

# Nowe szybkie testy do diagnostyki post mortem BSE

MIROSLAW P. POLAK, MAGDALENA LARSKA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Polak M. P., Larska M., Żmudziński J. F.

## New rapid tests for BSE post mortem diagnosis

### Summary

The article reviews the results of another evaluation run of rapid tests for diagnosing transmissible Spongiform Encephalopathy in cattle. Five out of eight submitted diagnostic kits were tested for sensitivity, specificity and limiting detectable levels of PrP<sup>Sc</sup> protein. Two tests were 100% sensitive and specific. Although other tests were below 100% of analyzed features (97.9% for sensitivity and 99.3% for specificity) this only indicated one misdiagnosed sample because of the low number of samples tested. The results show that all the tests could be used for BSE diagnosis. However, the Scientific Steering Committee of the European Commission has decided that more tests should be done in field conditions because of the low number of samples analyzed in this study (only 200). This would make the evaluation results more reliable.

**Keywords:** BSE, diagnosis, rapid tests, specificity

27 marca 2002 r. Komisja Europejska wspólnie z Instytutem Materiałów Referencyjnych i Miar (IRMM) mieszczącym się w Geel, Belgia, opublikowała kolejny raport z oceny pięciu szybkich testów do pośmiertnej diagnostyki bydła w kierunku BSE ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse42\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse42_en.pdf)).

Wszystkie kraje Unii Europejskiej wprowadziły z dniem 1 stycznia 2001 r. obowiązkowe badania monitoringowe bydła w kierunku BSE przy pomocy szybkich testów diagnostycznych (1). Aktualnie w krajach UE dopuszczone do stosowania są trzy szybkie, pośmiertne testy diagnostyczne pozytywnie ocenione przez Komisję Europejską w 1999 r. ([http://europa.eu.int/comm/dg24/health/bse/bse12\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/dg24/health/bse/bse12_en.html)) (2, 3). Masowa skala badań monitoringowych prowadzonych w krajach członkowskich i duże zapotrzebowanie rynku na testy, jak również potrzeba usprawnienia pracy oraz przyspieszenia wykonywanych badań, skłoniły Komisję Europejską do wystąpienia do producentów nowych testów z ofertą oceny ich zestawów diagnostycznych pod względem przydatności do badań monitoringowych w kierunku BSE. Podobnie jak w poprzedniej ocenie analizowano czułość, specyficzność oraz możliwość wykrywania małych ilości białka PrP (rozcieńczana próbka dodatnia – symulacja przypadków subklinicznych). Czułość testu określano na podstawie liczby próbek pozytywnych, rozpoznawanych przez test jako pozytywne. Przy czułości równej 100% nie powinno być wyników fałszywie ujemnych. Specyficzność testu oceniano na podstawie liczby próbek uznanych za ujemne w stosunku do całkowitej liczby próbek ujemnych. Specyficzność testu równa 100% oznacza, że nie otrzymuje się wyników fałszywie dodatnich. Ocena granicznych poziomów wykrywalności białka PrP<sup>Sc</sup> (symulacja przypadków subklinicznych)

stanowi ważny wskaźnik ryzyka uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych w przypadku próbek zawierających patologiczną formę białka prionowego w niskim stężeniu (zwierzęta chore na BSE w fazie bezobjawowej choroby).

### Materiał i metody

Do oceny wybrano 5 spośród 8 zgłoszonych zestawów diagnostycznych. Liczbę badanych próbek ograniczono z 1400 (pierwsza ocena w 1999 r.) do 200 (aktualna ocena). Czułość oceniano w stosunku do 48 próbek dodatnich (potwierdzone jako dodatnie w badaniu histopatologicznym), zaś specyficzność wobec 152 próbek negatywnych w kierunku BSE (od zwierząt w wieku co najmniej 4 lat, pochodzących z Nowej Zelandii). Wyjściowy materiał do badań w kierunku wykrywania małych ilości białka PrP zmianowano na myszkach, uzyskując miano 10<sup>3.1</sup> LD<sub>50</sub>/g tkanki po zakażeniu domózgowym oraz dootrzewnowym. Materiał ten stosowano w postaci nierozcieńczonej oraz we wzrastających rozcieńczeniach od 10<sup>-1.0</sup> do 10<sup>-3.0</sup> w postępie co pół logarytmu.

Doświadczenie zebrane w trakcie masowych badań monitoringowych w kierunku BSE w 2000 r. wskazało, że właściwości badanych próbek mogą mieć wpływ na uzyskiwane wyniki. Na przykład świeże próbki, pobierane w rzeźni i przesyłane do laboratoriów diagnostycznych zawsze dawały wyższe odczyty w testach diagnostycznych w stosunku do próbek mrożonych (w takiej postaci przesyłano kodowane próbki do oceny testów). Fenomen ten określany jest angielskim terminem „commutability”. Także sposób homogenizacji badanych próbek może wpływać ujemnie na stężenie wykrywanego białka PrP. Prowadzone obecnie analizy powinny odpowiedzieć na pytanie, czy obniżenie sygnału reakcji jest wynikiem negatywnego wpływu sposobu homogenizacji na zachodzące reakcje biochemiczne, czy też związane jest z odmiennymi zasadami działania poszczególnych testów.

Aktualna ocena objęła testy następujących instytucji: ID Lelystad, Holandia (test A), Perkin Elmer Life Sciences, Zjednoczone Królestwo (test B), Prionics A.G., Szwajcaria (test C), CDI – UCSF Uniwersytet Kalifornia, San Francisco, USA (test D) oraz MRC Prion Unit, Imperial College, Zjednoczone Królestwo (test E).

#### Charakterystyka ocenianych testów:

Test A. ID Lelystad. Test oparty na technice dot-blot (punktowe nanoszenie badanej próbki na membranę), wykonywany w formie płytki 96-dółkowej, wynik uzyskuje się po 6 godzinach badania.

Test B. Perkin Elmer Life Sciences. Test oparty na izolacji rozpuszczalnej (PrP<sup>C</sup>) oraz nierozpuszczalnej (PrP<sup>Sc</sup>) frakcji białka prionowego, a sygnał reakcji białka PrP z przeciwciałem monoklonalnym znakowanym pierwiastkiem europ uzyskiwany jest z wykorzystaniem fluorescencji. Każda próbka badana jest w duplikacie, a całe badanie trwa 17 godzin (w tym 12 godzinna inkubacja nocna).

Test C. Prionics-Check LIA. Technika oparta na standardzie ELISA z detekcją sygnału metodą chemiluminescencyjną. Analiza obejmuje homogenat po trawieniu bez etapu oczyszczania czy też wirowania, co znacznie skraca czas badania. Badanie wykonuje się w płytkach 96-dółkowych, a wyniki uzyskuje się już po 4 godzinach. Zarówno technika ELISA, jak i format 96-dółkowy umożliwiają pełną automatyzację badań.

Test D. CDI – UCSF. Kanapkowy test immunoenzymatyczny z detekcją opartą na fluorescencji. Na obecnym etapie całość badania trwa poniżej 8 godzin. Cała procedura jest zautomatyzowana z użyciem robota do wszystkich pipetowań, łącznie z pobieraniem supernatantu po jego zwirowaniu.

Test E. MRC Prion Unit. Test immunoenzymatyczny z użyciem dwóch przeciwciał monoklonalnych. Wyniki uzyskuje się po 6 godzinach.

### Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane dla poszczególnych zestawów diagnostycznych przedstawia tab. 1. Biorąc pod uwagę wszystkie trzy oceniane parametry, najlepsze wyniki uzyskano przy użyciu testów D oraz E. Oceniając jedynie wyniki analizy czułości i specyficzności pięciu testów, można przyjąć, że wszystkie z nich okazały się bardzo dobre. Zanotowane różnice dotyczą zaledwie pojedynczych (dosłownie) próbek. Stąd Naukowy Komitet Sterujący Komisji Europejskiej zalecił zbadanie większej liczby próbek, aby uzyskane wyniki były bardziej wiarygodne. W trakcie oceny nowych testów zauważono, że homogenizacja wykonywana w „niesprzyjających” dla stabilności białka PrP warunkach (wysokie obroty podczas homogenizacji, wyższa temperatura homogenizacji itp.) może ujemnie wpływać na wynik badania. Zaobserwowano 30% spadek sygnału reakcji podczas badania próbek poddawanych dłuższej homogenizacji (3-minutowa zamiast

Tab. 1. Wyniki oceny pięciu testów do diagnostyki BSE

Parametr	Test A	Test B	Test C	Test D	Test E
<b>Czułość (48 próbek dodatnich)</b>	97,9% (47)	100%	97,9% (47)	100%	100%
<b>Specyficzność (152 próbki ujemne)</b>	100%	99,3% (151)	100%	100%	100%
<b>Rozcieńczenia:</b>					
<b>Nierozcieńczony</b>	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2
<b>10<sup>-1</sup></b>	4/4	1/4	4/4	4/4	8/8
<b>10<sup>-1,5</sup></b>			1 <sup>1</sup> (4 <sup>2</sup> )/4	2(2 <sup>3</sup> )/4	8/8
<b>10<sup>-2,0</sup></b>			0 <sup>1</sup> (4 <sup>2</sup> )/4	1(2 <sup>4</sup> )/4	7/8
<b>10<sup>-2,5</sup></b>				0(1 <sup>4</sup> )/4	2/8
<b>10<sup>-3,0</sup></b>				0(1 <sup>4</sup> )/4	0/8
<b>Materiał ujemny</b>				0(1 <sup>4</sup> )/5	2/10

Objaśnienie: 1 – badanie 5% homogenatu mózgowia, 1-godzinna inkubacja z proteinazą K; 2 – badanie 10% homogenatu mózgowia, 2-godzinna inkubacja z proteinazą K; 3 – graniczne wartości dodatnie, konieczność wykonania badania powtórnego, ale odczyt wyraźnie powyżej wartości odcięcia; 4 – graniczne wartości dodatnie, konieczność wykonania badania powtórnego

1-minutowej). Taka wydłużona homogenizacja prowadziła nawet do uzyskiwania negatywnych wyników w dwóch z trzech wcześniej pozytywnie ocenionych testów, dopuszczonych do badań monitoringowych w kierunku BSE. Prawdopodobne przyczyny zaniku sygnału ze strony białka PrP związane są z działaniem czysto mechanicznym podczas homogenizacji (głównie z powodu niszczenia agregatów PrP<sup>Sc</sup>). Stwierdzono również, że mogą występować znaczne różnice w stopniu wykrywalnego PrP<sup>Sc</sup> w próbkach pochodzących z różnych miejsc tego samego materiału wyjściowego (pień mózgu). Wyniki badań testami Prionics-Check LIA, CDI-UCSF oraz Bio-Rad Platelia-BSE wykazały 2-krotną różnicę wartości odczytu między fragmentami tkanki położonymi od siebie w odległości zaledwie 3 mm.

22 lutego 2002 r., po zapoznaniu się z powyższymi wynikami, Naukowy Komitet Sterujący Komisji Europejskiej wydał opinię na temat konieczności przeprowadzenia dodatkowej oceny pięciu nowych testów do diagnostyki BSE w warunkach terenowych. Oznacza to konieczność wykonania w laboratoriach diagnostycznych ponownej oceny czułości, specyficzności, jak również wpływu jakości badanej próbki na końcowy wynik badania w odniesieniu do wcześniej uznanych trzech szybkich testów. Liczba próbek dodatnich (potwierdzonych wcześniej jako dodatnie jednym z trzech dopuszczonych obecnie szybkich testów), które należy zbadać, aby czułość testu (przy 95% prawdopodobieństwie) była na poziomie co najmniej 98% (99%), powinna wynosić co najmniej 138 (258). Ze względów praktycznych przyjęto, iż badaniom poddane będzie 200 próbek dodatnich w kierunku BSE pochodzących z krajowych laboratoriów referencyj-



nych Szwajcarii, Niemiec, Wielkiej Brytanii, Irlandii, Portugalii, Włoch, Hiszpanii, Francji, Belgii i Holandii. Badania mają być przeprowadzone w przynajmniej dwóch krajowych laboratoriach referencyjnych. W celu zademonstrowania specyficzności danego testu na poziomie między 99,95% a 99,99% (z 95% prawdopodobieństwem), liczbę próbek do zbadania określono na poziomie 10 000. Będą one pochodzić od zwierząt zdrowych, które w badaniu jednym z trzech dopuszczonych obecnie testów diagnostycznych wypadną ujemnie. W warunkach terenowych wiele próbek poddawanych badaniu jest w złym stanie jakościowym (próbki autolizowane lub zanieczyszczone). Podjęto więc decyzję o przeprowadzeniu dodatkowej oceny nowych testów na 200 próbkach ujemnych złej jakości. Ponadto Naukowy Komitet Sterujący Komisji Europejskiej zalecił, aby laboratoria wykonujące ocenę każdego z nowych testów poddały dodatkowo analizie 200 próbek pochodzących od zwierząt z grupy wysokiego ryzyka.

Dane pochodzące z oceny mają być analizowane i gromadzone przez IRMM. Analiza statystyczna uzyskanych wyników i porównanie ich z wynikami już

ocenionych trzech szybkich testów będzie miała na celu potwierdzenie uzyskanych wyników, że nowe zestawy diagnostyczne, na równi z obecnie stosowanymi testami, są przydatne do pośmiertnej diagnostyki BSE. Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji Europejskiej (EC) nr 1053/2003 z 19 czerwca 2003 r., spośród pięciu nowych testów opisanych w powyższym artykule, do badań monitoringowych dopuszczono dwa zestawy diagnostyczne: „Prionics-Check LIA” oraz „InPro CDI-5” (opisany jako test CDI-UCSF). Oznacza to, że obecnie w krajach Unii Europejskiej można stosować pięć szybkich testów do diagnostyki BSE.

### Piśmiennictwo

1. Anon.: Rozporządzenie 2000/374/EC z dnia 5 czerwca 2000 r. wnoszące poprawkę do rozporządzenia 98/272/EC i wprowadzające szybkie testy diagnostyczne do monitorowania BSE.
2. Moynagh J., Schimmel H.: Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy [letter], *Nature* 1999, 400, 105.
3. Polak M. P., Żmudziński J. F.: Najnowsze informacje nt. laboratoryjnej diagnostyki gąbczastych encefalopatii (transmissible spongiform encephalopathies – TSE). *Medycyna Wet.* 2000, 56, 211-213.

Adres autora: dr Mirosław Polak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ppolak@piwet.pulawy.pl

## Studia specjalizacyjne z chirurgii weterynaryjnej

Katedra i Klinika Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu, z upoważnienia Komisji ds. Specjalizacji lekarzy weterynarii, ogłasza nabór na studia specjalizacyjne z chirurgii weterynaryjnej. Osoby zainteresowane mogą zgłaszać się do dnia 30 września 2003 r. Przewidujemy rozpoczęcie specjalizacji w lutym 2004 roku. Szczegółowe warunki w sprawie trybu i zasad uzyskania tytułu specjalisty przez lekarza weterynarii uregulowane zostały Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej z dnia 28 listopada 1994 roku, Dz. U. Nr 131. W myśl wyżej cytowanego Rozporządzenia, warunkiem przyjęcia lekarza weterynarii na studia specjalizacyjne jest wykazanie się co najmniej 2-letnim stażem pracy zawodowej. Wniosek kandydata ubiegającego się o przyjęcie na studia specjalizacyjne powinien zawierać:

- imię i nazwisko wnioskodawcy oraz datę i miejsce urodzenia,
- określenie miejsca zamieszkania (adres, telefony, fax),
- informacje o przebiegu pracy zawodowej z podaniem zajmowanych stanowisk,
- określenie aktualnego miejsca pracy i zajmowanego stanowiska,
- informacje o ukończonych kursach specjalistycznych,
- informacje o publikacjach.

Do wniosku należy dołączyć:

- odpis dyplomu lekarza weterynarii,
- odpis zaświadczenia okręgowej izby lekarsko-weterynaryjnej o stwierdzeniu prawa do wykonywania zawodu,
- deklarację co do pokrycia kosztów specjalizacji przez lekarza weterynarii lub zatrudniającego go zakład pracy.

Podania proszę kierować bezpośrednio na adres:

**Katedra i Klinika Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 50-366 Wrocław, pl. Grunwaldzki 51, do dnia 30. 09. 2003 r.**

Jednym z warunków przyjęcia na studia będzie kolejność zgłoszeń kandydatów. Ilość miejsc ograniczona.

Osoby zainteresowane specjalizacją z chirurgii mogą uzyskać informację w tej sprawie w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydz. Med. Wet. AR we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 51, tel.: 071-320 53 50, 071-320 53 55.