji płytowej przy użyciu Pullognostu

niu LPS-ELISA i 33% wyników dodatnich przy wykonanej aglutynacji płytowej z użyciem Pullognostu.

W kolejnym etapie badań porównano średnie wartości OD uzyskane w teście ELISA dla prób surowic, żółtka i soku mięsnego pochodzących od tych samych kur (ryc. 3). Wyniki wskazują, że niskim średnim wartościom OD surowic towarzyszyły niskie średnie wartości OD żółtka i soku mięsnego. Z kolei w przypadku prób surowic o wyższych średnich wartościach OD, odpowiadające im próby żółtka i soku mięsnego również posiadały wysokie wartości OD. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach prowadzonych przez wielu autorów (1, 10, 21, 23). U kur eksperymentalnie zakażonych pałeczkami *Salmonella*, bądź pochodzących ze stad naturalnie zakażonych, stwierdzano bardzo zbliżone poziomy przeciwciał IgG w surowicy i żółtku jaj od tych samych osobników. Dadrast i wsp. (8) wykazali, że w zakażonym stadzie niosek pałeczkami *S. enteritidis* 60% żółtek jaj zbadanych LPS-ELISA posiadało znacznie podwyższone miana przeciwciał IgG. Podobne wyniki badacze uzyskali również dla surowicy. Sunwoo i wsp. (24) badali stado eksperymentalnie zakażone *S. typhimurium*. Wykazali, że miana przeciwciał w surowicy i żółtku jaj były bardzo zbliżone oraz zaobserwowali podobny stopień



Ryc. 3. Wyniki badań testem ELISA surowicy, żółtka i soku mięsnego od kur ze stada podejrzanego o zakażenie

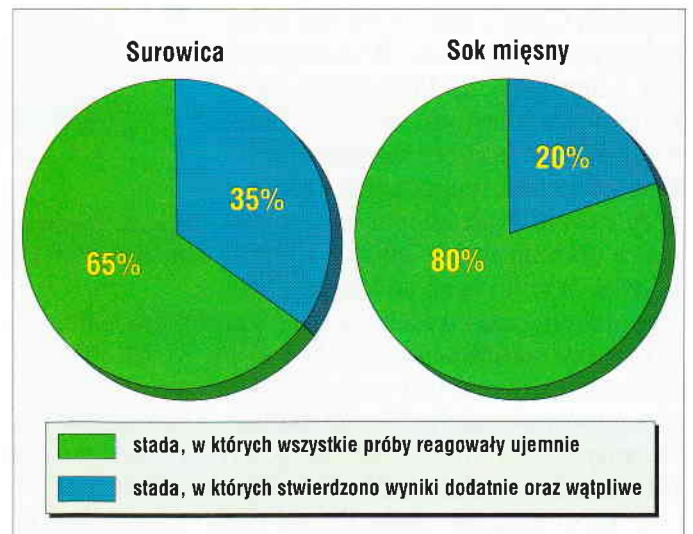


Ryc. 4. Wyniki badań testem ELISA surowicy, żółtka i soku mięsnego od kur ze stada wolnego od zakażenia

zanikania mian przeciwciał w czasie. Dodatkowo autorzy ci określili także stopień koncentracji IgG w surowicy i żółtku. Poziom IgG w surowicy wynosił w przybliżeniu 6 mg/ml, natomiast w żółtku 10 mg/ml. Nicholas i wsp. (21) badali stada zakażone *S. enteritidis*. W jednym z nich wykazali, że przy użyciu metody LPS-ELISA 75% prób surowic oraz 55% prób żółtek posiadało podwyższone wartości mian przeciwciał.

Oprócz surowicy i żółtka miano przeciwciał w badaniach własnych było określane także techniką LPS-ELISA dla soku mięsnego. Jest to nowy sposób wykorzystania testu ELISA. W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na prace dotyczące oznaczania mian przeciwciał dla tej tkanki u drobiu. Wskazówką do wykonania tych badań były duńskie doświadczenia z badaniem świń w kierunku *S. enterica* (5, 19).

Potwierdzeniem wyników uzyskanych w teście ELISA dla materiału pochodzącego z różnych tkanek



Ryc. 5. Wyniki badań monitoringowych wykonanych testem ELISA prób surowic i soku mięsnego brojlerów z 20 stad na obecność przeciwciał anti-*S. enteritidis* w ujęciu procentowym

są rezultaty własnych badań u kur ze stada kontrolnego – uznanego za wolne od zakażenia (ryc. 4). Wszystkie wartości średnie OD kształtowały się w tym stadzie na niskim poziomie.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono monitoring 20 stad brojlerów kurzych wykorzystując próby surowic i soku mięsnego. Wyniki przedstawiono w tab. 1 oraz na ryc. 5. W 35% stad stwierdzono wyniki dodatnie oraz wątpliwe, gdy badano surowice i w 20% stad, gdy badano sok mięsny. Próby surowic nie pochodziły od tych samych osobników, co próby soku z tkanki mięśniowej. Możliwość zastosowania soku mięsnego wydaje się być szczególnie wygodna do monitorowania stad brojlerów w rzeźni. Umożliwia ono

Tab. 1. Wyniki badań monitoringowych wykonanych testem ELISA prób surowicy i soku mięsnego brojlerów z 20 stad na obecność przeciwciał anti-*S. enteritidis*

Lp. stada	Surowica	Sok mięśniowy
1-13	-	-
14	±, +, +	±, +
15	+	-
16	±, +	±, +, +
17	±, +	+
18	±, +, +	+
19	+	-
20	±	-

Objaśnienia: „±” lub „+” odnosi się do pojedynczej próby, natomiast pozostałe próby w stadzie są ujemne; „-” wszystkie próby ujemne

wykonanie badań na dowolnej liczbie próbek oraz po przejściu stada przez linię ubojową. Sok mięsny obok surowicy mógłby służyć do ustalenia wzorcowego statusu immunologicznego stad danego regionu. Wszelkie odchylenia od wzorca byłyby wczesnym wskaźnikiem zmian występujących na danym terenie.

Przeprowadzone badania wykazały możliwość zastosowania odpowiednio przygotowanego żółtka jaj oraz soku z tkanki mięśniowej jako materiałów alternatywnych w stosunku do surowicy przy poszukiwaniu przeciwciał anti-*S. enteritidis*. Poziom przeciwciał w tych trzech tkankach, pobranych w jednakowym czasie, okazał się bardzo zbliżony. Wykorzystanie tych materiałów pozwoliłoby na wymienne stosowanie poszczególnych tkanek w zależności od potrzeb i możliwości pobrania materiału.

Podsumowanie

Zastosowany do wykrywania przeciwciał własny zestaw ELISA okazał się czułą i szybką metodą kontroli serologicznej stad drobiu. Jego zaletami są duża dokładność i powtarzalność oraz możliwość szybkiego przebadania większej liczby próbek. Opracowany zestaw ELISA jest przydatny do badania zarówno surowicy, żółtka jaj, jak i soku mięsnego.

Piśmiennictwo

- Barrow P. A.: Serological diagnosis of Salmonella serotype enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 21, 55-68.
- Barrow P. A., Berchieri Jr. A., Al-Haddad O.: Serological response of chickens to infection with Salmonella gallinarum-S. pullorum detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 1992, 36, 227-236.
- Barrow P. A., Desmidt M., Ducatelle R., Guittet M., van der Heijden H. M. J. F., Holt P. S., Huis in 't Velt J. H. J., McDonough P., Nagaraja K. V., Porter R. E., Proux K., Sisak F., Staak C., Steinbach G., Thorns C. J., Wray C., van Zijderveld F.: World Health Organization-supervised interlaboratory comparison of ELISAs for the serological detection of Salmonella enterica serotype Enteritidis in chickens. *Epidemiol. Infect.* 1996, 117, 69-77.
- Bollen L. S., Crowley A., Stodulski G., Hau J.: Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J. Immunol.* 1996, 191, 113-120.
- Carstensen B., Christensen J.: Herd size and sero-prevalence of Salmonella enterica in Danish swine herds: a random-effects model for register data. *Prev. Vet. Med.* 1998, 27, 191-203.
- Chart H., Rowe B., Baskerville A., Humphrey T. J.: Serological response of chickens to Salmonella enteritidis infection. *Epidemiol. Infect.* 1990, 104, 63-71.
- Corkish J. D., Davies R. H., Wray C., Nicholas R. A. J.: Observations on broiler breeder flock naturally infected with Salmonella enteritidis phage type 4. *Vet. Rec.* 1994, 134, 591-594.
- Dadrast H., Hesketh R., Taylor D. J.: Egg yolk antibody detection in identification of salmonella infected poultry. *Vet. Rec.* 1990, 126, 219.
- Desmidt M., Ducatelle R., Haesebrouck F., de Groot P. A., Verlinden M., Wjffels R., Hinton M., Bale J. A., Allen V. M.: Detection of antibodies to Salmonella enteritidis in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. *Vet. Rec.* 1996, 138, 223-226.
- Furrer B., Baumgartner A., Bommeli W.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of antibodies against Salmonella enteritidis in chicken blood or egg yolk. *Int. J. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1993, 279, 191-200.
- Gast R. K., Beard C. W.: Detection of Salmonella serogrup D-specific antibodies in the yolks of eggs laid by hens infected with Salmonella enteritidis. *Poult. Sci.* 1991, 70, 1273-1276.
- Gast R. K., Porter Jr. R. E., Holt P. S.: Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by Salmonella enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. *Avian Dis.* 1997, 41, 195-202.
- Gast R. K., Porter Jr. R. E., Holt P. S.: Assessing the sensitivity of egg yolk antibody testing for detecting Salmonella enteritidis infections in laying hens. *Poult. Sci.* 1997, 76, 798-801.
- Hafez H. M.: Zakażenia drobiu pałeczkami Salmonella: diagnostyka i zwalczanie. *Mat. Konf.: Salmonelozy drobiu.* Puławy, 1998, s. 7-18.
- Hassan J. O., Barrow P. A., Mockett A. P. A., McLeod S.: Antibody response to experimental Salmonella typhimurium infection in chickens measured by ELISA. *Vet. Rec.* 1990, 126, 519-522.
- Hoszowski A.: Techniki stosowane w epidemiologii salmonelozy u drobiu. *Mat. Konf.: Salmonelozy drobiu.* Puławy, 1998, s. 19-25.
- Hoop R. K., Pospischil A.: Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired Salmonella enteritidis phage type 4 infection. *Vet. Rec.* 1993, 133, 391-393.
- Lösch U., Schrammer I., Wanke R., Jürgens L.: The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B* 1986, 33, 609-619.
- Mousing J., Jensen P. T., Halgaard C., Bager F., Feld N., Nielsen B., Nielsen J. P., Bech Nielsen S.: Nation-wide Salmonella enterica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 1997, 29, 247-261.
- Nicholas R. A. J.: Serological response of chickens naturally infected with Salmonella typhimurium detected by ELISA. *Br. Vet. J.* 1992, 148, 241-248.
- Nicholas R. A. J., Andrews S. J.: Detection of antibody to Salmonella enteritidis and S. typhimurium in the yolk of hens eggs. *Vet. Rec.* 1991, 128, 98-100.
- Nicholas R. A. J., Cullen G. A.: Development and application of an ELISA for detecting antibodies to Salmonella enteritidis in chicken flocks. *Vet. Rec.* 1991, 128, 74-76.
- Shimizu M., Fitzsimmons R. C., Nakai S.: Serum and egg antibody responses in chickens to Escherichia coli. *Agric. Biol. Chem.* 1989, 53, 3233-3238.
- Sunwoo H. H., Nakano T., Dixon W. T., Sim J. S.: Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Poult. Sci.* 1996, 75, 342-345.
- Thorns C. J., Bell M. M., Sojka M. G., Nicholas R. A.: Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella enteritidis infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 792-797.
- van Zijderveld F. G., van Zijderveld-van Bommel A. M., Brouwers R. A. M., de Vries T. S., Landman W. J. M., de Jong W. A.: Serological detection of chicken flocks naturally infected with Salmonella enteritidis, using an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen. *Vet. Quart.* 1993, 15, 135-137.
- Yokoyama H., Umeda K., Peralta R. C., Hashi T., Icatlo Jr. F. C., Kuroki M., Ikemori Y., Kodama Y.: Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for Salmonella enteritidis and S. typhimurium. *Vaccine* 1998, 16, 388-393.