

KRZYSZTOF SZULOWSKI, JÓZEF PILASZEK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

# Zestaw ELISA do badania surowic świń w kierunku brucelozy

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

## Summary

An ELISA – kit for the examination of swine sera for brucellosis

The aim of the study was to develop an ELISA – kit for the examination of swine sera for brucellosis. Lipopolisaccharide (LPS) obtained from the smooth strain of *Brucella abortus* S 19 was used as the antigen.

The above – mentioned ELISA – kit was demonstrated to be specific and sensitive. When testing 87 sera from swine suspected for brucellosis, 81 positive results were obtained in the complement fixation test (CFT), 84 positive results in the ELISA and 78 positive results in the Rose Bengal test (RBT). As it was seen, the sensitivity of the ELISA in comparison with RBT and CFT was highest.

When testing 7721 sera during the serological monitoring of clinically healthy pigs, all the investigated sera were negative in the ELISA, whereas 6 sera reacted positively in RBT, but these results were not confirmed in further serological examination – in the CFT. This indicates that the specificity of RBT was lower in comparison with the ELISA.

To sum up the developed and evaluated ELISA – kit is superior to other tests used at present for serological monitoring of brucellosis in swine and should be introduced for practical use.

Bruceloza świń jest chorobą zakaźną, wywoływaną przez serotypy 1, 2 i 3 *Brucella suis*. Świnie są również wrażliwe na zakażenie *B. abortus* i *B. melitensis*, ale brak jest doniesień na temat naturalnych przypadków zachorowań wywołanych przez te gatunki (8).

U świń, podobnie jak u innych gatunków zwierząt domowych, najważniejszym objawem jest roniecie. Występuje ono w dowolnym okresie ciąży. Może obejmować do 80% macior w stadzie. Ponadto, typowymi objawami są okresowa lub stała bezpłodność, kulawizna, porażenia zadu, a u samców zapalenie jąder, zwykle jednostronne, prowadzące do obniżenia lub całkowitej utraty zdolności rozplodowych. Rzadziej dochodzi do zapalenia macicy i powstawania ropni w różnych okolicach ciała (9). U świń zdarza się również bezobjawowy przebieg brucelozy, jak również nawroty tej choroby u osobników po przebytej brucelozie, po okresie ujemnego reagowania w odczynach serologicznych (1).

Serotypy 1 i 3 *B. suis* są szczególnie patogenne dla ludzi. Najbardziej narażone na zakażenie są osoby bezpośrednio kontaktujące się z chorymi zwierzętami, zwłaszcza w okresie porodów lub ronień oraz osoby pracujące

w laboratoriach, zajmujące się izolacją i hodowlą tych drobnoustrojów.

Diagnostyka brucelozy świń opiera się głównie na badaniach serologicznych i jeśli to możliwe bakteriologicznych. Badanie serologiczne jest szczególnie użyteczne przy badaniu wszystkich zwierząt w stadzie (8, 9). Badanie tym sposobem pojedynczych osobników może być zawodne, ponieważ niewielki odsetek sztuk zakażonych daje wyniki ujemne (9). Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Urzędu Epizootii - OIE (8), w diagnostyce serologicznej brucelozy świń stosuje się preparaty antygenowe sporządzone ze szczepu *B. abortus*. Przeciwciała będące wynikiem zakażenia *B. suis* reagują bowiem krzyżowo z tego rodzaju powszechnie używanymi preparatami. Zgodnie też z wymienionymi zaleceniami (8) w diagnostyce serologicznej brucelozy świń powinno się stosować zbuforowany płytowy test aglutynacyjny z antygenem *B. abortus*, którego odmianą jest stosowany w Polsce odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP). OIE zaleca też próbę immunoenzymatyczną ELISA. Nie zaleca się natomiast innych testów, jak stosowane w Polsce w diagnostyce serologicznej brucelozy świń: odczyn aglutynacji probówkowej (4) i jego modyfikacja – odczyn z 2 merkaptotetanolem (7) oraz odczyn wiązania dopełniacza (2).

Celem obecnej pracy była ocena przydatności opracowanego we własnym zakresie zestawu ELISA w przeglądach serologicznych świń w kierunku brucelozy.

## Materiał i metody

Szczep bakteryjny. Materiałem wyjściowym do otrzymywania preparatu antygenowego była 10% zawiesina w płynie fizjologicznym zabitych termicznie (65°C przez 30 min.) bakterii *B. abortus* S19\*).

Otrzymywanie wyciągu lipopolisacharydowego (LPS). Ekstrakcji LPS dokonywano według Redfearna (11). Użyto do tego 100 ml 10% zawiesiny *B. abortus* S19, którą odwirowano przy 3500 obr./min. w 4°C. Do otrzymanego osadu bakterii dodano 36 ml wody destylowanej i mieszano w łaźni wodnej w temperaturze 66-67°C przez 20 minut. Następnie dodano 46,5 ml 90% roztworu wodnego fenolu i ponownie mieszano w łaźni wodnej w temp. 66-67°C przez 25 min. Preparat po wyjściu z łaźni szybko schłodzono w łaźni lodowej do temp. poniżej 10°C. Następnie wirowano przy 13 000 g przez 15 min. w 4°C, po czym zebrano płyn z nad osadu (frakcja fenolowa) i filtrowano go przez filtr Whatman 3 pod niewielkim ciśnieniem. Uzyskano 28 ml przesączu, do którego dodano 3 objętości zimnego metanolu (83 ml alkoholu metylowego z dodatkiem 1 ml metanolowego nasyconego roztworu octanu sodu). W ten sposób otrzymany preparat mieszano w temp. pokojowej przez 5 min., po czym roztwór pozostawiano w 4°C przez

\* Otrzymano od lek. wet. M. Helskiego, Puławskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego, Puławy.

1 godz. w celu precypitacji. Powstały precypitat odwirowano przy 6000 g przez 15 min. Płyn z nad osadu odrzucano, zaś do uzyskanego osadu dodawano łącznie 20 ml wody dest., po czym całość mieszano w kolbce mieszadłem magnetycznym w 4°C przez 15 godzin. Kolejno, zawartość kolbki wirowano przy 10 000 g przez 15 min. w 4°C. Zebrano płyn z nad osadu, a pozostały osad zalano 20 ml wody dest., rozbito w mikserze, po czym mieszano w 4°C przez 1 godz., używając mieszadła magnetycznego, ponownie wirowano i następnie oddzielono płyn od osadu. Czynności te powtórzono jeszcze raz. Uzyskane 3 porcje płynu z nad osadu poddano dializie w stosunku do wody destylowanej przez 18 godz., zmieniając ją kilkakrotnie. Po dializie, do posiadanej ilości płynu dializowanego (około 60 ml), dodano podwójną ilość zimnego metanolu, mieszano 5 min. w temp. pokojowej, potem pozostawiono na 2 godz. w 4°C. Powstały precypitat wirowano przy 10 000 g przez 15 min., uzyskany osad rozpuszczano w 20 ml wody redestylowanej, a następnie dializowano w stosunku do wody destylowanej przez kolejnych 18 godz. W ten sposób otrzymany ekstrakt bakteryjny, stanowiący lipowielocukier pałeczek *B. abortus* S19 (LPS) rozlano po 0,5 ml, liofilizowano a następnie ważono. Każda porcja zawierała 1,5 mg.

Surowice badane. W badaniach wykorzystano 87 surowic pochodzących od świń ze stada podejrzanego o zakażenie pałeczkami *Brucella* oraz 7721 surowic świń nie podejrzanych o zakażenie.

OKAP i OWD. Testy te wykonano według obowiązujących instrukcji (2, 3).

Zestaw diagnostyczny ELISA. Użyto mikropłytek, zawierających 96 baseników (Medlab, Polska). Baseniki opłaszczono preparatem LPS, stosując jego roztwór w buforze węglanowym ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) o pH 9,6, w stosunku 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Opłaszczenie wykonano w temp. pokojowej przez 18 godzin. Po tym czasie płytki płukano w PBST (PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20). Następnie dodawano surowice pochodzące od świń badanych w rozcieńczeniu 1:200, w ilości 100  $\mu\text{l}$ /basenik i surowice stanowiące kontrolę próby. Na każdej płytce umieszczano jako kontrolę: surowicę świńską silnie dodatnią (K++), surowicę słabo dodatnią (K+) i surowicę ujemną (N). Surowicę K++ przygotowano przez zmieszanie w równych ilościach 19 porcji surowic świń dodatnich w OWD. Jej miano w OWD wynosiło 640 międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz (mjpwd). Surowicę K+ uzyskano przez rozcieńczenie surowicy K++ w surowicy ujemnej, do stężenia 10 mjpwd. Na tym poziomie ustalono wartość graniczną (ang. cut off) dla badanych zestawem ELISA surowic. Próbę ujemną (N) stanowiła surowica sporządzona przez zmieszanie 10 surowic od świń wolnych od brucelozy, nie reagujących dodatnio w OKAP i OWD. Po 90 min. inkubacji pod przykryciem, w temp. pokojowej płytkę 3-krotnie płukano w PBST, używając do tego płuczki automatycznej (Labsystems Multiwash, Finlandia). Kolejno dodawano do każdego basenika koniugat przeciwciał przeciw immunoglobulinie świńskiej z peroksydazą chrzanową (DAKO A/S, Dania) w rozcieńczeniu roboczym 1:4000, w ilości 100  $\mu\text{l}$ /basenik, po czym inkubowano 60 min., pod przykryciem, w temp. pokojowej. Następnie płukano mikropłytki jak poprzednio, a potem dodawano substrat enzymatyczny ABTS (Sigma, USA) z  $\text{H}_2\text{O}_2$ , w ilości 100  $\mu\text{l}$ /basenik. Wyniki odczytywano w czytniku do mikropłytek (Multiskan, Multisoft, Lab-systems), przy długości fali 405 nm, w chwili, gdy wartość absorpcji (A) K+ przekraczała 0,250, co miało miejsce po ok. 10 min. Dla wszystkich prób wyznaczano współczynnik Z, równy ilorazowi wartości absorpcji badanej próby i absorpcji kontroli K+ [ $A(\text{bad. próby})/A(\text{K+})$ ]. Wszystkie próby surowic, dla których wartość Z przekraczała lub była równa 1 klasyfikowano jako dodatnie.

## Wyniki i omówienie

W ocenianym zestawie ELISA wykorzystano jako antygen LPS *B. abortus* oraz koniugat, swoisty dla białek surowicy świń, który reaguje głównie z przeciwciałami klasy IgG (8, 10). Fakt ten ma wpływ na swoistość odczynu; w ten bowiem sposób eliminowane są reakcje fałszywie dodatnie, które towarzyszyłyby użyciu innego rodzaju preparatu antygenowego, np. całych komórek *B. abortus* i koniugatu skierowanego przeciwko różnym klasom przeciwciał. W zastosowanym układzie nie są wykrywane przeciwciała IgM, odpowiedzialne w wielu przypadkach za reakcje nieswoiste (4, 8, 10). Czulość zestawu ustalono na poziomie surowicy kontrolnej K+, o mianie w OWD odpowiadającym 10 mjpwd.

Należy nadmienić, że w przypadku świń, w odróżnieniu od bydła, nie istnieją surowice standardowe referencyjne, które można by wykorzystać do ustalenia poziomu czulości testu. Z tego powodu użyto surowice terenowe, pochodzące od świń zakażonych, dodatnio reagujące w OWD. W celu znacznego zredukowania zjawiska braku prostej zależności pomiędzy wysokością miana surowicy w OWD, wyrażoną w mjpwd, a wartością absorpcji w ELISA, co stwierdzano w przypadku surowic bydłowych (10, 11), dokonano zmieszania 19 różnych surowic dodatnich i ustalenia miana mieszaniny, rozcieńczonej w surowicy ujemnej, na poziomie 10 mjpwd. Dzięki temu poziom przeciwciał IgG zawartych w K+, reagujących w ELISA, nie jest już tak przypadkowy w stosunku do przeciwciał aktywnych w OWD, jak w przypadku indywidualnej próbki surowicy. Wartość graniczną kontroli K+ ustalono na stosunkowo niskim poziomie (10 mjpwd to granica przedziału pomiędzy surowicami ujemnymi i wątpliwymi w OWD), zapewniającym odpowiednią czulość metody.

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań 87 surowic, pochodzących od świń ze stada podejrzanego o zakażenie pałeczkami *Brucella*. W ELISA uzyskano 84 wyniki dodatnie, podczas gdy w OKAP 78, zaś w OWD 81 wyników pozytywnych. Spośród 9 surowic ujemnych w OKAP, 3 reagowały ujemnie w OWD i te same surowice oceniono jako ujemne w ELISA. Pozostałe 6 surowic posiadało stosunkowo niskie miano w OWD (10-23,3 mjpwd) i niskie wartości współczynnika Z w ELISA (1,03-1,76 – tab. 2). Wszystkie surowice dodatnie w OKAP reagowały dodatnio w ELISA, podobnie było z surowicami dodatnimi w OWD. Oznacza to, że współczynnik określający czulość badanego zestawu względem OKAP i OWD wyniósł 100% (tab. 3). Osiągnięcie tak wysokiego poziomu czulości zestawu diagnostycznego nie pociągnęło za sobą obniżenia jego swoistości. Dowodem tego są wyniki badań 7721 surowic zdrowych świń monitorowanych w kierunku brucelozy. W badaniach tych uzyskano 6 wyników dodatnich w OKAP. Wyników tych nie potwierdzono w OWD i w ELISA (tab. 4).

Tab. 1. Wyniki badań w kierunku brucelozy surowic świń pochodzących ze stada podejrzanego o zakażenie

Wynik	OKAP	OWD*	ELISA
Dodatni	78	81	84
Wątpliwy	–	3	–
Ujemny	9	3	3

Objaśnienie: \* – za dodatni uważa się wynik stwierdzający co najmniej 20 międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz (mjpwd); 10–20 mjpwd to wynik wątpliwy, a poniżej 10 mjpwd – ujemny.

Tab. 2 Wyniki badań 9 surowic świni pochodzących ze stada podejrzanego o zakażenie, ujemnych w OKAP

Nr surowicy	OWD (mjpwd)	ELISA (Z)
1	-	0,69 (-)
2	23,3 (+)	1,22 (+)
3	11,6 (±)	1,34 (+)
4	23,3 (+)	1,31 (+)
5	10 (±)	1,03 (+)
6	23,3 (+)	1,09 (+)
7	-	0,90 (-)
8	-	0,85 (-)
9	11,6 (±)	1,76 (+)

Objaśnienie: w ELISA, bezwzględna wartość absorpcji kontroli K+ wyniosła 0,295, K++ 1,059, zaś N 0,131.

Tab. 3. Ocena czułości ELISA względem OKAP i OWD\*

ELISA/OKAP	78/78 = 100%
ELISA/OWD	81/81 = 100%

Objaśnienia: \* – wyrażona ilorazem (14):  
liczba surowic dodatnich w ELISA, spośród surowic dodatnich w OKAP  
całkowita liczba surowic dodatnich w OKAP

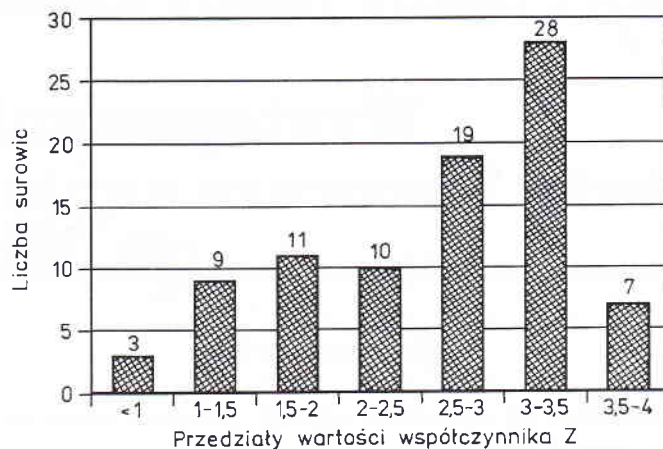
Tab. 4. Wyniki badań w kierunku brucelozy surowic świni pochodzących z badania monitoringowego pogłowia świni w Polsce

Liczba przebadanych surowic	OKAP		ELISA		Współczynnik swoistości* ELISA/OKAP
	+	-	+	-	
7.721	6	7.715	0	7.721	7715/7715 = 100%

Objaśnienia: \* – wyrażona ilorazem (14):  
liczba surowic ujemnych w ELISA, spośród surowic ujemnych w OKAP  
całkowita liczba surowic ujemnych w OKAP

Współczynnik określający swoistość ELISA względem OKAP, mierzony na populacji ujemnej wyniósł zatem również 100%

Liczba świni reagujących dodatnio w zakażonym pałeczkami *Brucella* stadzie różni się zależnie od czasu, w którym następuje badanie i możliwości ekspozycji na zakażenie. Niezależnie jednak od tych czynników, jak wynika z wykresu 1, do tego rodzaju badań najbardziej nadaje się zestaw ELISA w porównaniu do innych testów. Wyniki przeprowadzonych w obecnej pracy badań świadczą, że w zakażonym stadzie tylko nieliczne surowice świni reagowały ujemnie w ELISA (3 z 87, czyli 3,45%), bądź posiadały stosunkowo niedużą wartość współczynnika Z., mieszczącą się w przedziale 1,0-1,5 (9 z 87, czyli 10,34%). Najwięcej surowic znalazło się w przedziale 2,5-3,0 (19 przypadków – 21,84%) i 3,0-3,5 (32,18%). Dowodzi to, że w przypadku naturalnej infekcji w stadzie, poziom indukowanych przeciwciał anty-*Brucella* u większości osobników jest wystarczająco wysoki, aby dawał jednoznacznie dodatnie wyniki w ELISA. Dzięki temu można być więc

Ryc. 1. Wartości absorpcji surowic świni pochodzących ze stada podejrzanego o zakażenie pałeczkami *Brucella*, uzyskane w ELISA

stosunkowo pewnym, że o ile pojedyncze sztuki mogą reagować ujemnie, to badanie wszystkich osobników w stadzie zapewni wykrycie brucelozy, o ile ona występuje.

Reasumując, można stwierdzić, że sporządzony we własnym zakresie zestaw ELISA stanowi czułą, swoistą, szybką, stosunkowo prostą i taną metodę, przydatną i miarodajną w wykrywaniu przeciwciał anty-*Brucella* w surowicy świni. Cechy te uzasadniają wykorzystanie tego zestawu w przeglądach serologicznych w kierunku brucelozy świni.

#### Piśmiennictwo

1. Bilecki Ś.: Brucelozą zwierząt. PWRiL, Warszawa 1985.
2. Instrukcja nr 52 Min. Roln.-Dep. Wet. z dn. 31.05.1980 r. wykonywania odczynu wiązania dopełniacza w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
3. Instrukcja nr 55 Min. Roln. Gosp. Żywn.-Dep. Wet. z dn. 2.02. 1984 r. wykonywania odczynu kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt.
4. Instrukcja tymczasowa nr 15 Min. Roln.-Dep. Wet. z dn. 27.10.1964 r. w sprawie wykonywania badań na brucelozę za pomocą aglutynacji probówkowej.
5. Joint FAO/WHO Expert Comm. Brucellosis, Sixth Report, WHO, Genewa 1986.
6. Jones L. M.: Brucella Antigens and Serologic Test Results, w: Bovine Brucellosis – An International Symposium, red. Crawford R. P., Hidalgo R. J., Texas A & M University Press, College Station, 1977, s. 40.
7. Królak M., Stryczak A.: Standardowa technika odczynu z 2-merkaptotanollem (OME) w rozpoznawaniu brucelozy zwierząt, Wyd. Inst. Puławy 1979.
8. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines form Lists A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees, OIE, Paris 1995.
9. The Merck Veterinary Manual, A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and Control for the Veterinarian, Merck & Co., Inc., Rahway, USA 1991.
10. Nielsen K., Gall D., Kelly W., Hennig D., Garcia M.: Enzyme Immunoassay, Application to Diagnosis of Bovine Brucellosis, Agriculture Canada, Nepean 1992.
11. Redfearn M. S.: An immunochemical study of the antigens of Brucella extracted by the Westphal technique, Ph. D. Thesis, Univ. Wisconsin, Madison, USA 1960.
12. Szulowski K.: Medycyna Wet. 51, 607, 1995.
13. Williamson C. C., Oberem P. T., Poerstamper C., De Waal D. T., Matthee O., Brett O. L.: Onderstepoort J. Vet. Res. 55, 1, 1988.
14. Wright P.: Report on Indirect ELISA for the Detection of Bovine Antibody to Brucella abortus, Standards Comm. OIE, Paris 1994.

Adres autora: lek. wet. Krzysztof Szulowski, ul. Partyzantów 1, 24-123 Janowiec