

ANDRZEJ SALWA, BEATA DONDESKA

Badania porównawcze przydatności odczynu seroneutralizacji i odczynu ELISA w serodiagnostyce otrętu u bydła

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

Summary

The value of VN and ELISA tests in the serodiagnosis of IPV-IBR of cattle

For detecting antibodies against IPV-IBR there were used two serological methods, i.e. the virus neutralization and ELISA tests. The tests were compared using 1277 samples of blood. A high degree of correlation between two methods was observed. However, the ELISA proved to be more sensitive and therefore it should be applied particularly during mass control examinations of cattle.

W ostatnich latach obserwuje się nasilenie zakażeń wirusem IBR/IPV (BHV-1), które u buhajów może przebiegać pod postacią pęcherzykowego lub wrzodziejącego zapalenia błony śluzowej napletka i prącia. U krów podobne zmiany występują w błonie śluzowej sromu i pochwy (19, 20, 21). Zakażenie wirusem IBR/IPV nie zawsze manifestuje się zachorowaniem z widocznymi objawami klinicznymi. Liczne badania wykazały istnienie zakażeń latentnych, przy których klinicznie zdrowe zwierzęta mogą nawet przez całe życie być nośnikami wirusa (8, 17, 21).

Określenie miana swoistych przeciwciał w surowicy krwi bydła jest jedną z podstawowych metod w diagnostyce zakażeń BHV-1, stosowaną w celu wykrycia w stadach krów seroreagentów dla oceny sytuacji epizootycznej. W rutynowej diagnostyce serologicznej tej jednostki chorobowej zastosowanie znalazł odczyn seroneutralizacji i liczne jego modyfikacje (2, 4, 5). Oprócz wymienionego odczynu stosowany jest odczyn wiązania dopełniacza, odczyn biernej hemaglutynacji, odczyn precypitacji w żelu agarowym oraz metoda radioimmunologiczna (12, 16, 18). Odczyn seroneutralizacji, który wykonuje się w oparciu o hodowlę komórkową, jest metodą pracochłonną i czasochłonną. W związku z tym zainteresowanie wzbudziła metoda immunoenzymatycznego wykrywania przeciwciał w surowicy krwi przy pomocy odczynu ELISA. Charakteryzuje się ona dużą czułością swoistością i prostotą wykonania pozwalającą na jednoczesne wykonanie dużej ilości badań (6, 9, 11, 13, 19).

Celem powyższej pracy było porównanie wyników dwóch metod wykrywania przeciwciał anty IBR/IPV za pomocą odczynu seroneutralizacji i metody ELISA.

Materiał i metody

Badaniu poddano surowice krwi 1277 krów ozdrowieńców w wieku od 1 roku do 6 lat. Zwierzęta pochodziły z kilku stad, z gospodarstw uspołecznionych, w których wcześniej stwierdzono kliniczną postać otrętu bydła. Powyższe badania przeprowadzono w okresie jesienno-zimowym w latach 1988—1989. Badania serologiczne wykonano przy pomocy odczynu seroneutralizacji metodą beta w oparciu o efekt cytotatyczny w hodowli komórkowej jądra cięłego (HKJC) przy użyciu dawki 100 TCID₅₀ wirusa IBR/IPV (2). Wykrycie przeciwciał swoistych w rozcieńczeniu surowicy 1:2 uznano za wynik dodatni. Odczyn ELISA wykonano za pomocą zestawu odczynników Enzygnost IBR/IPV (Behringwerke AG, Morburg W. Germany)

wg instrukcji podanej przez producenta. Surowice krów badano w rozcieńczeniu 1:20. Wynik rejestrowano czytnikiem mikroelisa i przyjmowano za wynik dodatni, jeżeli ekstynkcja badanej próbki była wyższa od wartości progowej podanej przez producenta. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, oceniając zależność między wynikami uzyskanymi w odczynie seroneutralizacji a wynikami testu ELISA. Posługiwano się przy tym współczynnikiem korelacji liniowej (r). Obliczono również względną czułość i swoistość SN i ELISA (7).

Wyniki i omówienie

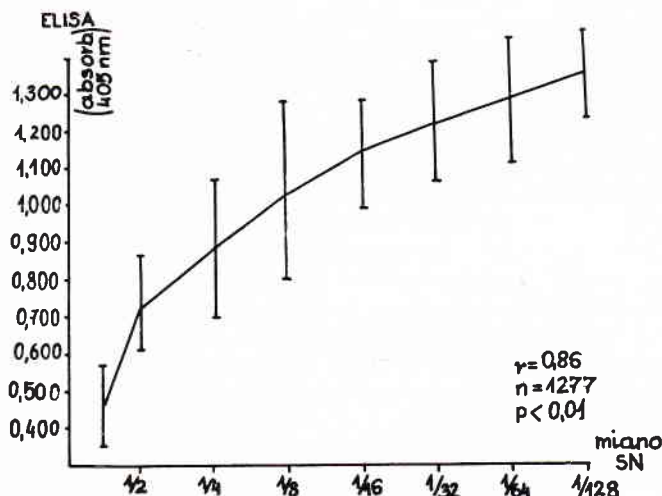
Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tab. 1 i 2 oraz na ryc. 1. Wykazano, że testem ELISA reaguje dodatnio o 2,8% surowic (36 próbek) więcej niż w odczynie seroneutralizacji. Wśród wszystkich badanych surowic uzyskano tylko 1 wynik rozbieżny, ujemny w teście ELISA, a dodatni w odczynie SN, co nie wydaje się być istotne przy tak dużej liczbie testowanych surowic. Wyjaśnienia stwierdzonej różnicy

Tab. 1. Zestawienie wyników badań 1277 surowic krów i jałówek w kierunku obecności przeciwciał anty-IBR/IPV

Metoda		Liczba i odsetek próbek surowicy
SN	ELISA	
+	+	726 (56,9%)
-	-	514 (40,3%)
+	-	1 (0,1%)
-	+	36 (2,8%)

Tab. 2. Względna czułość i swoistość testu SN i ELISA w wykrywaniu przeciwciał anty-IBR/IPV

	Względna	
	czułość	swoistość
SN względem ELISA	95,00%	99,80%
ELISA względem SN	99,86%	99,80%



Ryc. 1. Schemat korelacji (r) między wartościami odczynu ELISA a odczynem SN

między wynikami można doszukiwać się w odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego, kształtującej się w trakcie zakażenia wirusowego. Istotną rolę odgrywa czas upływający od momentu zakażenia wirusem do pojawienia się we krwi poszczególnych klas immunoglobulin. Jak wskazują dane z piśmiennictwa we wczesnym stadium choroby pojawiają się pierwsi przeciwciała antywirusowe klasy IgM, a dopiero później przeciwciała klasy IgG (13, 14). Największe ich stężenie w surowicy stwierdza się dopiero po około dwóch tygodniach. Na uwagę zasługują wyniki badań Rodaka i wsp. Autorzy ci wykazali, że u bydła zakażonego eksperymentalnie wirusem IBR/IPV pierwsze przeciwciała z klasy IgM pojawiają się w ósmym dniu po zakażeniu, a IgG dopiero w 11—17 dniu po wniesieniu wirusa do organizmu (18). Zastosowanie testu ELISA pozwala na jednoczesne oznaczanie przeciwciał w klasach immunoglobulin IgM i IgG. Jest to zagwarantowane użyciem koniugatów — przeciwciał sprzężonych z peroksydazą, swoistych dla fragmentu Fc bydłych IgG i łańcucha u bydłych IgM, wyprodukowanych przez firmę Behringwerke A.G.

Względna czułość i swoistość odczynu seroneutralizacji i testu ELISA przedstawiono w tab. 2. Obliczone wskaźniki wskazują na mniejszą czułość odczynu SN względem testu ELISA. Stopień korelacji między wynikami uzyskanymi przy pomocy odczynu SN i odczynu ELISA ilustruje tab. 1. Współczynnik ten był wysoki i wynosił dla wszystkich badanych próbek surowicy $r = 0,86$. Wysoki stopień korelacji między wynikami uzyskanymi przy pomocy tych odczynów stwierdzili także inni autorzy (9, 11, 13, 15, 19). Dotyczy to zarówno diagnostyki serologicznej, zakażeń wirusem IBR/IPV, jak i choroby Aujeszkiego, wirusowej biegunki bydła, parainfluenzy-3 u bydła, nosówki psów (1, 3, 7, 10). Jak to wspomniano we wstępie pracy, odczyn ELISA, poza dużą czułością umożliwiającą wykrycie nawet niewielkiej ilości przeciwciał w surowicach o mianach poniżej efektu neutralizacji, jest testem tańszym, szybszym, pozwalającym na przeba-

danie w krótkim czasie dużej ilości próbek. Oceniając przydatność praktyczną metody ELISA i odczynu SN należy podkreślić, że ta druga metoda wymaga specjalnego zaplecza laboratoryjnego, przygotowania odpowiednich hodowli komórkowych, czystości i jałowości szkła laboratoryjnego. Problemem są również bardzo często występujące zakażenia bakteryjne i czynniki toksyczne występujące w badanej próbce surowicy, z czym spotkano się w trakcie prowadzonych badań.

Przeprowadzone badania wykazały, że metoda ELISA jest metodą czulszą w porównaniu do odczynu SN i pozwala na wykrycie większego odsetka zakażeń wirusem IBR/IPV, w związku z tym w diagnostyce serologicznej otrętu bydła można zalecić test ELISA.

Piśmiennictwo

1. Assaf R., Montpetit C., Marsolais G.: *Can. J. Comp. Med.* 47, 140, 1983.
2. Baczyński Z.: Wirusologiczna technika i diagnostyka weterynaryjna. J. W. Puławy, 1985.
3. Bernard S., Shen D., Gorham J.: *Am. J. Vet. Res.* 43, 12, 2266, 1982.
4. Bitsch V.: *Acta vet. scand.* 11, 606, 1970.
5. Bitsch V.: *Acta vet. scand.* 19, 497, 1978.
6. Bommeli W., Kihm U., Lazarowicz M., Steck F.: *Int. Symp. Vet. Lab. Diag.* 2, 235, 1980.
7. Carumean L., Douart A., Lecoanet J.: *Rec. Med. Vet.* 164, 381, 1988.
8. Castrucci G., Cilli V., Frigeri F., Ferrari M., Ranucci S., Rampichini L.: *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 6, 193, 1983.
9. Cho H., Bohac I.: *Can. J. Comp. Med.* 49, 189, 1985.
10. Durham P., Sillars H., Hobbs I.: *N. Z. vet. J.* 33, 132, 1985.
11. Edwards S., Woods S., Westcott D., Emmerson M., Jones P., Phillips A.: *Res. Vet. Sci.* 41, 378, 1986.
12. Eugster A., Angulo A.: *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Ass.* 77, 615, 1973.
13. Herring A., Netteleton P., Burrells C.: *Vet. Rec.* 107, 155, 1980.
14. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa, 1982.
15. Liauw H., Eugster A.: *Southwest. vet.* 37, 47, 1986.
16. Lejeune J., Hart, Larson A., Seger C.: *Am. J. Vet. Res.* 38, 459, 1977.
17. Pastoret P., Thiry E.: *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 35, 1985.
18. Rodak L., Pospisil Z., Hampl J.: *Zbl. Vet. Med. B*, 30, 708, 1983.
19. Riegel C., Ayees V., Collins J.: *J. Clin. Microbiol.* 25, 12, 2418, 1987.
20. Salwa A.: *Medycyna Wet.* 43, 553, 1986.
21. Thiry E., Saliki J., Bublót M., Pastoret P. P.: *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 59, 1987.
22. Zmudzinski J.: Charakterystyka i podstawy zwalczania zakażeń wirusem otrętu u buhajów. Praca hab. I. W. Puławy, 1987.

Adres autora: dr Andrzej Salwa, ul. Chałubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk

PRZEMYT NARKOTYKÓW PRZEZ LEKARZA WET. W WB

Brytyjska Izba Lekarsko-Weterynaryjna ogłosiła ostatnio o skreśleniu z rejestru lekarzy wet. dr. M. B. H. Munro za przemyt narkotyków. Wymieniony zatrzymany został przez władze celne w porcie Portsmouth, na podstawie informacji, kiedy próbował przemycić w przewożonej, na przyczepie samochodowej, łodzi motorowej 60 kg żywicy konopi indyjskich, służących do wytwarzania narkotyków. Wartość rynkowa surowca oceniono na 250 tysięcy funtów. W łodzi znaleziono także dwa duplikaty paszportów, ze stemplami pobytu w Maroku oraz rewolwer. Dr. Munro skazany został na 4 lata więzienia.

d. t.

JAK ODŻYWIĄ SIĘ 80-LATKI

Na Uniwersytecie w Giessen, RFN przeprowadzono analizę sposobu odżywiania, drogą dokładnie określonej ankietyzacji, jak odżywiają się i to na przestrzeni wielu lat ludzie, którzy przekroczyli 80 rok życia. Byli to wszyscy zupełnie zdrowi osobnicy. Okazało się, że przez całe swe życie spożywali codziennie różnorodne środki spożywcze, w tym każdego dnia mięso, jaja i produkty mleczne. Godnym uwagi było, że w grupie tej nie było żadnego wege-

tarianina, ani też stosującego specjalne odżywianie alternatywne.

d. t.

PROBLEMY ZE STOSOWANIEM STYMULATORÓW WZROSTU W KRAJACH EWG

Stosownie do zalecenia Parlamentu Zachodnio-europejskiego poszczególne kraje EWG winny wprowadzić na drodze zarządzeń zakaz stosowania u zwierząt stymulatorów wzrostu. Objęte mają być zakazem nie tylko hormony, ale także preparaty z grupy tzw. beta-antagonistów. Problem dotyczy nie tylko ewentualnej szkodliwości pozostałości tych związków w tkankach zwierząt dla ludzi-konsumentów, ale także nadprodukcji mleka i mięsa. Kraje Europy Zachodniej posiadają tak wysoką produkcję tych środków spożywczych, że istnieją już obecnie duże trudności z ich zbytym, co rzutuje następnie na rentowność gospodarki rolnej. Mimo tych zaleceń stymulatory wzrostu ciągle są nielegalnie stosowane. Ostatnio wykryto w Belgii zorganizowaną akcję rozprowadzania tych preparatów wśród producentów bydła. Zamieszani są w tym także lekarze wet., którzy z tego niedozwolonego procederu mają niemałe korzyści materialne.

d. t.