

Opracowanie testów ELISA do wykrywania zakażeń wirusem zespołu rozrodczo-oddechowego świń

TOMASZ STADEJEK, MARTIN B. OLEKSIEWICZ*, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
*Novo Nordisk A/S, Virology and Molecular Toxicology, Novo Nordisk Park, 2760 Måløv, Dania

Stadejek T., Oleksiewicz M. B., Pejsak Z.

Development of ELISA tests for detecting infections of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Summary

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a viral disease of swine which causes serious economic losses in the majority of swine producing countries, including Poland. The agent of the disease is the PRRS virus (PRRSV) from the Arteriviridae family. PRRSV strains belong to two genotypes: European (PRRSV-EU) and American (PRRSV-US). They differ genetically and antigenically. Both genotypes are present in Europe, America and Asia, and their identification is important in order to control the disease by vaccination. ELISA tests are most frequently used for PRRS diagnosis. The aim of the study was to develop ELISA tests for general PRRS diagnosis and for discriminating seroconversion to PRRSV-EU from seroconversion to PRRSV-US. In order to do this an efficient method of nucleocapsid (N) protein expression in *E. coli* was developed and N proteins from PRRSV-EU and PRRSV-US strains were used as antigens. Mixed antigens of two strains were used in general purpose ELISA (PIWet PRRS ELISA) and split antigens were used in discriminatory ELISA (PIWet PRRS R ELISA). The studies showed that while the sensitivity of the PIWet PRRS ELISA is similar to that of reference HerdChek PRRS 2XR ELISA (IDEXX), its specificity seems to be higher. The newly developed test was less prone to false positive results than the IDEXX test. The discriminatory test, PIWet PRRS R ELISA, allowed precise identification of pigs infected with single genotype, PRRSV-EU or PRRSV-US. Additionally, based on serological examination of pigs from several age groups, it allowed the simultaneous circulation of two genotypes within a farm to be identified. The value of the developed tests was proven during routine diagnostic practice.

Keywords: PRRS, PRRSV

Pierwsze doniesienia na temat zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRS) pojawiły się w 1987 w USA (10). Choroba niemal jednocześnie wystąpiła i rozprzestrzeniła w Ameryce i w Europie. Obecnie stanowi poważny problem ekonomiczny w większości krajów produkujących trzodę chlewną, w tym także w Polsce (11, 13).

Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus PRRS (PRRSV) należący do rodziny *Arteriviridae* (16). Znanne są dwa genotypy – europejski i amerykański, nazwane tak ze względu na pierwotne miejsce izolacji prototypowych szczepów (europejskiego Lelystad i amerykańskiego VR2332) (3, 22). Obecnie oba genotypy występują zarówno w Europie i Ameryce, jak i w Azji. Ograniczone pokrewieństwo genetyczne i antygenowe jest przyczyną szeregu problemów w rozpoznawaniu, zwalczaniu i profilaktyce PRRS.

Wstępne rozpoznanie PRRS może być postawione na podstawie objawów klinicznych, takich jak: wyraźnie obniżona skuteczność krycia, przedwczesne po-

rody lub roniecie w końcowej fazie ciąży, rodzenie się słabych prosiąt i zaburzenia ze strony układu oddechowego dotyczące zwierząt w każdym wieku (8). Ponieważ objawy chorobowe w przebiegu PRRS są niezwykle zmienne, ze względu na różną zjadliwość szczepów oraz wtórne zakażenia bakteryjne i wirusowe, rozpoznanie PRRS musi zostać potwierdzone metodami laboratoryjnymi.

Do rozpoznawania PRRS powszechnie wykorzystuje się metody serologiczne, takie jak: immunofluorescencja pośrednia (indirect fluorescence antibody – IFA) (24), test immunoperoksydazowy (immunoperoxidase monolayer assay – IPMA) (20), ELISA (1, 4, 5, 9, 15, 17) czy test seroneutralizacji (SN) (25). Za referencyjną metodę diagnostyki serologicznej PRRS uważa się IPMA z (12). Jest to jednak metoda kosztowna, pracochłonna i trudna do standaryzacji. Najczęściej wykorzystywanym do rozpoznawania PRRS testem jest ELISA. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka zestawów do rozpoznawania tej choroby, przy

czym za test referencyjny uważa się zestaw firmy IDEXX HerdChek PRRS 2XR.

Ze względu na występowanie w wielu krajach obydwu typów PRRSV konieczne jest określenie genotypu PRRSV występującego w danym stadzie lub sektorze fermy. Wiedza na ten temat niezbędna jest, między innymi, przy opracowywaniu programów szczepień (14, 15, 18, 21). Jak dotychczas żadna firma nie oferuje zestawu do serologicznego różnicowania PRRSV.

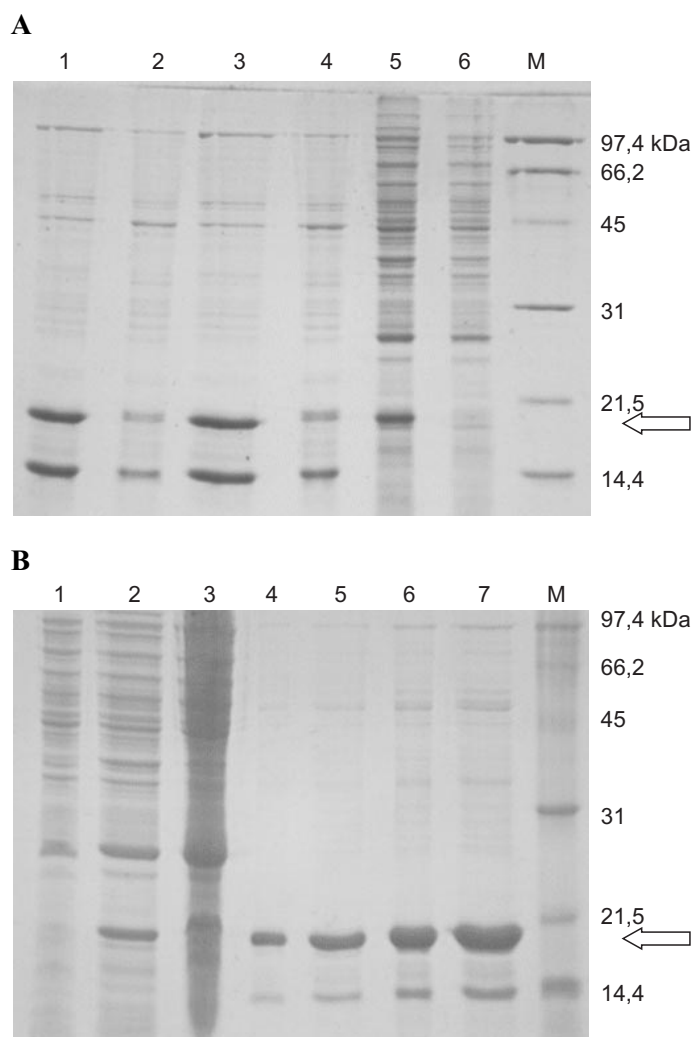
Celem badań było opracowanie wydajnej metody produkcji antygenów PRRSV przy użyciu rekombinowanych bakterii *E. coli* i zastosowanie ich do produkcji testów ELISA do serologicznego rozpoznawania zakażeń tym wirusem (PIWet PRRS ELISA) oraz do różnicowania serokonwersji dla PRRSV-EU i PRRSV-US (PIWet PRRS R ELISA).

Materiał i metody

Antygeny do testów ELISA. Antygen do opłaszczania mikropłytek składał się z mieszaniny rekombinowanego białka N kapsydu szczepów H2 (genotyp europejski) i IDUVSL 27712 (genotyp amerykański). Gen kapsydu obu wymienionych szczepów PRRSV wklonowano do plazmidu Pet 14b (Novagen) zawierającego gen oporności na ampicylinę i promotor bakteriofaga T7. Każdy z konstruktów wprowadzano do komórek bakterii *E. coli* szczepu BL21(DE3)pLysS (Novagen) opornych na chloramfenikol. W ten sposób otrzymano dwa szczepy rekombinowanych bakterii zdolne do produkcji białka kapsydu odpowiednio szczepu H2 i IDUVSL 27712. Tak przygotowane szczepy otrzymano dzięki uprzejmości dr. Trevora W. Drew z Central Veterinary Laboratory – Weybridge, Addlestone, Wielka Brytania (6).

W celu otrzymania antygenów do testów ELISA oba z rekombinowanych szczepów wysiewano do oddzielnych probówek z 10 ml podłoża Luria-Bertani (LB) zawierającym chloramfenikol o stężeniu 34 µg/ml i ampicylinę o stężeniu 50 µg/ml. Hodowle inkubowano z intensywnym mieszaniem przez noc w 37°C. Następnego dnia hodowlę bakterii wprowadzano do około 200 ml podłoża LB z wyżej wymienionymi antybiotykami i inkubowano z intensywnym mieszaniem w 37°C do osiągnięcia gęstości optycznej (OD) zawiesiny bakterii 0,4-1,0, zwykle około 3 godz. Następnie w celu indukcji ekspresji białka kapsydu PRRSV przez rekombinowane bakterie do kolby wprowadzano izopropylotio-β-d-galaktozydazę (IPTG) do końcowego stężenia 0,4 mM i prowadzono inkubację przez kolejne 3 godz. Następnie kolby schładzano przez umieszczenie w lodzie na 5 min., po czym komórki bakteryjne odwirowywano przy 5000 × g przez 5 min. w 4°C. Osad bakterii zawieszano w 100 ml zimnego buforu Tris-HCl pH 8,0 i wirowano jak wyżej. Po zważeniu osad zamrażano w -70°C.

W celu izolacji ciałek wtrętowych zawierających antygen, rozmrożony osad bakterii zawieszano w odczynniku do ekstrakcji białek BugBuster (Novagen). Używano 5 ml odczynnika na 1 g zawiesiny bakterii. Następnie do zawiesiny dodawano benzonazę w celu degradacji kwasów nukleinowych w objętości 1 µl na 1 ml użytego odczynnika

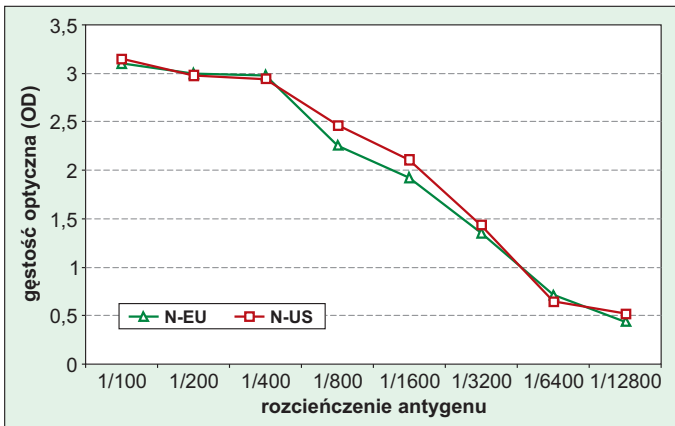


Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu akrylamidowym z SDS (SDS-PAGE)

Objaśnienia: A – antygen PRRSV-EU, ścieżki 1-4: oczyszczone ciała wtrętowe, ścieżka 5: rekombinowane komórki *E. coli* indukowane IPTG, ścieżka 6: nieindukowane rekombinowane komórki *E. coli*; B – antygen PRRSV-US, ścieżka 1: nieindukowane rekombinowane komórki *E. coli*, ścieżki 2 i 3: rekombinowane komórki *E. coli* indukowane IPTG, ścieżki 4-7: oczyszczone ciała wtrętowe; M – marker masy białek. Strzałka wskazuje pozycję białka N

BugBuster. Zawiesinę mieszano przez 20 min. w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano w 16 000 × g przez 15 min. w 4°C. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w takiej samej jak poprzednio objętości odczynnika BugBuster, dodawano lizozym do stężenia 200 µg/ml, wytrząsano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 5 min. Następnie dodawano odczynnik BugBuster rozcieńczony wodą destylowaną 1 : 10 w objętości 6-krotnie większej od zawartości probówki, wytrząsano przez 1 min. i wirowano w 16 000 × g przez 15 min. w 4°C. Procedurę płukania ciałek wtrętowych powtarzano dwukrotnie.

Oczyszczone ciała wtrętowe rozpuszczano w 2 ml roztworu: 8 M mocznik, 100 mM Tris, 10 mM 2-merkaptoetanol i zamrażano w -70°C. Ciała wtrętowe uzyskane z bakterii rekombinowanych plazmidami zawierającymi geny ORF7 szczepów H2 (genotyp europejski) i IDUVSL 27712 (genotyp amerykański) wykorzystywano jako antygeny



Ryc. 2. Wykres mianowania rekombinowanych antygenów N-EU i N-US wykorzystywanych w testach ELISA PIWet i PIWet R

w testach ELISA, odpowiednio N-EU i N-US. Czystość antygenów N-EU i N-US oceniano na podstawie elektroforezy w żelu akrylamidowym z siarczanem dodecylu (SDS-PAGE) i barwieniu błękitem kumasyny (ryc. 1).

W analogiczny sposób uzyskiwano antygen z nie rekombinowanych bakterii BL21(DE3)pLysS, który służył w teście ELISA jako kontrolny antygen negatywny (natural host antigen – NHC).

Przygotowanie płytek do testów ELISA. Przygotowując płytki do testu PIWet PRRS ELISA do wykrywania przeciwciał dla PRRSV do nieparzystych kolumn baseników mikroplatek Maxisorp (Nunc) wprowadzano antygen NHC w rozcieńczeniu 1 : 10 000, a do kolumn parzystych mieszaninę antygenów N-EU i N-US w rozcieńczeniach ustalanych doświadczalnie (ryc. 2). W zależności od wydajności rozcieńczenie dla N-EU wynosiło od 1 : 1600 do 1 : 12 800, a dla N-US 1 : 10 000 do 1 : 25 000. Rozcieńczenia wykonywano w 50 mM buforze węglanowym pH 9,6 z 5 mM dithiotreiolem i 0,02% dodatkiem inhibitora proteaz ProClin 300 (Supelco). Następnie płytki inkubowano przez noc w 4°C. W kolejnym etapie mikroplatek blokowano płynem do rozcieńczania surowicy (10% surowica końska (ICN) w PBS, 0,02% ProClin) przez 1 godz. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Płyn do blokowania usuwano, a mikroplatek płukano 3-krotnie płynem do płukania: PBS, 0,05% Tween 20, po czym suszono w 37°C i po szczelnym opakowaniu przechowywano w 4°C. Optymalne rozcieńczenia antygenów ustalano doświadczalnie dla każdej partii antygenów przez porównanie wyników badania zestawu surowic standardowych komercyjnym testem ELISA (IDEXX) według zaleceń producenta.

W celu przygotowania płytek do testu PIWet PRRS R ELISA do nieparzystych kolumn baseników mikroplatek wprowadzano antygen N-EU, a do parzystych N-US. Sposób dalszego postępowania z płytkami był identyczny z wyżej opisanym.

Surowice. Jako surowic standardowych dodatnich używano surowic od świń immunizowanych doświadczalnie szczepionką Porcilis PRRS (Intervet) (POZ lub POZ-EU) zawierającą antygen PRRSV-EU lub Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim Vetmedica) (POZ-US). Jako surowic standardowych ujemnych używano surowic od świń z gospodarstw wolnych od PRRS. Rozcieńczenie surowic

standardowych dodatnich ustalano doświadczalnie, a surowicę standardową ujemną rozcieńczano 1 : 100. Rozcieńczone, gotowe do użycia surowice standardowe przechowywano w –20°C.

Do oceny swoistości i czułości testów ELISA wykorzystano surowice od świń zakażonych terenowymi szczepami PRRSV-EU należącymi do czterech obecnie znanych podtypów tego genotypu z Polski, Litwy, Białorusi oraz od świń z gospodarstwa polskiego, gdzie metodą RT-nested PCR i sekwencjonowania DNA produktów PCR wykazano krążenie dwóch genotypów PRRSV (19, 21). Wymienione surowice badano również testem ELISA IDEXX.

W badaniach wykorzystano także surowice od świń ze Szwecji, kraju wolnego od PRRSV, otrzymane z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Uppsali, które w teście IDEXX reagowały nieswoiście dodatnio.

Rozcieńczenia surowic standardowych i doświadczalnych wykonywano w płynie o składzie identycznym z płynem do blokowania.

Wykonanie testu. Przed wykonaniem testów ELISA opłaszczone mikroplatek inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie do baseników wprowadzano po 50 µl surowic standardowych i surowic badanych rozcieńczonych 1 : 100 w płynie do rozcieńczania surowicy i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. na wytrząsarce. Po 5-krotnym płukaniu mikroplatek płynem do płukania do baseników wprowadzano 50 µl koniugatu (Polyclonal Rabbit Anti Swine Immunoglobulins/HRP) rozcieńczonego 1 : 5000 w płynie do rozcieńczania surowicy i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. na wytrząsarce i płukano. Następnie do baseników wprowadzano 50 µl substratu TMB (Sigma) i inkubowano bez dostępu światła przez około 20 min., po czym reakcję barwną hamowano przez dodanie 50 µl 2 M kwasu siarkowego. Pomiaru gęstości optycznej (OD) dokonywano przy długości fali 450 nm.

Wynik badania surowicy (S) na obecność przeciwciał dla PRRSV wyrażano stosunkiem wartości OD odczytanej z basenika opłaszczonego mieszaniną antygenów N-EU i N-US (N) pomniejszonej o wartość OD tej surowicy odczytanej z basenika opłaszczonego antygenem NHC i wartości OD surowicy standardowej dodatniej (POZ) pomniejszonej o wartość OD tej surowicy odczytanej z basenika opłaszczonego antygenem NHC (sample to positive – S/P). Przy obliczaniu wyniku posługiwano się następującym wzorem:

$$S/P = \frac{OD_{(S \text{ antygen N})} - OD_{(S \text{ antygen NHC})}}{OD_{(POZ \text{ antygen N})} - OD_{(POZ \text{ antygen NHC})}}$$

Test uznawano za ważny, jeśli różnica OD netto surowicy standardowej dodatniej i OD netto surowicy standardowej ujemnej (NEG) wynosiła < 0,3.

Wynik badania surowicy zawierającej przeciwciał dla PRRSV w celu określenia genotypu wirusa wywołującego serokonwersję wyrażano stosunkiem wartości OD surowicy z antygenem N-EU do wartości OD surowicy z antygenem N-US (OD_{EU}/OD_{US}). Stosunek wyższy od 1,2 interpretowano jako świadczący o obecności w surowicy przeciwciał dla genotypu europejskiego, natomiast stosunek równy lub niższy od 0,8 interpretowano jako świadectwo

obecności przeciwciał dla genotypu amerykańskiego. Surowice o współczynniku OD_{EU}/OD_{US} zawierającym się w przedziale 1,2-0,8 traktowano jako mogące zawierać przeciwciała dla obu genotypów.

Test uznawano za ważny, jeśli współczynnik OD_{EU}/OD_{US} dla surowicy standardowej dodatniej dla genotypu EU był wyższy od 1,5, a współczynnik OD_{EU}/OD_{US} dla surowicy standardowej dodatniej dla genotypu US niższy od 0,7.

Wyniki i omówienie

Wynikiem przeprowadzonych badań było opracowanie zestawów ELISA do serologicznej diagnostyki zakażeń PRRSV. Pierwszy zestaw, PIWet PRRS ELISA, w którym płytki opłaszczają się mieszaniną rekombinowanych antygenów obu genotypów wirusa, służy do ogólnego rozpoznawania zakażeń. Zestaw drugi, PIWet PRRS R ELISA, w którym kolumny płytek opłaszczają się naprzemiennie antygenem europejskim i amerykańskim, służy do określania genotypu wirusa wywołującego zakażenie.

Czystość antygenów do opłaszczania płytek oceniano na podstawie SDS-PAGE (ryc. 1). Preparaty antygenów zawierały szereg produktów o szerokim zakresie mas molekularnych, lecz dominujące białka były reprezentowane przez dwa prążki o masach pomiędzy 14,4 i 20 kDa. Podobny obraz oczyszczonego antygenu zaobserwowali Ferrin i wsp. (7). Autorzy ci stwierdzili, że prążek o większej masie odpowiada rekombinowanemu białku N, podczas gdy prążek o mniejszej masie odpowiada najprawdopodobniej lizozymowi. Wysokie rozcieńczenie antygenów używanych do opłaszczania płytek do testów ELISA sprawiało, że widoczne na żelu białka pochodzenia bakteryjnego nie interferowały w reakcjach z surowicami świń.

Wykorzystana w badaniach metoda produkcji antygeny wirusa nie była dotychczas opisywana w literaturze naukowej. Inni autorzy wykorzystywali ekstrakcję białek wirusowych z hodowli komórek Marc-145 zakażonych PRRSV, ekstrakcji białka N PRRSV z fazy rozpuszczalnej białek rekombinowanych bakterii lub hodowli komórek owadzych zakażonych rekombinowanym bakulowirusem. Metody wiązały się z pracochłonnym procesem oczyszczania (2, 5-7, 15, 23). Wyniki prezentowanych badań wykazały, że antygen N jest obecny również w ciałkach wtartych rekombinowanych bakterii i charakteryzuje się wysokim poziomem koncentracji. Co niezwykle ważne, może być w bardzo łatwy i tani sposób wyekstrahowany z lizatu komórek.

W opisanych badaniach przeanalizowano przydatność szeregu buforów oraz substancji denaturujących do przygotowania antygeny do opłaszczania płytek. Wykazano, że białko N wirusów należących do dwóch genotypów PRRSV ma różne właściwości biologiczne. Podczas gdy antygen N-EU zachowywał właściwości antygenowe w większości buforów, antygen N-US posiadał najwyższą antygenowość w buforze węglanowym o pH 9,6 z 10 mM 2-merkaptanoetolem,

w których to warunkach aktywność N-EU była całkowicie zahamowana. Optymalnym buforem, w którym oba antygeny posiadały zachowane właściwości antygenowe, był bufor węglanowy z 50 mM DTT.

W celu oceny czułości diagnostycznej opracowanego testu PIWet PRRS ELISA badaniu poddano 645 surowic od tuczników z 30 ferm polskich oraz 11 białoruskich i 2 litewskich. Wśród ferm, skąd pochodziły badane surowice, były gospodarstwa zakażone czterema dotychczas znanymi podtypami europejskiego genotypu PRRSV, genotypem amerykańskim oraz takie, w których krążyły oba genotypy wirusa (19, 21). Badania surowic wykonano równocześnie nowo opracowanym testem PIWet PRRS ELISA oraz testem IDEXX HerdChek PRRS 2XR. Zaobserwowano pełną zgodność wyników badań wykonanych obydwoma zestawami, w których 100% surowic reagowało dodatnio w obu z nich.

W celu oceny swoistości testu PIWet PRRS ELISA badaniu poddano 250 surowic od świń ze Szwecji, kraju jak dotychczas wolnego od PRRS oraz 3000 surowic od loszek z 3 polskich ferm wolnych od PRRS. Badanie wszystkich surowic pochodzących ze Szwecji dało wynik ujemny w obu testach ELISA, podobnie jak badanie surowic od loszek z 2 z 3 ferm z Polski. Natomiast badanie 1000 surowic z jednej fermy z naszego kraju w obu testach dało wynik dodatni w przypadku surowic od 5 loszek, podczas gdy pozostałe 1995 surowic dało wyniki ujemny. Po 3 tygodniach zbadano ponownie surowicę od tych 5 loszek oraz od 10 innych, przebywających w tych samych kojcach. Wynik badania był identyczny jak poprzednio. Nie wykazano wzrostu liczby seroreagentów, co mogłoby świadczyć o szerzącej się infekcji. Wynik ten należy więc uznać za fałszywie dodatni.

Tego rodzaju nieswoistość dodatnie wyniki mogą być obserwowane nawet w 5% surowic, a ich źródło jest nieznane (7). Niektórzy autorzy wskazują na możliwość kontaminacji antygeny PRRSV na płytkach ELISA innymi białkami, dla których przeciwciała spotyka się we krwi niektórych świń (7). Między różnymi testami serologicznymi obserwuje się różnice we wrażliwości na te nieswoiste reakcje. W celu porównania wrażliwości testów IDEXX i PIWet na pojawianie się wyników fałszywie dodatnich zbadano 15 surowic świń ze Szwecji, które reagowały dodatnio w teście IDEXX oraz ujemnie w teście IPMA. Surowice te otrzymano od dr Malika Merzy z firmy Svanova (Szwecja). Okazało się, że jedynie 3 z 15 surowic reagujących nieswoistość dodatnio w teście IDEXX dało wynik dodatni w teście PIWet (tab. 1). Wynik ten wskazuje, że swoistość PIWet PRRS ELISA może być wyższa niż testu IDEXX.

Analiza swoistości testu do serologicznego różnicowania genotypów PRRSV jest trudniejsza. Mimo wielu różnic antygenowych między nimi istnieje pewien poziom pokrewieństwa, szczególnie w obrębie białka N, które jest antygenem dominującym w odpo-

Tab. 1. Porównanie wyników badania surowic dodatnich oraz fałszywie dodatnich w testach IDEXX i PIWet.

| Surowice dodatnie | | | | Surowice fałszywie dodatnie | | |
|-------------------|-----------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| nr | swoistość | IDEXX | PIWet | nr | IDEXX | PIWet |
| 80 | US | 2,87 | 2,65 | 10434/11 | 0,45 | 0,33 |
| 403 | US | 2,75 | 2,78 | 10458/12 | 1,02 | 0,62 |
| 404 | US | 2,20 | 1,90 | 10458/3 | 0,54 | 0,13 |
| 501 | US | 2,10 | 3,49 | 10434/8 | 0,74 | 0,05 |
| 505 | US | 3,40 | 3,90 | 10464/7 | 0,64 | 0,08 |
| 506 | US | 1,98 | 3,10 | 9821/17 | 0,46 | 0,00 |
| 66 | EU | 1,69 | 2,60 | 9781/2 | 0,48 | 0,30 |
| 67 | EU | 3,09 | 3,30 | 9864/6 | 1,66 | 0,91 |
| 68 | EU | 2,40 | 3,20 | 10486/7 | 0,57 | 0,00 |
| 58 | EU | 0,91 | 1,90 | 10434/4 | 0,61 | 0,15 |
| 1102 | EU | 2,11 | 2,70 | 11057/8 | 0,57 | 0,16 |
| 1070 | EU | 2,95 | 3,20 | 11055/4 | 1,03 | 0,28 |
| B3/94 | EU | 0,50 | 0,88 | 11082/7 | 0,57 | 0,22 |
| B6/94 | EU | 1,96 | 2,07 | 11067/13 | 0,46 | 0,30 |
| B8/94 | EU | 3,01 | 3,50 | 11557/3 | 0,41 | 0,58 |

Objaśnienie: Wyniki wyrażono jako stosunek S/P. Wynik badania interpretowano jako dodatni, jeśli badana surowica dawała wartość S/P $\geq 0,4$ (IDEXX) lub $\geq 0,5$ (test własny). Surowice dodatnie o określonej swoistości pochodziły od świń szczepionych szczepionką Ingelvac PRRS MLV (US) lub szczepionką Porcilis PRRS (EU)

wiedzi serologicznej na infekcję. Tak więc surowice od świń zakażonych szczepem genotypu europejskiego mogą reagować z antygenem amerykańskim i odwrotnie. Zawsze jednak reakcja przeciwciał indukowanych zakażeniem szczepem PRRSV-EU będzie silniejsza z antygenem tego typu niż z antygenem PRRSV-US (15, 18). Porównanie wartości OD pozwala na ustalenie typu PRRSV, z jakim zetknęła się świnią. W tabeli 2 zamieszczono wyniki badania surowic od świń po doświadczalnym szczepieniu dwoma różnymi szczepionkami zawierającymi wirusy genotypu amerykańskiego lub europejskiego. Widać wyraźnie, że stosunek OD_{EU}/OD_{US} jest zawsze wyższy od 1,2, jeśli świnię miały kontakt wyłącznie z wirusem europejskim i równy lub niższy od 0,8, jeśli świnię miały kontakt wyłącznie z wirusem amerykańskim (tab. 2).

Trudniejsze do interpretacji są wyniki badania surowic z ferm, gdzie krążą oba genotypy. W takich stadach można spotkać zarówno surowice o współczynniku OD_{EU}/OD_{US} wyższym od 1,2, niższym od 0,8 oraz z przedziału 1,2-0,8. Wykonanie profilu serologicznego wskazuje, że świnię ulegają zakażeniu jednym szczepem wirusa (np. PRRSV-EU) i przez pewien czas odporność krzyżowa chroni je przed zakażeniem drugim szczepem (np. PRRSV-US). Badanie testem PIWet PRRS R ELISA na tym etapie wskazuje na pojedyncze zakażenie (wszystkie serologicznie dodatnie świnię posiadają $OD_{EU}/OD_{US} > 1,2$ lub OD_{EU}/OD_{US}

Tab. 2. Wyniki badania surowic testami ELISA PIWet surowic od świń zakażonych szczepami o genotypie europejskim i/lub amerykańskim

| Nr surowicy | Wynik ELISA PIWet S/P | Wynik ELISA PIWet R (OD_{EU}/OD_{US}) | Interpretacja |
|-------------|-----------------------|---|------------------------------------|
| (7719) 3 | 1,06 | 1,72 | Stado zakażone PRRSV-EU |
| (7719) 5 | 1,10 | 1,85 | |
| (7719) 6 | 1,33 | 1,96 | |
| (7719) 7 | 1,28 | 1,84 | |
| (7719) 15 | 1,86 | 3,54 | |
| (7719) 16 | 2,12 | 4,08 | |
| (7719) 17 | 2,34 | 3,28 | |
| (7719) 18 | 1,61 | 3,49 | |
| (6047) 3 | 1,77 | 1,276 | Stado zakażone PRRSV-EU i PRRSV-US |
| (6047) 4 | 1,19 | 1,056 | |
| (6047) 5 | 2,16 | 0,706 | |
| (6047) 6 | 1,75 | 1,409 | |
| (3400) 3 | 3,08 | 1,096 | |
| (3400) 4 | 2,58 | 1,108 | |
| (3400) 6 | 2,90 | 1,181 | |
| (3400) 8 | 2,12 | 1,314 | |
| (7945) 2 | 2,13 | 0,59 | Stado zakażone PRRSV-US |
| (7945) 5 | 1,92 | 0,64 | |
| (7945) 10 | 1,52 | 0,40 | |
| (7945) 11 | 1,16 | 0,35 | |
| (7945) 12 | 1,66 | 0,51 | |
| (7132) 2 | 1,41 | 0,42 | |
| (7132) 5 | 1,91 | 0,60 | |
| (7132) 8 | 1,35 | 0,62 | |

Objaśnienie: Wynik badania testem ELISA PIWet R wyrażano stosunkiem wartości OD surowicy z antygenem N-EU do wartości OD surowicy z antygenem N-US (OD_{EU}/OD_{US}). Stosunek $OD_{EU}/OD_{US} > 1,2$ świadczy o obecności w surowicy przeciwciał dla genotypu europejskiego, natomiast stosunek $OD_{EU}/OD_{US} < 0,8$ świadczy o obecności przeciwciał dla genotypu amerykańskiego. Wartości z przedziału 1,2-0,8 świadczą o możliwości zakażenia świń przez oba genotypy PRRSV

< 0,8). Po spadku poziomu odporności krzyżowej dochodzi do zakażenia drugim szczepem krążącym w stadzie i po kilku tygodniach surowice takich świń będą dawały wyniki oscylujące wokół wartości 1 współczynnika OD_{EU}/OD_{US} . Tak więc mieszane zakażenie stada można wykryć jedynie na podstawie badania surowic świń z wielu grup wiekowych.

Niewątpliwie test PIWet PRRS R ELISA należy stosować przed podjęciem decyzji o wyborze szczepionki. Badanie różnicujące jest niezbędne również w stadach zakażonych genotypem europejskim, gdzie stosowano szczepionkę żywą, atenuowaną opartą o amerykański genotyp wirusa, lub w stadach, które wprowadzały świnię z gospodarstw stosujących tę szczepionkę.

Wirus w niej zawarty ma bowiem zdolność długotrwałego utrzymywania się w stadzie świń, obok szczepów terenowych. Wirusy te często krążą w różnych grupach wiekowych lub różnych sektorach chlewni i dokładne poznanie dróg ich krążenia jest niezbędnym warunkiem do podjęcia programu zwalczania PRRS (21).

Przeprowadzone badania wskazują na zasadność dwuetapowego postępowania w różnicowej diagnostyce serologicznej PRRS. W pierwszym etapie surowice należy badać testem ELISA ze zmieszonym antygenami genotypów (ELISA IDEXX lub PIWet), a w drugim, testem różnicującym PIWet R badać jedynie surowice reagujące dodatnio w pierwszym etapie.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że opracowane testy ELISA, PIWet PRRS i PIWet R PRRS są skutecznymi i wartościowymi narzędziami do wykrywania PRRS, a ich przydatność została zweryfikowana w praktyce laboratoryjnej.

Piśmiennictwo

1. Albina E., Leforban Y., Baron T., Plana Duran J. P., Vannier P.: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.* 1992, 23, 167-176.
2. Cho H. J., Deregt D., Joo H. S.: An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome: Production of antigen of high quality. *Canad. J. Vet. Res.* 1996, 60, 89-93.
3. Collins J. E., Benfield D. A., Christianson W. T., Harris L., Hennings J. C., Shaw D. P., Goyal S. M., McCullough S., Morrison R. B., Joo H. S., Gorcyca D., Chladek D.: Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 117-126.
4. Dea S., Wilson L., Therrien D., Cornaglia E.: Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E. coli-expressed nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods* 2000, 87, 109-122.
5. Denac H., Moser C., Tratschin J. D., Hofmann M. A.: An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *J. Virol. Methods* 1997, 65, 169-181.
6. Drew T. W.: Studies on the genome and proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Praca dokt. The Open University, London* 1996.
7. Ferrin N. H., Fang Y., Johnson C. R., Murtaugh M. P., Polson D. D., Torremorell M., Gramer M. L., Nelson E. A.: Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11, 503-514.
8. Goyal S. M.: Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, 5, 656-664.
9. Houben S., Callebaut P., Pensaert M. B.: Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J. Virol. Methods* 1995, 51, 125-128.
10. Keffaber K. K.: Reproductive failure of unknown etiology. *Amer. Ass. Swine Pract. Newsletter* 1989, 1, 1-10.
11. Neumann E. J., Kliebenstein J. B., Johnson C. D., Mabry J. W., Bush E. J., Seitzinger A. H., Green A. L., Zimmerman J. J.: Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 227, 385-392.
12. Nodelijk G., Wensvoort G., Kroese B., van Leengoed L., Colijn E., Verheijden J.: Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 1996, 49, 285-295.
13. Pejsak Z., Pawinski J., Stadejek T.: Objawy kliniczne oraz straty ekonomiczne związane z wystąpieniem zespołu rozrodco-oddechowego świń w fermie wielkotowarowej. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 521-524.
14. Ropp S. L., Wees C. E., Fang Y., Nelson E. A., Rossow K. D., Bien M., Arndt B., Preszler S., Steen P., Christopher-Hennings J., Collins J. E., Benfield D. A., Faaborg K. S.: Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J. Virol.* 2004, 78, 3684-3703.
15. Seuberlich T., Tratschin J. D., Thur B., Hofmann M. A.: Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9, 1183-1191.
16. Snijder E. J., Meulenberg J. J. M.: The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 961-979.
17. Sorensen K. J., Botner A., Madsen E. S., Strandbygaard B., Nielsen J.: Evaluation of a blocking Elisa for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 1-8.
18. Sorensen K. J., Strandbygaard B., Botner A., Madsen E. S., Nielsen J., Have P.: Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 1998, 60, 169-177.
19. Stadejek T., Oleksiewicz M. B., Potapchuk D., Podgorska K.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 1835-1841.
20. Stadejek T., Pejsak Z.: Zastosowanie testu immunoperoksydazowego w diagnostyce serologicznej rozrodco-oddechowego zespołu chorobowego świń. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 340-342.
21. Stadejek T., Stankiewicz I., Pejsak Z.: Krążenie dwóch genotypów wirusa zespołu rozrodco-oddechowego świń (PRRSV) w stadzie świń w Polsce. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 321-325.
22. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J. M. A., ter Laak E. A., Bloemraad M., de Kluyver E. P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J. M., Moonen P. L. J. M., Zetstra T., de Boer E. A., Tibben H. J., de Jong M. F., van't Veld P., Groenland G. J. R., van Gennep J. A., Voets M. T., Verheijden J. H. M., Braamskamp J.: Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 1991, 13, 121-130.
23. Witte S. B., Chard-Bergstrom C., Loughin T. A., Kapil S.: Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, 7, 700-702.
24. Yoon I. J., Joo H. S., Christianson W. T., Kim H. S., Collins J. E., Morrison R. B., Dial G. D.: An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 144-147.
25. Yoon I. J., Joo H. S., Goyal S. M., Molitor T. W.: A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 289-292.

Adres autora: doc. dr hab. Tomasz Stadejek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: stadejek@piwet.pulawy.pl