

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY

Zastosowanie testu 3ABC-ELISA do różnicowania przeciwciał pryszczycowych powstałych w wyniku zakażenia lub immunizacji wrażliwych zwierząt

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Niedbalski W., Kęsy A.

Application of 3ABC-ELISA to differentiate FMD antibodies induced by vaccination or infection

Summary

The purpose of the investigation was the application of 3ABC-ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. All samples of sera, collected from healthy, animals were free of antibodies of recombinated 3ABC antigen. Among 430 samples of the sera taken from LPBE and VN seropositive animals from the „ring” vaccination zone and from the group of animals exported from Poland and as a part of the national serological surveillance program for FMD, 100% of the sera have been found negative to polipeptide 3ABC. Out of 82 samples of the sera collected from seropositive animals imported to Poland during 1985-1991, 2 samples (2.5%) gave a positive reaction with non-structural protein 3ABC. The preliminary results have shown that the 3ABC-ELISA can be an ideal tool for FMD eradication campaigns and control programs.

Pryszczycyca stanowi ciągle aktualny problem w niektórych rejonach Europy i Azji (4). Jedną z podstawowych metod kontroli choroby oraz jej zwalczania jest szybka oraz precyzyjna diagnostyka laboratoryjna. Rutynowo stosowane w laboratoriach pryszczycowych, serologiczne metody diagnostyczne, takie jak: test ELISA (liquid-phase blocking ELISA-LPBE) oraz odczyn seroneutralizacji (SN), wykrywają przeciwciała do strukturalnych białek kapsydu wirusa pryszczycy. Ponieważ przeciwciała te powstają zarówno w wyniku immunizacji jak i zakażenia zwierzęcia, powyższe metody nie pozwalają odróżnić zwierząt szczepionych od zakażonych wirusem pryszczycy. Badania takie są szczególnie ważne dla prawidłowej oceny sytuacji epizootycznej w rejonach, w których dla zwalczania choroby zastosowano szczepionkę przeciwpryszczycową oraz dla oceny stanu zdrowia zwierząt wrażliwych w obrocie handlowym. Żywy wirus, w odróżnieniu do zinaktywowanego antygenu wirusowego obecnego w preparatach uodporniających, posiada zdolność replikacji w organizmie zwierzęcia, co w konsekwencji przyczynia się do produkcji nie tylko strukturalnych białek kapsydowych (VP1-VP4), ale także szeregu białek niestrukturalnych (2C, 3A, 3AB oraz 3ABC). Niektóre spośród tych białek wykazują właściwości antygenowe (6). Wyniki badań wykazały, że przeciwciała skierowane przeciwko polipeptydowi 3ABC okazują się aktualnie najlepszym serologicznym markerem pozwalającym identyfikować i różnicować zwierzęta po przebytej infekcji wirusowej, nosicieli i rekonwalescentów od zwierząt immunizowanych szczepionkami inaktywowanymi (1, 5, 8).

Uzyskane rezultaty stanowiły podstawę do podjęcia przez zespoły badawcze w Bresci (Włochy) oraz Pirbright (Anglia) badań w zakresie warunków reakcji, co w efekcie doprowadziło do zastosowania zrekombinowanego antygenu 3ABC oraz specyficznych przeciwciał monoklonalnych do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej. Opracowany przez zespół z Bresci (2), zestaw reagentów do testu 3ABC-ELISA, znajduje zastosowanie jako metoda uzupełniająca w serologicznej diagnostyce pryszczycy.

Celem badań, była adaptacja testu 3ABC-ELISA do praktyki laboratoryjnej prowadzonej w Zakładzie Pryszczycy PIWet. oraz przeprowadzenie w oparciu o nową metodę oceny surowic od bydła uznanego za seropoztywne (LPBE i SN) w latach 1993-1997, pod kątem obecności przeciwciał anti-3ABC.

Materiał i metody

Surowice. Ogółem przebadano 575 surowic od bydła dorosłego i cieląt urodzonych z seropoztywnych matek. Z powyższej liczby, 220 surowic pochodziło od zwierząt z rejonu „pierścieniowych” szczepień profilaktycznych prowadzonych w latach 1985-1989 wokół Zduńskiej Woli, 95 surowic LPBE i SN pozytywnych wybrano wśród zwierząt badanych w ramach corocznych, zleconych przez Departament Weterynarii badań monitorowych, dalszych 115 surowic wybrano z grupy pozytywnych zwierząt wyeksportowanych z Polski w latach 1993-1995. Przebadano także wszystkie (82 próby), LPBE/SN pozytywnie surowice zebrane w latach 1993-1997 od bydła sprowadzonego do Polski głównie z krajów ościennych (kraje dawnego ZSRR, Czech i Słowacji, Niemiec), a także Francji, Belgii, i in.

krajów europejskich. Ponadto, przebadano 45 surowic od zwierząt LPBE i SN seronegatywnych, które nigdy przedtem nie miały kontaktu z wirusem i nie były szczepione przeciwko pryszczycy. W badaniach zastosowano również surowice (18 prób), pochodzące od rekonwalescentów po uprzednim zakażeniu wirusem pryszczycy typ A, O, C, Asia 1, SAT-1, SAT-2, lub SAT-3, otrzymane ze Światowego Laboratorium Referencyjnego w Pirbright (Anglia).

Test immunoenzymatyczny (3ABC-ELISA). Pośredni test ELISA wykonywano zgodnie z metodą opisaną przez De Diego i wsp. (2). Zestaw niezbędnych reagentów do badań otrzymano dzięki uprzejmości Dr. E. Brocchi z Istituto Zooprofilattico Sperimentale w Bresci (Włochy). Zasada testu polega na reakcji obecnych w badanych surowicach swoistych przeciwciał anti-3ABC, ze zrekombinowanym i sklonowanym w *E. coli* polipeptydem 3ABC, związanym do płytki za pośrednictwem specyficznych przeciwciał monoklonalnych 2C2. Obecność przeciwciał wykrywa się stosując specyficzny koniugat (bydłce IgG związane z peroksydazą chrzanową) po reakcji barwnej z substratem (OPD).

Wykonanie odczynu:

1. Opłaszczanie płytek. Do wszystkich zagłębień płytki płaskodennej (Nunc MaxiSorp) nakrapla się po 50 µl roztworu Mab 2C2, zgodnie z wcześniej wystandaryzowanym rozcieńczeniem roboczym. Płytkę inkubuje się przez noc w temp. 4°C.

2. Reakcja z antygenem. Po 3-krotnym przemyciu płytki buforem PBS-Tween 20, do rzędów nieparzystych nakrapla się (50 µl/zagłębienie) antygen 3ABC rozcieńczony buforem PBS-Tween + 3% odtłuszczone mleko (Marvel, Pirbright, U.K.) w stosunku 1/30. Do rzędów parzystych (BLANK) nakrapla się tylko bufor (bez antygeny). Płytkę inkubuje się przez 1 godz. w temp. 37°C na wytrząsarce.

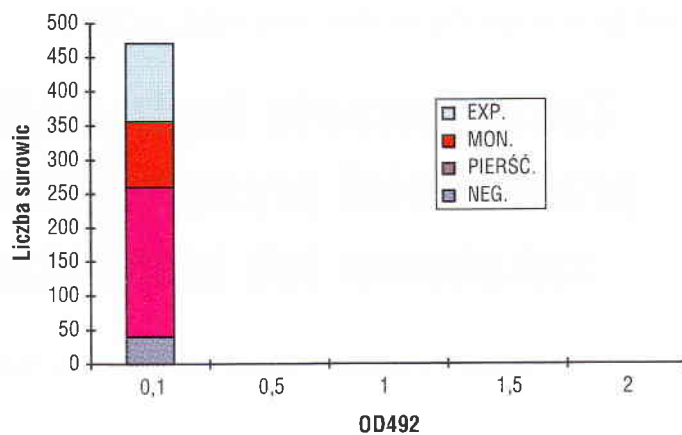
3. Inkubacja z surowicami. Płytkę przemywa się 3-krotnie buforem j/w, po czym do kolejnych zagłębień nakrapla się po 50 µl odpowiednich surowic terenowych i kontrolnych, rozcieńczonych w stosunku 1/400 w buforze PBS-Tween + 3% odtłuszczone mleko + lizat *E. coli* (150 µg/ml). Każdą surowicę nanosi się podwójnie, zarówno do zagłębień z antygenem, jak i kontrolnych (BLANK). Płytkę inkubuje się na wytrząsarce przez okres 1 godz. w temp. 37°C. Na każdej płytce można zbadać 42 surowice terenowe i 3 kontrolne.

4. Reakcja z koniugatem. Na płytkę nakrapla się (50 µl/zagłębienie) bydłce IgG związane z peroksydazą, rozcieńczone buforem j/w, w stosunku 1/200 i inkubuje 1 godz. w temp. 37°C na wytrząsarce.

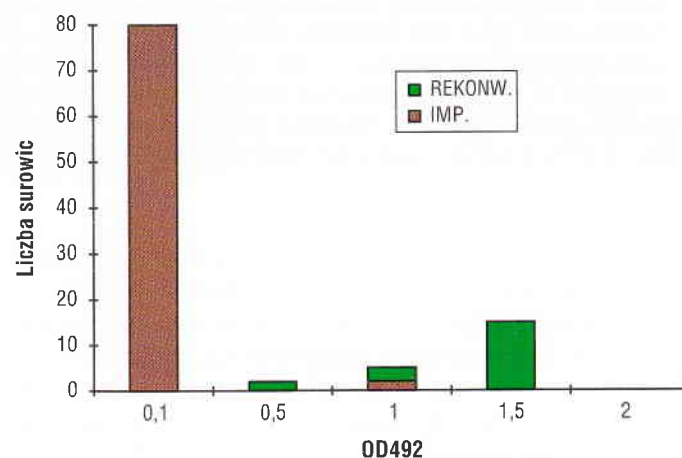
5. Wywołanie reakcji barwnej. Po przemyciu płytki buforem j/w, do wszystkich zagłębień nakrapla się po 50 µl substratu (OPD, 0,5 mg/ml i 0,02% H₂O₂ w buforze fosforanowo-cytrynowym, pH 5,0) i płytkę pozostawia się na 10 min. w temp. pokojowej.

6. Hamowanie reakcji enzymatycznej. Stosuje się 2N roztwór H₂SO₄ (50 µl/zagłębienie), po czym reakcję kolorymetryczną analizuje się spektrofotometrycznie stosując czytnik mikropłytek Dynatech 5000 (U.K.).

7. Interpretacja wyników. Średnią wartość OD₄₉₂ dla każdej surowicy terenowej i kontrolnej w zagłębieniach bez antygeny (BLANK) odejmuje się od wartości absorbancji w zagłębieniach zawierających antygen. Surowica referen-



Ryc. 1. Rozkład wartości OD₄₉₂ (3ABC-ELISA) surowic pochodzących od zwierząt wolnych od przeciwciał pryszczycowych (NEG.), bydła z rejonu profilaktycznych szczepień „pierścieniowych” (PIERŚĆ.) oraz testowanych w ramach corocznych badań monitorowych (MON.) i wyeksportowanych z Polski (EXP.)



Ryc. 2. Rozkład wartości OD₄₉₂ (3ABC-ELISA) surowic pochodzących od bydła sprowadzonego do Polski (IMP.) oraz od rekonwalescentów, po zakażeniu wirusem pryszczycy (REKONW.)

cyjna ujemna powinna dać wartość OD₄₉₂ od 0 do 0,1. W przypadku surowicy referencyjnej wysoko dodatniej wartość ta powinna mieścić się w zakresie 1,5 do 2,5, natomiast OD₄₉₂ dla surowicy kontrolnej nisko pozytywnej (progowej) powinna wynosić od 0,2 do 0,5. Wszystkie surowice terenowe, dla których wartość absorbancji jest równa lub wyższa od 0,2 należy traktować jako dodatnie.

Wyniki i omówienie

W prezentowanej pracy zastosowano test immunoenzymatyczny (3ABC-ELISA), w którym wykorzystano zrekombinowane białko niestrukturalne wirusa pryszczycy (polipeptyd 3ABC) wykazujące powinowactwo do specyficznych przeciwciał monoklonalnych 2C2 oraz posiadające wolne miejsca epitopowe wiążące swoiste przeciwciała anti-3ABC. Użyta metoda pozwala różnicować przeciwciała powstałe w wyniku zakażenia zwierzęcia lub szczepienia preparatami zawierającymi zainaktywowany antygen wirusa pryszczycy-

Tab. 1. Porównanie wysokości absorbancji (OD_{492}) w odczynie 3ABC-ELISA z wartością mian LPBE w kierunku obecności przeciwciał pryszczycowych w badanych surowicach

Pochodzenie surowic	Liczba badanych prób surowic	Miano LPBE	OD_{492} (3ABC-ELISA)
Zwierzęta negatywne (wolne od przeciwciał)	40	< log 1,6	< 0,2
Bydło z rejonu szczepień „pierścieniowych”	220	log 1,6–3,3	< 0,2
Badania monitorowe	95	log 1,6–3,0	< 0,2
Zwierzęta importowane	82	log 1,6–2,1	< 0,2–0,9
Bydło po zakażeniu żywym wirusem pryszczycy	18	log 2,7–3,6	0,5–1,8

cy. Rycina 1 przedstawia rozkład wartości OD_{492} (3ABC-ELISA) dla surowic LPB i SN negatywnych pobranych od bydła nie mającego uprzednio kontaktu z wirusem pryszczycy i nie szczepionego, surowic od zwierząt z rejonu „pierścieniowych” szczepień profilaktycznych oraz od bydła przeznaczonego na eksport, a także kontrolowanego w ramach corocznych badań monitorowych. Wszystkie zwierzęta uznane wcześniej za LPBE i SN seropozytywne w odniesieniu do wirusa pryszczycy (3, 7) określono w teście 3ABC-ELISA jako negatywne. Powyższy wynik pozwala stwierdzić, że surowice te pochodzą od zwierząt szczepionych lub w przypadku cieląt – karmionych siarą bogatą w przeciwciała pryszczycowe (7), które nie miały kontaktu z żywym wirusem. W przypadku zwierząt importowanych do Polski w okresie do 1991 r., surowice od 2 sztuk pochodzących z Rosji reagowały pozytywnie z antygenem 3ABC (ryc. 2). Stanowi to ok. 2,5% ogólnej liczby sprowadzonych do kraju zwierząt uznanych za pozytywne w testach LPBE i SN. Odsetek zwierząt 3ABC-ELISA pozytywnych znacznie przewyższa określony przez innych badaczy (2) błąd metody (procent wyników fałszywie dodatnich), co czyni uzyskany wynik wiarygodny. Jak wykazano, wszystkie pozostałe surowice są jednoznacznie negatywne dla antygeny 3ABC (ryc. 1). Uzyskane wyniki sugerują, że w byłym ZSRR, sytuacja w zakresie pryszczycy, na przełomie lat 80 i 90-tych była niejasna i istniało prawdopodobieństwo sprowadzenia z tego rejonu zwierząt stwarzających zagrożenie epizootyczne. W świetle powyższych danych, trafne wydaje się być natychmiastowe eliminowanie (ubój) wszystkich sprowadzanych zwierząt, które w testach LPBE oraz SN określono jako seropozytywne dla wirusa pryszczycy. Wśród dostępnych, sprowadzonych ze Światowego Laboratorium Referencyjnego w Pirbright surowic pochodzących od rekonwalescentów, wszystkie, tzn. 18 prób reagowały dodatnio z antygenem 3ABC (ryc. 2). W tabeli 1. porównano wartości OD_{492} (3ABC-ELISA) z wartościami mian LPBE poszczególnych surowic. Podkreślić należy, że nie zaobserwowano pozytywnej korelacji pomiędzy wysokością mian w teście LPBE i warto-

ściach absorbancji w odczynie 3ABC-ELISA. Surowice od zwierząt sprowadzonych do kraju posiadały relatywnie najniższe miano LPBE, natomiast ich wartość OD_{492} w teście 3ABC-ELISA wynosiła od < 0,2 aż do 0,9, w przypadku surowic 3ABC dodatnich. Z kolei wiele surowic, szczególnie z rejonu Zduńskiej Woli, gdzie zwierzęta szczepiono wielokrotnie, a miana przeciwciał pryszczycowych w ich surowicach wynosiły nawet powyżej log 3,01 (7), określono jako 3ABC ujemne.

Przedstawione wstępne badania nad zastosowaniem testu 3ABC, różnicującego przeciwciała w kierunku strukturalnych, kapsydowych białek wirusa pryszczycy, stymulowanych immunizacją zwierząt, od niestrukturalnych, indukowanych zakażeniem, wymagają kontynuacji i będą dotyczyły większej populacji bydła. Uzyskane dotychczas wyniki pozwalają potwierdzić dużą wartość praktyczną testu 3ABC-ELISA i celowość jego stosowania w badaniach dotyczących kontroli i zwalczania pryszczycy. Wysoka czułość, specyficzność oraz łatwość interpretacji uzyskanych wyników, decydują o użyteczności testu w zakrojonych na szeroką skalę przeglądowych badaniach serologicznych. Jest to jeden z kolejnych etapów doskonalenia diagnostyki pryszczycy; bardziej precyzyjnego i szybszego jej rozpoznawania.

Piśmiennictwo

- Bergmann I. E., Auge de Mello P., Neizert, E., Beck E., Gomes I.: Am. J. Vet. Res. 54, 825, 1993.
- De Diego M., Brocchi E., Mackay D., De Simone F.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Ma'aleh Hachamisha, Israel, 2-6 September 1996.
- Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., Paprocka G.: Medycyna Wet. 53, 520, 1997
- Leforban Y.: Report of the Central European Conference on Modern Vaccinology, Vaccines and Immunization, Pulawy, Poland, 6-9 May, 1997.
- Luborath J., Brown F.: Res. Vet. Science 59, 70, 1995
- Marquardt O.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Ma'aleh Hachamisha, Israel, 2-6 September 1996.
- Niedbalski W., Kęsy A., Fitzner A.: Bull. vet. Inst. Pulawy, 41, 11, 1997.
- Rodriguez A., Dopazo J., Saiz J. C., Sobrino F.: Arch. Virol., 136, 123, 1994.

Adres autora: dr Wiesław Niedbalski, ul. Zielona 48/4, 98-220 Zduńska Wola