

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY, GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ FITZNER

# Metody immunoenzymatyczne w diagnostyce serologicznej choroby pęcherzykowej świń

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.

## Serological diagnostics of the swine vesicular disease virus (SVD) – comparison of immunoenzymetic methods

### Summary

The aim of the studies was a comparison of the „liquid-phase” blocking ELISA (LPBE) and MAC-ELISA tests for the detection and quantification of antibodies to SVDV. The second assay is more specific and sensitive and a positive correlation ( $r=0.88$ ) with the virus neutralisation test (VNT) was found. The overall relationship of reciprocal titres by the used assays showed that log 1.04 by MAC-ELISA was equivalent to log 2.4 by LPBE and log 1.65 by VNT. Variation in results obtained by triplicate testing of individual animals indicates a higher reproducibility of MAC-ELISA than the LPBE. Using MAC-ELISA we could verify the results of our previous assays performed by LPBE; the percentage of the seropositive animals was less than 0.1%. Taking into consideration the fact that Poland is free from SVD, we suppose that these false positive results are due to the presence in sera of unidentified pig enteroviruses. The MAC-ELISA is useful for the fact the estimation of the immunological status of tested animals.

Choroba pęcherzykowa świń (SVD) stanowi nadal poważne zagrożenie dla hodowli trzody chlewnej. Oficjalne dane z lat 1990-1996, dotyczące sytuacji epizootycznej w zakresie SVD, potwierdzają występowanie ognisk chorobowych w niektórych krajach Europy Zachodniej (9). Polska od ponad ćwierć wieku posiada status kraju wolnego od choroby pęcherzykowej świń. Wzrost intensywności obrotu zwierzętami, przy znacznym zasięgu i równoczesnej jego liberalizacji, wymaga podjęcia wszelkich niezbędnych kroków ograniczających możliwość przedostania się zarazka na terytorium kraju.

Z uwagi na brak możliwości rozróżnienia choroby pęcherzykowej świń i pryszczycy na podstawie objawów klinicznych (6, 8, 9) oraz ze względów epizootycznych, bardzo ważne jest posiadanie i stosowanie precyzyjnych i szybkich metod diagnostyki różnicującej obie choroby. Diagnostyka ta polega na detekcji antygeny wirusa SVD w materiale klinicznym lub stwierdzeniu obecności swoistych przeciwciał w surowicach wrażliwych zwierząt. Brak ujednoczonych i wystandaryzowanych metod wykrywania i analizy ilościowej przeciwciał dla wirusa choroby pęcherzykowej świń sprawia, że pomiędzy laboratoriami diagnostycznymi obserwuje się istotne rozbieżności w ocenie statusu immunologicznego zwierząt. Różnice w interpretacji wyników były niejednokrotnie przyczyną błędnych ocen i decyzji wpływających na bezpieczeństwo i płynność w międzynarodowym handlu zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia. Dlatego, dla uzyskania bardziej wiarygodnych wyników,

do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej wprowadza się nowe, udoskonalone techniki, takie jak, MAC-ELISA, w której stosuje się przeciwciała monoklonalne wykazujące powinowactwo do specyficznych epitopów wirusa, co gwarantuje osiągnięcie wysokiej czułości i swoistości reakcji.

W Zakładzie Pryszczycy PIWet., do badań przeglądowych surowic świńskich stosowano, opracowaną przez Armstronga i wsp. (1) metodę immunoenzymatyczną liquid-phase blocking ELISA (LPBE). Równolegle, jako odwoławczy, wykorzystywano odczyn seroneutralizacji (SN) (4). Z końcem 1996 r., zgodnie z zaleceniami OIE (7) oraz w celu dostosowania naszych metod diagnostycznych do obowiązujących w Unii Europejskiej, do monitorowych badań serologicznych pogłowia świń w Polsce, zaadaptowano test MAC-ELISA.

Celem badań było porównanie metod LPBE i MAC-ELISA użytych do wykrywania i analizy ilościowej przeciwciał choroby pęcherzykowej świń, i na tej podstawie weryfikacja wyników badań serologicznych uzyskanych w latach 1995-1997, przy zastosowaniu pierwszej z metod.

### Materiał i metody

**Wirusy.** Wirus choroby pęcherzykowej świń (szczep POL/73) namnażano w hodowli pierwotnej nerki świńskiej bądź w hodowli ciągłej komórek linii IB-RS-2. Po ok. 24 godzinach od zakażenia hodowli, gdy efekt cytopatyczny osiągnął ponad 80%, wirus zbierano, odwirowywano przez 20 min. przy 3000 g i przetrzymywano w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do

testu ELISA stosowano wirus w optymalnym, wystandaryzowanym wcześniej rozcieńczeniu, przy którym  $OD_{492}$  wynosiło ok. 1,5.

Do testu LPBE wykorzystywano także zinaktywowany antygen wirusa SVD, szczep UKG27/72, uzyskany ze Światowego Laboratorium Referencyjnego w Pirbright (Anglia), natomiast w odczynie MAC-ELISA stosowano zinaktywowany antygen wirusa SVD, szczep ITALY 72 (Brescia, Włochy).

**Surowice.** W latach 1995-1997, przebadano ogółem ok. 48 000 surowic od świń kontrolowanych w ramach corocznych badań monitorowych na obecność przeciwciał SVD, zleczanych przez Departament Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej. Surowice pochodziły od zwierząt klinicznie zdrowych, z uboju oraz ferm usytuowanych w różnych rejonach kraju.

**Immunizacja zwierząt.** 5 warchlaków, każdy o wadze ok. 20 kg, immunizowano w mięśnie szyi dawką 5 ml preparatu uodporniającego o składzie: 1,25 ml zawiesiny antygeny wirusa choroby pęcherzykowej świń namnożonego w hodowli komórek IB-RS-2 i zinaktywowanego acetyloetylenoimidu (AEI), z dodatkiem niekompletnego adjuwantu Freund'a (FIA) w stosunku objętościowym 1/1. Używaną mieszaninę uzupełniono równą objętością 2% Tweenu 80 w 0,85% NaCl i intensywnie mieszano przez pipetowanie i na wytrząsarce (12). Zwierzęciu kontrolnemu podawano preparat, w którym antygen wirusa SVD zastąpiono płynem fizjologicznym. Krew od warchlaków pobierano przed zaszczepieniem (czas 0) oraz co 7 dni aż do 35 dnia od podania szczepionki. W 37 dniu wykonano hiperimmunizację połową poprzedniej dawki antygeny wirusowego i krew pobierano po 10, 17, 24 i 31 dniach od rewakcytacji. Surowice, przed oznaczeniem miana przeciwciał neutralizujących metodami SN, LPBE i MAC-ELISA, konserwowano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Odczyn seroneutralizacji.** Wykonywano metodą opisaną przez Goldinga i wsp. (4), zgodnie z OIE Manual of Standards (7), na płytkach płaskodennych w hodowli komórek IB-RS-2. Miano surowic obliczano metodą Reeda i Muencha (11).

**Testy immunoenzymatyczne.** Liquid-phase blocking ELISA (LPBE) wykonywano zgodnie z procedurą do badań przeglądowych, prowadzonych w laboratorium diagnostycznym Zakładu Pruszczycy PIWet.(10).

Test MAC-ELISA wykonywano według metody opracowanej przez Brocchi i wsp.(2), opartej na zasadzie współzawodnictwa specyficznych przeciwciał SVD z przeciwciałami monoklonalnymi Mab/5B7 skonjugowanymi z peroksydazą, o miejsca wiążące antygeny wirusowego. Wykonanie odczynu:

1. Opłaszczanie płytki. Do wszystkich zagłębień płytki (Nunc MaxiSorp) nakrapla się po 50  $\mu\text{l}$  roztworu Mab/5B7 w buforze węglanowym, pH 9,6 i pozostawia na noc w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ .

2. Przemycanie. Płytkę przemywa się 3-krotnie buforem PBS – 0,05% Tween 20 (PBST).

3. Inkubacja z antygenem. Na płytkę nakrapla się (50  $\mu\text{l}$ /zagłębienie) antygen wirusa SVD (szczep Italy 72) w buforze PBST zawierającym 1% ekstrakt drożdżowy. Optymalne miano użytego antygeny określa się na podstawie

wcześniej przeprowadzonej standaryzacji reagentów. Po 1 godzinnej inkubacji w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , przy ciągłym wytrząsaniu, płytkę przemywa się buforem PBST, zgodnie z punktem 2.

4. Reakcja z surowicami. Do określonych zagłębień nalewa się po 50  $\mu\text{l}$  surowic terenowych (42) i referencyjnych (3) rozcieńczonych w buforze PBST, zawierającym 1% ekstrakt drożdżowy oraz 1% surowicę mysią. Surowice terenowe rozcieńcza się w stosunku 1/7,5 i 1/21,5, natomiast surowice od zwierząt immunizowanych mianuje się wykonując 3-krotne rozcieńczenia, od 1/7,5 do 1/1822,5. Do 4 zagłębień nakrapla się tylko bufor (kontrola). Płytki inkubuje się 1 godz. w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  na wytrząsarce.

5. Inkubacja z koniugatem. Po zakończeniu inkubacji, bez przemywania płytki, do wszystkich zagłębień dodaje się po 25  $\mu\text{l}$  koniugatu (Mab/5B7 połączone z peroksydazą chrzanową-HRP) w buforze PBST + 1% ekstrakt drożdżowy i inkubuje przez 1 godzinę w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ .

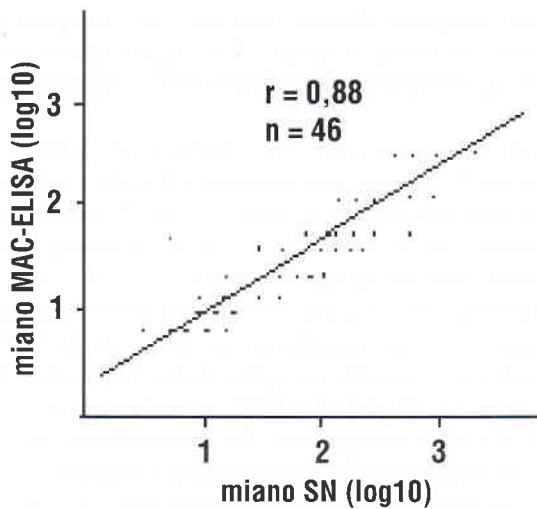
6. Wywołanie reakcji barwnej. Po przemyciu płytki buforem PBST, nakrapla się po 50  $\mu\text{l}$  substratu (OPD, 0,5 mg/ml i 0,02%  $\text{H}_2\text{O}_2$  w buforze fosforanowo-cytrynowym, pH 5,0) i pozostawia na 10 min. w temp. pokojowej.

7. Hamowanie reakcji enzymatycznej. Wykorzystuje się 2N roztwór  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50  $\mu\text{l}$ /zagłębienie) po czym reakcję kolorymetryczną analizuje się spektrofotometrycznie stosując czytnik mikroplatek Dynatech 5000 (Anglia).

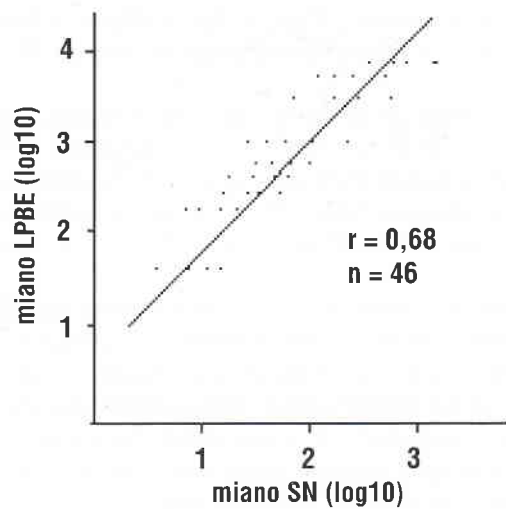
8. Interpretacja wyników. Miano przeciwciał SVD określa się jako graniczne rozcieńczenie testowanej surowicy, którego wartość  $OD_{492}$  równa się 50% średniej wartości absorbancji dla kontroli antygeny (bez surowicy). W przypadku przeglądowych badań monitorowych, określa się procent hamowania reakcji, który w przypadku surowic traktowanych jako pozytywne wynosi  $> 80\%$ . Wykładnikiem prawidłowego przebiegu reakcji są kontrole: negatywna ( $< 50\%$  hamowania), nisko-pozytywna-progowa ( $> 80\%$ ) i wysoko-pozytywna (50% w rozcieńczeniu 1/202,5).

## Wyniki i omówienie

Do badań porównawczych testów immunoenzymatycznych użyto około 9500 prób surowic otrzymanych w 1997 r., z rzeźni oraz ferm hodowlanych od świń klinicznie zdrowych oraz pobranych od zwierząt doświadczalnie immunizowanych (46 prób). Rycina 1 przedstawia porównanie specyficzności i czułości testów LPBE i MAC-ELISA przy dwóch różnych wartościach progowych mian w odczynie SN. Uzyskane wyniki wskazują na znacznie wyższą specyficzność testu MAC-ELISA, przy czym, dla niższych wartości miana SN relacja ta jest zdecydowanie korzystniejsza dla metody wykorzystującej przeciwciała monoklonalne. Wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich (ok. 15%) w przypadku LPBE, potwierdza względnie niską specyficzność tego odczynu, co zostało wykazane również w innych laboratoriach (3, 5). Surowice od zwierząt zaszczepionych preparatem zawierającym zinaktywowany antygen wirusa SVD oraz FIA i Tween 80 (12) i badane testem MAC-ELISA, w 100% reagowały dodatnio z antygenem wirusa SVD (ryc. 1). Wynik ten wskazuje na wyższą czułość tego odczynu w



Ryc. 1. Regresja między testami SN i MAC-ELISA u zwierząt immunizowanych

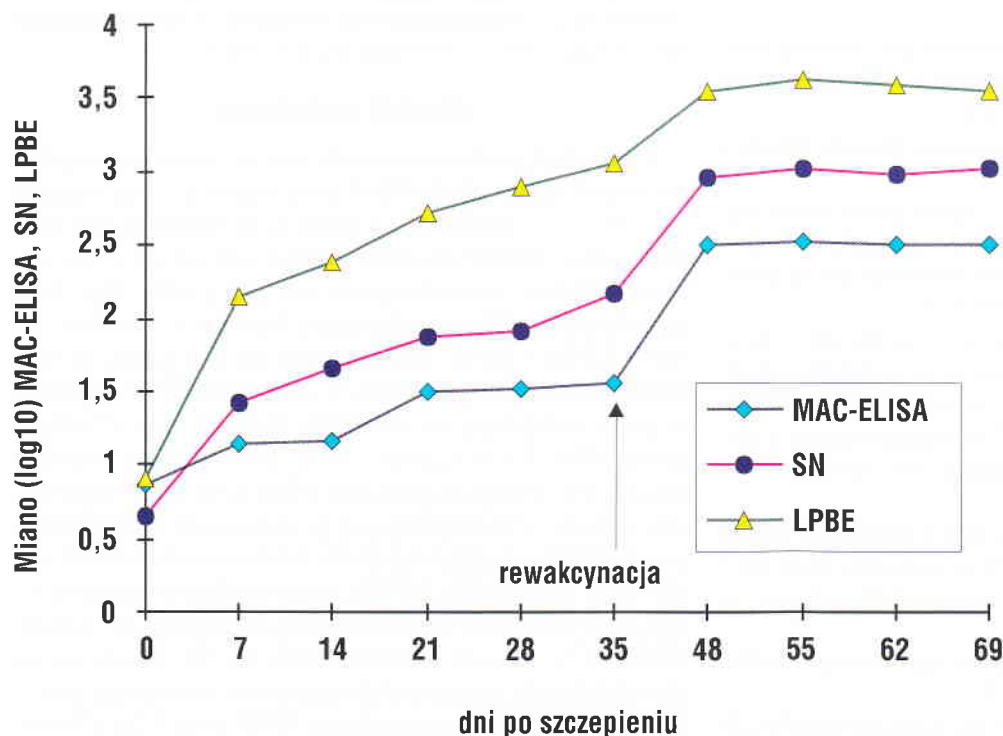


Ryc. 2. Regresja między testami SN i LPBE u zwierząt immunizowanych

Tab. 1. Porównanie czułości i specyficzności testów LPBE i MAC-ELISA, przy dwóch różnych mianach progowych odczynu SN

Miano SN ( $\log_{10}$ ) (wartość progowa)	CZUŁOŚĆ (%)		SPECYFICZNOŚĆ (%)	
	LPBE	MAC-ELISA	LPBE	MAC-ELISA
> 1,65	94,0	100	85,5	97,7
> 2,40	98,0	100	92,4	99,9

stosunku do LPBE, wykrywającego 95-99% przeciwciał, w zależności od określonego miana progowego SN. Zgodności (regresja) mian przeciwciał neutralizujących w testach SN i LPBE ( $r=0,68$ ) (ryc. 2) oraz SN i MAC-ELISA ( $r=0,88$ ) (ryc. 3), potwierdza wyższą korelację wyników uzyskanych przy użyciu metod SN i MAC-ELISA. Zbliżoną wartość współczynnika regresji ( $r=0,66-0,68$ ) pomiędzy metodami SN i LPBE uzyskali także inni badacze (1, 3). W celu zweryfikowania powyższych rezultatów, porównywano wysokość mian surowic pozytywnych badanych wszystkimi



Ryc. 3. Średnie miano (MAC-ELISA, SN i LPBE) przeciwciał neutralizujących wirus SVD w surowicy prosiąt (nr 3), w kolejnych dniach po immunizacji i rewakcynacji

ze stosowanych metod diagnostycznych (tab. 1). Wykazano, że miano MAC-ELISA surowicy referencyjnej niskopoztywnej – progowej ( $\log 1,15$ ), odpowiada wartości  $\log 2,40$  w teście LPBE i  $\log 1,65$  w odczynie SN. Zaobserwowano większą rozbieżność wyników przy niższym zakresie mian przeciwciał SVD; wraz z ich wzrostem, różnice te były mniej wyraźne. Wykazano także relatywnie wyższą powtarzalność metody MAC-ELISA niż LPBE. Rozbieżność wysokości miana około 98% prób surowic badanych przez kolejne 3 dni mieści się w zakresie 2-krotnego ich rozcięczenia (tab. 2).

Kolejnym potwierdzeniem wzajemnej korelacji metod SN, LPBE i MAC-ELISA, są wyniki kontroli poziomu przeciwciał neutralizujących wirus SVD w surowicy prosiąt immu-

Tab. 2. Porównanie wysokości mian ( $\log_{10}$ ) przeciwciał SVD w surowicach badanych metodami: SN, LPBE i MAC-ELISA

MIANO ( $\log_{10}$ )		
SN	LPBE	MAC-ELISA
1,05	1,81	0,86
1,30	2,10	0,91
1,65	2,42	1,18
1,87	2,68	1,30
2,10	2,98	1,54
2,47	3,25	1,89
2,90	3,55	2,48
3,20	3,76	2,81

Tab. 3. Powtarzalność (%) wyników badania 46 pozytywnych surowic mianowanych metodą LPBE i MAC-ELISA

Liczba kolejnych rozcieńczeń surowicy	LPBE (%)	MAC-ELISA (%)
< 2	94	98
3	5	2
4	1	0
5	0	0

nizowanych doświadczalnie. Rycina 3 przedstawia średnią wartość miana przeciwciał u jednego ze zwierząt (nr 3), w różnym okresie od zaszczepienia oraz po rewakcytacji. Jednorazowe podanie szczepionki nie przyczyniło się do wyraźnego wzrostu miana przeciwciał, natomiast ich poziom gwałtownie wzrastał po doszczepieniu.

Test MAC-ELISA pozwolił zweryfikować uzyskane poprzednio wyniki badań prowadzonych w latach 1995-1996, w ramach badań przeglądowych pogłowia świń w Polsce. W wyniku powtórnego badania 33 surowic uznanych w testach LPBE i SN za pozytywne, 16 reagowało dodatnio w teście MAC-ELISA. Stanowi to mniej niż 0,1% ogólnej liczby przebadanych surowic (ok. 38 000) i mieści się w granicach błędów metody (0,45%) (2). Biorąc pod uwagę fakt, że Polska od wielu lat jest krajem wolnym od SVD, należy przypuszczać, że przyczyną wyników fałszywie dodatnich jest reakcja nieswoista z innymi enterowirusami świńskimi obecnymi w badanych surowicach (7).

Podsumowując, należy stwierdzić, że test MAC-ELISA, ze względu na wysoką czułość i specyficz-

ność reakcji, a także pozytywną korelację z odczynem SN i krótki czas wykonania, stanowi wiarygodną i polecaną metodę diagnostyki serologicznej wirusa choroby pęcherzykowej świń. Ograniczona przydatność odczynów SN i LPBE wynika ze znacznej czasochłonności i wysokich kosztów badania przy pierwszej metodzie oraz niższej specyficzności testu LPBE. Wprowadzenie testu MAC-ELISA do diagnostyki laboratoryjnej jako metody uzupełniającej, pozwoli na wyeliminowanie w znacznej części wyników fałszywie dodatnich, spowoduje również podwyższenie jakości wykonywanych badań, zgodnie ze standardami obowiązującymi w krajach UE.

### Piśmiennictwo

1. *Armstrong R. M., Barnett I. T. R.*: J. Virol. Methods 25, 71, 1989.
2. *Brocchi E., Berlizani A., Gamba D., De Simone F.*: J. Virol. Methods 52, 155, 1995.
3. *Dekker A., Moonen P. L. J. M., Terpstra C.*: J. Virol. Methods 51, 343, 1995.
4. *Golding S. M., Hedger R. S., Talbot P., Watson J.*: Res. Vet. Sci. 20, 142, 1976.
5. *Haas B.*: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Vienna, Austria, 19-22 September 1994.
6. *Longhaus C., Mann J. A., Dowe J. T., Bradley R.*: Res. vet. Sci. 21, 19, 1976.
7. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines.* OIE, Paris 1996.
8. *Nardelli L.*: Selezione Vet. 14, 1, 1973.
9. *Niedbalski W., Kęsy A., Fitzner A., Paprocka G.*: Medycyna Wet., 1998 (w druku).
10. *Niedbalski W., Kęsy A., Paprocka G., Fitzner A.*: Instrukcja badania laboratoryjnego w kierunku pryszczycy i choroby pęcherzykowej świń (SVD), Nr 2/94 Min. Roln. i Gosp. Żywn., Departament Weterynarii, z dn. 15 grudnia 1994, Nr WETz II 4611 dg - 1/94.
11. *Reed L. J., Muench H.*: Am. J. Hyg. 27, 493, 1933.
12. *Wiśniewski J.*: Badania nad inaktywowaną szczepionką przeciw chorobie pęcherzykowej świń z uwzględnieniem programu profilaktycznego w hodowli wielkostadnej. Praca hab., Instytut Weterynarii, Puławy 1978.

Adres autora: dr Wiesław Niedbalski, ul. Zielona 48/4, 98-220 Zduńska Wola

**ABD-ELLAH A. M., JANSSENS G. P. J., DE WILDE R. O. M.: Wpływ dodatku do paszy kwasu acetylosalicylowego na wydajność produkcyjną kur niosek utrzymywanych w wysokiej temperaturze. (Effect of acetyl-salicylic acid supplementation on productive performance of laying hens reared under high environmental temperature).** Vlaams Diergeneesk Tijds. 66, 294-297, 1997 (6)

Wysokie temperatury w jakich są hodowane kury determinują w dużym stopniu przyrosty masy ciała i nieśność. Prześladowano wpływ dodatku do karmy kwasu acetylosalicylowego w ilości 0, 200, 400, 600 i 800 mg/kg karmy kur wyselekcjonowanej rasy (LSL) w wieku 40 tyg. i masie ciała 1,5-1,8 kg. Karmę zawierającą kwas acetylosalicylowy stosowano przez okres 10 tygodni u kur hodowanych 35-45°C. Dodatek 600 lub 800 mg kwasu acetylosalicylowego/kg paszy zwiększył ilość pobieranej paszy, nieśność, wpływał na zwiększenie masy skorupki jaja i na konwersję paszy, redukował śmiertelność z 15% w grupie kontrolnej do 5%. Kwas acetylosalicylowy w ilości 200 i 400 mg/kg karmy nie wpływał w istotny sposób na badane parametry ale zmniejszał śmiertelność do 10%. Jako dawkę optymalną autorzy sugerują 600 mg kwasu acetylosalicylowego/kg karmy.