

Zastosowanie IPMA do wykrywania przeciwciał dla wirusa nosówki

ANDRZEJ BOROWSKI, IWONA KIMAK

Biowet Puławy Sp. z o.o., ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

Borowski A., Kimak I.

Application of IPMA for detection of antibodies to canine distemper virus

Summary

An immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) was developed to detect specific immunoglobulins against the canine distemper virus (CDV). An estimation of the relationship between the IPMA serum titres and titres in the commonly used seroneutralization test was carried out. A high correlation coefficient ($r = 0.94$) was obtained between both these tests. The repeatability of serum titres using IPMA was analysed. The average standard deviation between replicate serum titres was calculated to be 0.13 log. A correlation ($r = -0.82$) was observed between the log IPMA titres and the concentration of specific antibodies.

The results indicate that IPMA may be applied as a routine, relatively quick and simple method of evaluating the serum antibody level for CDV.

Keywords: distemper, detection of antibodies, IPMA

Wirus nosówki (CDV) indukuje u psów pojawienie się zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Podstawę do rozpoznania serologicznego nosówki oraz wyznacznik statusu immunologicznego psów stanowi ocena poziomu swoistych dla CDV przeciwciał. Serologiczna diagnostyka choroby prowadzona jest głównie w oparciu o odczyn seroneutralizacji (SN). Początkowo test ten wykonywano na zarodkach jaj kurzych (2, 5, 6), a później w hodowlach komórkowych (1, 4, 7, 9, 11). Mimo wielu ograniczeń w jego stosowaniu, jak chociażby czasochłonność, konieczność zapewnienia jałowości i prowadzenia hodowli komórek, jest SN testem powszechnie stosowanym i uznanym. Rozpowszechnione w immunologii i mikrobiologii testy ELISA znalazły także zastosowanie w serologicznej diagnostyce nosówki (3). Bez wątplenia są to testy czułe i specyficzne, wymagają jednak dobrego opracowania, zwłaszcza właściwego przygotowania i wystandaryzowania antygeny do opłaszczenia.

Techniką bardzo zbliżoną do ELISA są tkankowe testy immunoperoxydazowe (immunoperoxidase monolayer assay-IPMA). W teście tym opłaszcza się utrwaloną tkankę z namnożonym wirusem, a jako chromogenu używa się związków nierozpuszczalnych. Odczytu dokonuje się na podstawie obrazu mikroskopowego. Technika ta w różnych modyfikacjach z powodzeniem stosowana była w badaniach immunologicznych i wirusologicznych (8, 10, 13-15).

Celem badań była ocena przydatności IPMA do wykrywania w surowicy psów przeciwciał dla wirusa nosówki.

Materiał i metody

Hodowla komórek. Do badań użyto komórek linii ciągłej nerki małpy (Vero). Płyn wzrostowy stanowił MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma) z dodatkiem 5% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej – FCS (Sera Tech). Jako płynu utrzymującego używano Medium 199 (Sigma). Do obu płynów dodano L-glutaminę i gentamycynę.

Wirus. Wykorzystywano atenuowany wirus nosówki psów (szczep Led) adaptowany do komórek linii Vero. Pułę wirusa do badań przechowywano w formie zliofilizowanej.

Surowice. Do badań użyto surowic pobranych od psów szczepionych przeciwko nosówce.

IPMA. Test wykonano wg zasad zastosowanych do mianowania wirusa nosówki testem immunoperoxydazowym (10). Dwudziestoczerogodzinne hodowle komórek założone w płaskodennych mikroplastykach (Nunc) inokulowano wirusem nosówki w dawce 10-20 TCID₅₀ na studzienkę. Po 72-godzinnej inkubacji hodowle utrwalało 75% acetonem, suszono i przechowywano w temp. -20°C do chwili użycia.

Badane surowice rozcieńczano dwukrotnie (odstęp między rozcieńczeniami 0,3 log) w zakresie od 1/10 do 1/20 480, a następnie poszczególne rozcieńczenia wprowadzano po 50 µl do pojedynczych studzienek mikroplastyki. Dalsze postępowanie, prowadzące do wizualizacji efektu cytopatycznego, wykonano wg zasad opisanych wcześniej dla PLA (10). Za miano surowicy przyjmowano odwrotność jej najwyższego rozcieńczenia, w którym obserwowano wybarwione ogniska replikacji wirusa nosówki. Na płytce umieszczano także kontrolę komórek i kontrolę wirusa ze znaną, dodatnią surowicą.

Odczyn seroneutralizacji (SN). Test wykonywano metodą beta w mikroplastykach z płaskim dnem. Badane surowice

wice inaktywowano w temp. 56°C przez 30 min. i rozcieńczano 4-krotnie (odstęp między rozcieńczeniami 0,6 log), rozpoczynając od rozcieńczenia 1/10. Odczyn wykonano z dawką 100 TCID₅₀ wirusa nosówki. Mieszaninę wirus/surowica inkubowano w temperaturze pokojowej 1,5 godz. Po tym czasie, do studzienek mikropłytki z 24-godziną hodowlą komórek, wprowadzano po 50 µl mieszaniny, przeznaczając po 6 studzienek na każde rozcieńczenie. Adsorpcję wirusa przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 60 min., a następnie do baseników dodawano po 150 µl płynu utrzymującego. Na płytce umieszczano także kontrolę komórek i kontrolę wirusa ze znaną, dodatnią surowicą. Odczytu wyników dokonywano po 72-godzinnej inkubacji hodowli w temp. 37°C. Obecność wirusa w komórkach wykrywano testem immunoperoksydazowym (10). Miano, stanowiące odwrotność najwyższego rozcieńczenia surowicy, które spowodowało zobojętnienie wirusa w 50% studzienek (SN₅₀), obliczano metodą Reeda-Muencha.

Porównanie IPMA z SN. Badaniu na obecność przeciwciał dla wirusa nosówki poddano 26 próbek surowic. Oznaczenia poziomu przeciwciał przy użyciu każdego z testów wykonano jednorazowo.

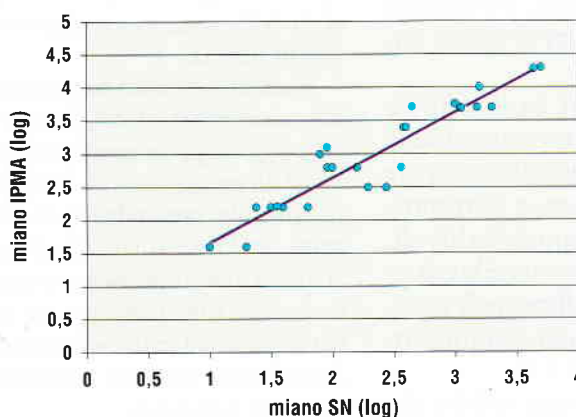
Powtarzalność IPMA. Powtarzalność metody oceniano na podstawie precyzji oznaczeń mian surowic (o różnym poziomie przeciwciał) wykonanych przez 2 osoby, w innym czasie, na tym samym sprzęcie, przy użyciu tych samych odczynników. Mikropłytki z hodowlą komórek i wirusem użyte do badań przygotowano w jednym czasie, z tego samego materiału wyjściowego. Oznaczenie mian 8 surowic powtórzono pięciokrotnie, oddzielnie przygotowując ich rozcieńczenia przed każdym badaniem. Poszczególne badania wykonano w odstępach kilku dni.

Liniiowość IPMA. Celem sprawdzenia czy metoda spełnia kryterium liniiowości przygotowano 5 modelowych mieszanin surowic, o różnych stężeniach przeciwciał swoistych dla wirusa nosówki. Mieszaniny modelowe przygotowano przez wykonanie serii 4-krotnie wzrastających rozcieńczeń znanej, dodatniej surowicy surowicą ujemną. Uzyskany w ten sposób zestaw 5 surowic obejmował zakres zawartości przeciwciał od 100% (surowica dodatnia nie rozcieńczona) do 0,39% (surowica rozcieńczona 256×). Dla każdej mieszaniny wykonano po trzy oznaczenia.

Stabilność utrwalonych hodowli. Przygotowano 10 niezależnych szeregów 2-krotnie wzrastających rozcieńczeń znanej, dodatniej surowicy.

Każdy szereg zbadano równoległe na płytce przechowywanej 6 miesięcy, w temp. -20°C i płytce (hodowli) przygotowanej bezpośrednio przed użyciem.

Rozcieńczenia surowic i wyniki oznaczeń przedstawiano w skali logarytmicznej. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wg metodologii zalecanej przy walidacji metod analitycznych (12).



Ryc. 1. Porównanie IPMA i testu SN w oznaczaniu poziomu przeciwciał w surowicy psów

Wyniki i omówienie

Wyniki porównawczego badania surowic psów na obecność przeciwciał swoistych dla wirusa nosówki testem immunoperoksydazowym i odczynem seroneutralizacji wskazują na statystycznie znamienne skorelowanie wyników oznaczeń uzyskanych w obu testach ($r = 0,94$; $n = 26$; $p \leq 0,05$). Kształt tej zależności wyraża linia regresji opisana równaniem $y = 0,98x + 0,69$ (ryc. 1). Wszystkie zbadane surowice były dodatnie zarówno w IPMA jak i w SN. Najniższe zanotowane miano w IPMA wynosiło 1,6 log, najwyższe zaś to 4,3 log. W odczynie seroneutralizacji rozpiętość mian surowic zawierała się w przedziale od SN₅₀ = 1 log do SN₅₀ = 3,64 log.

Wyniki oznaczania poziomu przeciwciał w kolejnych dniach badań nie różnią się istotnie pod względem precyzji (tab. 1). Zgodność pomiędzy poszczególnymi wynikami analiz, powtarzanymi pięciokrotnie, określa odchylenie standardowe wynoszące dla 4 surowic 0,16 log, dla 3 kolejnych 0,13 log, a w jednym przypadku we wszystkich pięciu oznaczeniach uzyskano jednakowy odczyt. Średnie odchylenie standardowe uzyskane dla 8 surowic wyniosło 0,13 log.

Wyniki badania liniiowości metody przedstawiono w tab. 2. Średnie miano dodatniej surowicy wyjściowej, która posłużyła do przygotowania pozostałych mieszanin modelowych, wynosiło 4,2 log. Odczytane miana surowic modelowych zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze wzrostem rozcieńczenia, malały. Liniiowość spadku określona wprawdzie wysokim współczynnikiem korelacji ($r = -0,82$) jest jednak statystycznie nieistotna. Dla surowicy E/256 (rozcieńczenie 256-krotne) średnie miano wyniosło 1,6 log, a zatem oznaczony poziom swoistych przeciwciał był 400× niższy w stosunku do surowicy A/1. Podobna rozbieżność wyników, uzyskanych w doświadczeniu i spodziewanych, dotyczy surowic D/64 i C/16.

Wyniki badania stabilności utrwalonej hodowli komórek przedstawiono w tab. 3. Rezultaty uzyskane na płytce przechowywanej 6 miesięcy (średnie miano 2,74 ± 0,13 log) i płytce przygotowanej *ex tempore* (2,68 ± 0,15 log) nie różnią się istotnie między sobą ($p \leq 0,05$).

Tab. 1. Wyniki badania powtarzalności IPMA

Nr surowicy	Powtórzenie					\bar{x}	s
	A	B	C	D	E		
1	2,8	3,1	3,1	2,8	3,1	2,98	0,16
2	2,2	2,5	2,5	2,2	2,2	2,32	0,16
3	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,26	0,13
4	2,8	3,1	3,1	2,8	2,8	2,92	0,16
5	3,1	3,1	3,1	2,8	2,8	2,98	0,16
6	3,1	3,1	3,1	2,8	3,1	3,04	0,13
7	3,1	3,1	2,8	3,1	3,1	3,04	0,13
8	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,10	0,00

Objaśnienia: \bar{x} – średnie miano, s – odchylenie standardowe.

Tab. 2. Wyniki badania liniowości IPMA

Mieszanka modelowa	Współczynnik rozcieńczenia (log)	Średnie miano oznaczone	Miano oczekiwane
A/1	0,0	4,2	4,2
B/4	0,6	3,6	3,6
C/16	1,2	2,8	3,0
D/64	1,8	2,2	2,4
E/256	2,4	1,6	1,8

ność między IPMA a testem SN, wskazuje że wykrywane za pomocą IPMA przeciwciała klasy G są głównymi przeciwciałami neutralizującymi wirus nosówki. Podobne wnioski wyciągnął Brandt (3), porównując test SN z testem ELISA, w którym identycznie jak w prezentowanej pracy, używano koniugatu anty-psy IgG. Cytowany autor opisał również przypadki surowic, w których znajdowały się czynniki niespecyficzyne wiążące się z opłaszczeniem mikrocząstek. Podobne zjawisko, prawdopodobnie związane z obecnością w surowicy czynników nieswoistych, zaobserwowano w toku własnych doświadczeń z IPMA, nie objętych zakresem niniejszej pracy. Dla nielicznych, dodatnich surowic nie udało się wykazać w IPMA reakcji przeciwciał z wirusem. Zaobserwowano natomiast znacznie intensywniejsze w stosunku do innych surowic dodatnich i ujemnych jednolite wybarwienie tkanki na całej powierzchni studzienki. Przepuszczalnie wstępna adsorpcja takiej surowicy z komórkami linii Vero podniosłaby czułość testu.

Należy również wspomnieć, że w przypadku części surowic o wysokim mianie przeciwciał dla CD obserwowano zjawisko prozony – brak pozytywnej reakcji w niskich rozcieńczeniach przy wyraźnej reakcji dodatniej w rozcieńczeniach wyższych.

Każdemu procesowi pomiarowemu towarzyszą błędy losowe i systematyczne, a ich suma stanowi o dokładności metody. Źródła błędów dla IPMA i testu SN są w zasadzie takie same (choć ich udział w ogólnej zmienności każdej z metod jest inny) i, pomijając błędy systematyczne, wymienić tu można: błąd rozcieńczenia, błąd dawki wirusa, czy najbardziej ważącą na odczytach subiektywną interpretację obrazu mikroskopowego. Wydaje się, że doświadczenie i wrażliwość operatora są szczególnie istotne w przypadku odczynu seroneutralizacji. Zastosowanie do detekcji nie zo-bojętnionego w SN wirusa, techniki barwienia efektu cytopatycznego lub techniki immunoenzymatycznej w pewnym stopniu zmniejsza niepewność odczytu, jednak go nie eliminuje. Appel i wsp. (1), badając powtarzalność testu SN uzyskał precyzję wyrażoną odchyleniem standardowym wynoszącym ok. 0,25 log. Oznacza to, że przy poziomie prawdopodobieństwa 95%, każdy pojedynczy wynik pomiaru powinien znaleźć się w przedziale $\bar{x} \pm 2s$, tj. $\bar{x} \pm 0,5$ log. Oszacowana w ten sposób precyzja dla IPMA wyniosła $\bar{x} \pm 0,3$ log.

Analiza uzyskanych wyników dotyczących ewentualnej liniowości metody wskazuje na pewne rozbież-

Tab. 3. Wyniki badania stabilności utrwalonych hodowli komórek

Czas przechowywania	Nr próbki										\bar{x}	s
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Płytką przygotowaną <i>ex tempore</i>	2,8	2,8	2,5	2,8	2,5	2,8	2,5	2,5	2,8	2,8	2,68	0,15
Płytką przechowywaną 6 miesięcy	2,8	2,5	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,5	2,74	0,13

Wykazana w badaniach ściśle współzależ-

ność między wynikami uzyskanymi a oczekiwanymi. Pamiętając jednak o specyfice metod immunologicznych należy zauważyć, że stwierdzona zależność jest znacząca. Zwraca uwagę fakt, że każdej zmianie stężenia przeciwciał towarzyszy wyraźna reakcja układu detektorowego. Wiążące rozstrzygnięcie kwestii liniowości (lub jej braku) możliwe byłoby po wykonaniu oznaczeń w więcej niż 3 powtórzeniach.

Podsumowując należy stwierdzić, że IPMA jest dobrą alternatywą dla testu SN. Niewątpliwą zaletą z praktycznego punktu widzenia jest jego względna prostota i krótki czas wykonania. W zakresie objętym badaniami wykazano, że IPMA pozwala dokonać oznaczenia poziomu swoistych dla CDV przeciwciał z akceptowaną dokładnością i powtarzalnością. Przeprowadzona charakterystyka metody jest zgodna z wymaganiami zamierzonych zastosowań, do których można zaliczyć m.in.:

- monitorowanie statusu immunologicznego szczeniąt przed i po szczepieniu,
- monitorowanie poziomu swoistej odporności humoralnej populacji.

Piśmiennictwo

1. Appel M., Robson D. S.: Microneutralization test for canine distemper virus. Am. J. Vet. Res. 1973, 34, 1459-1463.
2. Baker G. A., Gorham J. R., Leader R. W.: Studies on an in ovo neutralization test for distemper. Am. J. Vet. Res. 1954, 15, 102-107.
3. Brandt S. L., Shen D. T., Gorham J. R.: Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. Am. J. Vet. Res. 1982, 43, 2266-2269.
4. Chalmers W. S. K., Baxendale W.: A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for prevention of canine distemper in young puppies. Vet. Rec. 1994, 135, 349-353.
5. Górska C.: Namnażanie wirusa nosówki w hodowli komórek. Medycyna Wet. 1968, 24, 565-569.
6. Górska J., Górska Cz.: Wyosobnienie wirusa nosówki od lisów hodowlanych w Polsce i jego identyfikacja. Medycyna Wet. 1967, 23, 725-728.
7. Levander J. F., Bewsey B. J.: Immunogenicity of canine distemper virus vaccine produced in a continuous cell line (LLC-MK₂ cells). Am. J. Vet. Res. 1973, 34, 1189-1194.
8. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris 1992, s. 114.
9. Mayr A., Bachmann P. A., Bibrack B., Wittmann G.: Virologische Arbeitsmethoden. T. 2, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1977, s. 511.
10. Mizak B., Borowski A.: Zastosowanie testu PLA do oceny namnażania wirusa nosówki, adenowirusa typu 1 oraz parwowirusa psów w hodowlach komórkowych. Medycyna Wet. 1998, 54, 753-756.
11. Olson P., Finnsdóttir H., Klingeborg B., Hadhammar Å.: Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. Vet. Rec. 1997, 141, 654-655.
12. Pawlaczek J., Zajac M.: Walidacja metod analizy chemicznej. Akademia Medyczna, Poznań 1999.
13. Pejsak Z.: Zastosowanie testu immunoperoxydazowego do wykrywania obecności wirusa pomoru klasycznego świń. Medycyna Wet. 1993, 49, 265-267.
14. Rułka J., Wójcik J., Buzała G.: Test immunoperoxydazowy w diagnostyce zakażeń wirusem białaczki bydła. Medycyna Wet. 1995, 51, 738-740.
15. Wójcik J.: Zastosowanie testu IPMA do wykrywania przeciwciał dla herpeswirusa kotów (FHV-1) w Polsce. Medycyna Wet. 1996, 52, 40-42.