

NIMFA STOJEK

Próba zastosowania testu ELISA do diagnostyki brucelozy u ludzi

Zakład Chorób Odzwierzęcych Instytutu Medycyny Wsi, ul. Jaczewskiego 2, 20-950 Lublin

Summary

An attempt to apply an ELISA test to the diagnostics of brucellosis in people

An ELISA test (made by Virotech) was used to detect specific antibodies against *Brucella spp.* The sera were collected from patients with fresh and chronic *Brucella* infections. The sera were also evaluated by means of an agglutination test, complement fixation test, agglutination with 2 ME test and Coombs test.

The results confirmed a high sensitivity and specificity of the ELISA test. The detected classes of antibodies (IgM, IgG, IgA) were characteristic for the stadium of the disease: IgM and partially IgG in fresh infections and IgA in chronic ones. It seems that incomplete antibodies, which are characteristic for chronic infections, are not detected by the tests used.

Immunoenzymatyczny test ELISA jest aktualnie jednym z najczęściej stosowanych testów w różnorodnych badaniach serologicznych (1, 4). Mimo, że w niektórych krajach jest już wykorzystywany w diagnostyce brucelozy, w dalszym ciągu trwają prace nad jego udoskonaleniem (2, 5, 6). Były próby, również w Polsce, zastosowania go do badania mleka w diagnozowaniu brucelozy u bydła (3, 7).

Celem pracy była ocena przydatności testu ELISA, firmy VIROTECH, do diagnostyki brucelozy u ludzi.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 40 surowicach pobranych od osób chorych na brucelozę, z czego 6 pochodziło od osób z zakażeniem świeżym i 34 od osób z zakażeniem przewlekłym. Wszystkie osoby świeżo zakażone podawały w wywiadzie, że pracowały w Hiszpanii przy strzyżeniu owiec w latach 1994-95. Osoby z zakażeniem przewlekłym w 78,2% przypadków miały postawioną diagnozę przed 5-20 laty. 82,5% chorych było zatrudnionych w służbie weterynaryjnej głównie jako lekarze weterynarii, pozostali pracowali jako trychinoskopiści, zootechnicy i rolnicy.

Badaniom poddano zestawy testu ELISA pozwalające na zidentyfikowanie przeciwciał klasy M, G, A. Test wykonano według metodyki zaproponowanej przez producenta a wyniki odczytywano na czytniku firmy ORGANON TEKNIKA.

Uzyskane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi w rutynowo stosowanych odczynach serologicznych w diagnostyce brucelozy u ludzi: odczynie aglutynacji Wrighta (OA), wiązania dopełniacza (OWD), aglutynacji z 2-merkaptotanołem (OME) i Coombsa (OC). Odczyny te wykonano zgodnie z metodyką obowiązującą w służbie zdrowia.

Wyniki i omówienie

U wszystkich osób z zakażeniem świeżym stwierdzono w teście ELISA obecność przeciwciał klasy M i 2 dodatkowo klasy G. U wszystkich badanych z tej grupy stwierdzono w testach rutynowych również wyniki dodatnie. Każda surowica reagowała dodatnio w OA i OC i 4 surowice dodatkowo reagowały dodatnio w OWD. Poziom wykrytych przeciwciał wszystkimi odczynami tradycyjnymi był wysoki – OA: 400-1600, OWD: 160-6400, OME: 100-400, OC: 1600-12 800. Przy porównaniu wyników u osób z zakażeniem świeżym otrzymanych w odczynach tradycyjnych i teście ELISA uzyskano 100% zgodności.

U osób z zakażeniem przewlekłym stwierdzono wyniki dodatnie w teście ELISA w 23 przypadkach (67,6%). Wykryte przeciwciała należały do immunoglobulin klasy G bądź A. W żadnej surowicy z tej grupy badanych nie stwierdzono obecności IgM. Wśród 34 osób z brucelozą przewlekłą 11 (32,3%) reagowało dodatnio w więcej niż jednym odczynie tradycyjnym, 14 (41,1%) reagowało dodatnio wyłącznie w OC i 9 (26,4%) ujemnie we wszystkich stosowanych testach rutynowych. Poziom wykrytych przeciwciał anty-*Brucella* wszystkimi odczynami rutynowymi u chorych przewlekle był niski. Uzyskane miana osiągnęły wartości graniczne (OA-OME: 25) lub nieco je przewyższały (OWD: 5-40, OC: 25-200).

Przy porównaniu wyników okazało się, że u wszystkich osób reagujących dodatnio w kilku odczynach tradycyjnych równocześnie, stwierdzono w teście ELISA również wyniki dodatnie. Zatem zgodność wyników wynosiła 100%. Spośród 14 osób, które reagowały dodatnio wyłącznie w OC stwierdzono w teście ELISA wyniki dodatnie u 5 osób, zgodność wyników wynosiła 35,7%. Wśród 9 osób reagujących ujemnie w stosowanych testach tradycyjnych stwierdzono w teście ELISA wynik dodatni u 7 osób, zgodność wyników wynosiła 22,2%. Produ-

Tab. 1. Wyniki badań przydatności testu ELISA do diagnostyki brucellozy

Rodzaj zakażenia	Wyniki dodatnie w odczynach	Liczba wyników	Wyniki w teście ELISA					
			ujemny	dodatni w klasie				
				IgM	IgM, IgG	IgG	IgA	IgG, IgA
Świeże	OA, OWD, OA, 2-ME, OC	6	–	–	2	–	–	–
	OA, OWD, OC		–	2	–	–	–	
	OA, OC		–	2	–	–	–	
Przewlekłe	OA, OWD, OME, OC	11	–	–	–	–	–	2
	OA, OC		–	–	–	–	1	3
	OVD, OC		–	–	–	–	–	5
	OC	14	9	–	–	3	2	–
	wyniki ujemne	9	2	–	–	2	1	4

cent badanego testu nie podaje informacji na temat zdolności wykrywania przeciwciał niekompletnych przy pomocy analizowanych zestawów. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że badany test nie wykrywa przeciwciał niekompletnych. Wyniki dodatnie w teście ELISA u osób, które reagowały seropozytywnie wyłącznie w OC lub były ujemne w testach tradycyjnych świadczą o wysokiej czułości testu. Wykryte przeciwciała były prawdopodobnie przeciwciałami kompletnymi w stężeniach niewykrywalnych odczynami dotychczas stosowanymi.

Test ELISA wykonano wg zaleceń producenta w jednym rozcieńczeniu. Obserwacja serokonwersji jest możliwa np. przez porównywanie stosunku wartości cut-off do wartości ekstynkcji. Reasumując można stwierdzić, że uzyskane wyniki badań potwierdzają deklarowaną przez producenta wysoką czułość i swoistość testu ELISA. Wykryte klasy

przeciwciał w teście ELISA były charakterystyczne dla fazy zakażenia: IgM i częściowo IgG dla zakażenia świeżego, i IgG i IgA dla przewlekłego. Wydaje się, że badane zestawy ELISA nie wykrywają przeciwciał niekompletnych. Wskazane są dalsze badania na większym materiale klinicznym nad przydatnością testu ELISA do diagnostyki brucellozy ludzi.

Piśmiennictwo

1. *Brzezińska-Błaszczak E.*: Zarys Immunologii. Wyd. Uniw. Łódzkiego, Łódź 1994.
2. *Delgado S., Fernandez M., Carmens P.*: J. Vet. Diagn. Invest. 7, 206, 1995.
3. *Kita J., Królak M., Stryszak A., Kurek Cz.*: Medycyna Wet. 47, 200, 1991.
4. *Mackiewicz S.*: Immunologia, PZWL, Warszawa 1991.
5. *Nielsen K., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., Kelly W.*: Vet. Immunol. Immunopathol. 46, 281, 1996.
6. *Reichel M., Baber D., Armitage P., Lamparol D., Whitley R., Hilbink F.*: Vet. Rec. 23, 596, 1994.
7. *Thoen C., Haas C., Angus R., Townsend A.*: Vet. Microbiol. 45, 185, 1995.

Adres autora: dr Nimfa Stojek, ul. Smyczkowa 4/231, 20-844 Lublin

KOENEN F., VAN CAENEGEM G., VERMEERSCH J. P., VANDENHEEDE J., DEHUYKER H.: Epidemiologia klasycznego pomoru świń na terenie o dużym zagęszczeniu tych zwierząt. (Epidemiological characteristics of an outbreak of classical swine fever in an area of high pig density). Vet. Rec. 139, 367–371, 1996 (15)

Przeanalizowano przebieg klasycznego pomoru świń na terenie, na którym populacja tych zwierząt wynosiła około 1350/km² oraz nie były przeprowadzane szczepienia profilaktyczne przeciwko klasycznemu pomorowi świń. Badając 90 000 sztuk świń poddanych ubojowi, obecność wirusa stwierdzono w 52 stadach świń. Choroba przebiegała wśród nietypowych objawów klinicznych, a za pomorem przemawiał wzrost śmiertelności. Czas od chwili wystąpienia choroby do jej zdiagnozowania był krótszy w stadach opasów aniżeli w stadach macior, oraz macior karmiących. U opasów zachorowalność i śmiertelność wzrastała wraz z wiekiem. Odsetek klinicznie chorych sztuk był skorelowany z odsetkiem zwierząt seropozytywnych. 58% chlewni, w których przebywały zdrowe świnię, od których izolowano wirus pomoru, były serologicznie negatywne.

BJORNEROT L., FRANKLIN A., TYSEN E.: Zużycie leków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych w Szwecji w okresie 1988–1993. (Usage of antibacterial and antiparasitic drugs in Sweden between 1988 to 1993). Vet. Rec. 139, 282–286, 1996 (13)

Zakres stosowania leków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych jest uzależniony od stopnia wrażliwości patogenów. Przeanalizowano stosowanie leków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych w terapii oraz jako dodatków do pokarmu w Szwecji w latach 1988–1993 uwzględniając leki stosowane u świń i u ryb. W analizowanym okresie średnie zużycie roczne leków przeciwbakteryjnych utrzymywało się na stałym poziomie i wynosiło 35 ton w przeliczeniu na czystą substancję. Stosowanie leków przeciwbakteryjnych jako promotorów wzrostu zwierząt jest zabronione od 1988 r., leki te mogą być stosowane wyłącznie na zlecenie lekarza weterynarii. Stąd też zmniejszyło się ono o około 35%. Natomiast wzrosło dwukrotnie zużycie tetracyklin oraz o 50% olachinodoksu. W 1993 r. stosowano najczęściej penicylinę benzylową (13,2 ton), tetracykliny (8,8 ton), olachinodoks (2,0 tony) i antybiotyki aminoglikozydowe (1,9 ton). Corocznie zużywa się około 10 ton kokcydiostatyków. Zużycie innych leków przeciw pasożytniczych wzrosło do 7,7 ton.