

Zastosowanie odczynu fluorescencji w świetle spolaryzowanym w diagnostyce brucelozy bydła

KRZYSZTOF SZULOWSKI, JOLANTA MURAT, WOJCIECH IWANIAK,
MARCIN WEINER, JÓZEF PILASZEK

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

Szulowski K., Murat J., Iwaniak W., Weiner M., Pilaszek J.

Application of a fluorescence polarization assay in the diagnosis of brucellosis in cattle

Summary

In view of the large scale of surveys, the diagnosis of brucellosis is primarily based on serological examinations. Regarding cattle, RBT, SAT, CFT, Coombs, 2-ME and ELISA are used in Poland. The process is laborious and time-consuming. The problem of differentiation between positive reactions caused by *Brucella* and antigenically cross-reactive bacteria remains unresolved. The aim of the study was an application of a fluorescence polarization assay (FPA) for the examinations of sera from cattle for brucellosis. Four hundred fifty sera from cattle, including 300 sera from healthy animals, 27 sera from infected animals and 123 sera originated from confirmatory investigations, were used. The results obtained in FPA were compared to the results of RBT, SAT, CFT and ELISA. All sera from healthy animals were negative in FPA, whereas sera from infected animals were positive. Among sera from confirmatory investigations, 8 sera were positive in FPA. This likewise concerned sera positive both in CFT and ELISA. All sera positive only in RBT and SAT were negative in FPA. The results of the examinations show that FPA is a useful method for the diagnosis of brucellosis in cattle.

Keywords: diagnosis, serology, brucellosis, FPA

Ze względu na masowość badań, diagnostyka laboratoryjna brucelozy opiera się przede wszystkim na badaniach serologicznych. Polegają one na stwierdzeniu obecności specyficznych przeciwciał w organizmie zwierzęcia indukowanych przez drobnoustroje *Brucella*. Skala prowadzonych badań w Polsce jest szczególnie duża w przypadku bydła i odbywa się zgodnie z ustalonym algorytmem. Do tej pory 1/3 pogłowia bydła rocznie poddana jest badaniom skriningowym przy użyciu odczynu kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP) wykonywanym przez laboratoria ZHW (2). W przypadku uzyskania wyniku dodatniego, laboratoria te wykonują badania podstawowe przy użyciu odczynu aglutynacji próbówkowej (OA) i odczynu wiązania dopełniacza (OWD) (1, 3). W każdym przypadku uzyskania wyniku dodatniego w OWD (20 lub więcej międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml – mjpwd/ml), zbadaną surowicę należy przesłać do Laboratorium Referencyjnego Brucelozy (LRB) przy PIWet – PIB w Puławach, celem wykonania badania potwierdzającego (4). Natomiast jeśli surowica dodatnia w OKAP reaguje dodatnio tylko w OA (więcej niż 30 międzynarodowych jednostek aglutynacyjnych w 1 ml – jm/ml), badanie

potwierdzające wykonuje ZHW, a do badania należy pobrać krew po 30 dniach od poprzedniego pobrania. Badanie to wykonuje się również metodami OA i OWD. Każdy wynik dodatni w OA i/lub w OWD wymaga potwierdzenia przez LRB. Laboratorium to bada surowicę przy użyciu OA, OWD, odczynu z 2-merkaptotanołem (OME), odczynu antyglobulinowego (OAG) i ELISA. Surowicę uznaje się za reagującą dodatnio, jeśli LRB potwierdzi wyniki dodatnie uzyskane w OWD i/lub uzyska wyniki dodatnie w badaniach dodatkowych jedną z trzech pozostałych metod – OME, OAG lub ELISA. Procedura jest więc długotrwała i pracochłonna.

Pomimo wysokiej wartości diagnostycznej stosowanych testów serologicznych, wciąż nierozwiązanym problemem jest niekiedy brak możliwości rozróżnienia reakcji swoistych – będących wynikiem zakażenia pałeczkami *Brucella*, od reakcji krzyżowych powodowanych przez drobnoustroje o pokrewnej antygenowo budowie. Szczególne problemy stwarzają w tym względzie infekcje *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana*. Trudności diagnostyczne wynikają stąd, że niektóre, w tym wymienione, gatunki bakterii posia-

dają identyczne lub podobne antygeny lipopolisacharydowe (LPS). Stąd wciąż trwają poszukiwania metod o coraz lepszych parametrach diagnostycznych. Metody takie powinny być czułe, pozwalające na wykrycie zakażeń we wszystkich stadiach, w tym zakażeń wczesnych i przewlekłych, specyficzne, pozwalające na wyeliminowanie reakcji krzyżowych i nieswoistych oraz szybkie, tanie i proste w wykonaniu.

Do grona takich metod aspiruje w ostatnich latach odczyn fluorescencji w świetle spolaryzowanym – FPA (fluorescence polarization assay) (6, 13, 15-17). Zdaniem badaczy, metoda ta charakteryzuje się wysokimi wartościami diagnostycznymi i może być stosowana zarówno do badania surowic bydła, jak i świń. Międzynarodowy Urząd ds. Epizootii (OIE) wymienia tę metodę, obok OKAP, OWD i ELISA, jako test zalecany do stosowania w diagnostyce brucelozy bydła oraz jako test alternatywny (obok OKAP) do badania surowic świń (5).

Celem badań było zastosowanie FPA do badania surowic bydła i wstępna ocena wartości tego odczynu w porównaniu do metod dotychczas stosowanych.

Materiał i metody

Zestaw diagnostyczny FPA. W badaniach użyto zestawu diagnostycznego Brucella abortus antibody test kit – Brucella FPA (USDA, USA). Badania przeprowadzano w probówkach ze szkła boro-krzemowego. Do kolejnych probówek dodawano po 1 ml rozcieńczonego buforu do przeprowadzenia reakcji, a następnie po 10 µl kontroli negatywnej (w 3 powtórzeniach), kontroli pozytywnej oraz badanych próbek surowic. Po dokładnym wymieszaniu zawartości probówek przy użyciu mieszadła typu vortex, próbki inkubowano w temperaturze pokojowej (18-25°C) przez 5 min. Po umieszczeniu probówek w czytniku Sentry FPA 100 (Diachemix LLC, USA) dokonywano wstępnego odczytu dla buforu i badanych próbek (próbki ślepe). Kolejno do probówek dodawano 10 µl koniugatu O-polisacharydu z fluoresceiną i ponownie mieszano. Poszczególne próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min., a następnie ponownie dokonywano odczytu wartości fluorescencji wyrażonej w jednostkach milipolaryzacji (mP), uwzględniającej wartości dla próbek ślepych. Dla 3 próbek kontroli ujemnej obliczano średnią wartość mP. Test spełniał kryteria walidacyjne, jeśli wartość mP dla kontroli dodatniej mieściła się w przedziale 120-250 i średnia wartość kontroli ujemnej znajdowała się pomiędzy 70-95 mP. W przypadku, kiedy wartości dla tych kontroli znajdowały się poza granicami powyższych przedziałów, zgodnie z zaleceniami producenta dokonywano ponownej kalibracji czytnika. Interpretacji uzyskanych wyników dokonywano poprzez określenie parametru, o ile wartości mP dla badanych próbek przekraczały średnią wartość mP uzyskaną dla kontroli ujemnych, zgodnie z zasadą podaną w tab. 1.

Wszystkie próbki ocenione jako wątpliwe lub dodatnie poddawano ponownemu badaniu z użyciem podwójnej objętości surowicy, czyli 20 µl. Wszystkie wyniki wątpliwe lub dodatnie, uzyskane w tym badaniu, traktowano jako ostateczne.

Tab. 1. Interpretacja wyników badania surowic w FPA

Wartość mP ponad wartość kontroli ujemnej	Wynik
< 10 mP	ujemny
10-20 mP	wątpliwy
> 20 mP	dodatni

OKAP, OA, OWD. Testy te wykonywano według obowiązujących instrukcji (1-3).

ELISA. Użyto zestawu Brucellosis serum ELISA (Pourquier, Francja). Test wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta.

Surowice. Do badań użyto 450 surowic bydła. Stanowiły je:

grupa 1 – surowice pochodzące od zdrowych zwierząt, reagujące ujemnie w OKAP, OA, OWD i ELISA, w liczbie 300,

grupa 2 – surowice pochodzące od zwierząt uznanych za zakażone (surowice otrzymane z Wlk. Brytanii, Francji oraz pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii PIWet-PIB w Puławach, sprzed roku 1990), w liczbie 27,

grupa 3 – surowice pochodzące z badań potwierdzających prowadzonych przez LRB, z lat 2001-2007, w liczbie 123.

Wyniki i omówienie

W badaniu testem FPA 300 surowic pochodzących od zwierząt zdrowych uzyskano wszystkie wyniki ujemne, podobnie jak w OKAP, OA, OWD i ELISA (tab. 2).

Kolejno poddano badaniu 27 surowic bydła pochodzących od zwierząt zakażonych (tab. 3). We wszystkich tych surowicach stwierdzono obecność przeciwciał anti-Brucella przy użyciu metod dotychczas stosowanych. W OKAP wynik dodatni stwierdzono w 25 przypadkach. W OA we wszystkich surowicach wykazano obecność przeciwciał anti-Brucella, przy czym w jednym przypadku ich poziom wynosił 25,5 j/m/ml, czyli poniżej wartości 30 j/m/ml, stanowiącej dolną granicę dla wartości określanych jako dodatnie w tym odczynie. Wszystkie pozostałe surowice określono jako dodatnie, a obserwowany poziom przeciwciał kształtował się w przedziale 36-246 j/m/ml. W przypadku OWD uzyskano wszystkie wyniki dodatnie (20-640 mjpwd/ml), podobnie jak w ELISA. Surowice te w każdym przypadku reagowały dodatnio w FPA.

Tab. 2. Wyniki badań w kierunku brucelozy 300 surowic bydła pochodzących od zwierząt zdrowych

Metoda	Wynik badania	
	dodatni	ujemny
OKAP	0	300
OA	0	300
OVD	0	300
ELISA	0	300
FPA	0	300

Tab. 3. Wyniki badań w kierunku brucelozy 27 surowic bydła pochodzących od zwierząt zakażonych

Numer surowicy	OKAP	OA (jm/ml)*	OWD (mjpwd/ml)**	ELISA	FPA
1	+	+ (51,5)	+ (186)	+	+
2	+	+ (61,5)	+ (40)	+	+
3	+	+ (102,5)	+ (23,3)	+	+
4	-	+ (36)	+ (40)	+	+
5	+	+ (102,5)	+ (46,5)	+	+
6	+	+ (36)	+ (46,5)	+	+
7	-	+ (51,5)	+ (20)	+	+
8	+	- (25,5)	+ (40)	+	+
9	+	+ (123)	+ (80)	+	+
10	+	+ (123)	+ (80)	+	+
11	+	+ (36)	+ (46,5)	+	+
12	+	+ (246)	+ (46,5)	+	+
13	+	+ (246)	+ (424)	+	+
14	+	+ (102,5)	+ (23,3)	+	+
15	+	+ (246)	+ (320)	+	+
16	+	+ (164)	+ (80)	+	+
17	+	+ (102,5)	+ (46,5)	+	+
18	+	+ (51,5)	+ (80)	+	+
19	+	+ (123)	+ (20)	+	+
20	+	+ (246)	+ (20)	+	+
21	+	+ (102,5)	+ (80)	+	+
22	+	+ (102,5)	+ (23,3)	+	+
23	+	+ (164)	+ (23,3)	+	+
24	+	+ (102,5)	+ (186)	+	+
25	+	+ (51,5)	+ (186)	+	+
26	+	+ (246)	+ (640)	+	+
27	+	+ (123)	+ (212)	+	+

Objaśnienia: * – jednostki międzynarodowe w 1 ml; ** – międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml

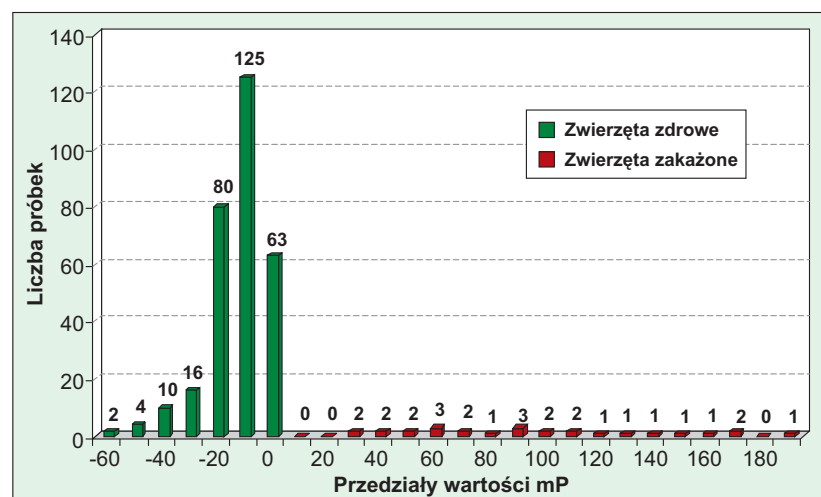
Tab. 4. Wyniki badań w kierunku brucelozy 123 surowic bydła pochodzących z badań potwierdzających prowadzonych przez LRB

Grupa surowic	Wyniki badań w FPA	
	ujemne	dodatnie
Surowice dodatnie tylko w OKAP i OA (n = 103)	103	0
Surowice dodatnie w OKAP, OA i OWD (n = 20)	12	8
w tym:		
dodatnie w ELISA (n = 9)	1	8
ujemne w ELISA (n = 11)	11	0
Razem: n = 123	115	8

Spośród 123 surowic bydła pochodzących z badań potwierdzających, 103 reagowały dodatnio tylko w OKAP i OA (tab. 4). Wszystkie te surowice były ujemne w FPA. Z kolei w badaniu 20 pozostałych surowic, reagujących dodatnio również w OWD, w 8 przypadkach uzyskano dodatni wynik w FPA. Dotyczyło to surowic, w których potwierdzono obecność przeciwciał anti-Brucella w ELISA. Spośród 9 takich surowic tylko jedna reagowała ujemnie w FPA. Natomiast wszystkie surowice dodatnie w OWD, ale ujemne w ELISA (11 sztuk), były ujemne również w FPA.

Na ryc. 1 przedstawiono rozkład wartości jednostek mP uzyskany w FPA w badaniu próbek surowic pochodzących od krów zdrowych i od zakażonych. Wynika z niej, że w badaniu surowic od krów zdrowych najczęściej uzyskiwano wartości mP w przedziałach od -20 do -10 mP (125 próbek) i od -30 do -20 (80 próbek). W badaniu próbek surowic od krów zakażonych wartości rozproszone były dość równomiernie w zakresie wartości od 20 do 190 mP.

Uzyskane wyniki badań, które należy traktować jako wstępny etap oceny wartości metody FPA w warunkach naszego kraju, wskazują na możliwość zastosowania tej metody w diagnostyce brucelozy bydła. Badania walidacyjne dotyczące tej metody przeprowadzone zostały już w kilku krajach (6, 13, 15, 16). Autorzy badań wskazują, że jest to metoda czuła i swoista. Ponadto jest stosunkowo prosta w wykonaniu, pozwala na bardzo szybkie uzyskanie wyniku i umożliwia zastosowanie w warunkach terenowych (15, 21). Zaletą metody jest jej mniejsza, w stosunku do dotychczas stosowanych metod, podatność na wykrywanie przeciwciał indukowanych przez drobnoustroje o pokrewnej z brucellami budowie antygenowej, w tym *Yersinia enterocolitica* O:9 i *Escherichia coli* O:157 (19). Ponadto, w krajach gdzie stosowane są szczepienia, FPA pozwala na odróżnienie reakcji poszczepiennej od reakcji będącej wynikiem zakażenia organizmu zwierzęcia drobnoustrojami *Brucella* (21). W przypadku bydła podstawowym materia-



Ryc. 1. Wyniki badań testem FPA w kierunku brucelozy surowic bydła pochodzących od zwierząt zdrowych i zakażonych

łem do badania w FPA jest surowica, ale metoda ta może być użyta także do badania mleka, podobnie jak ELISA (15, 18). FPA nie jest testem specyficznym gatunkowo, dzięki czemu można go użyć do badania różnych gatunków zwierząt. Nielsen i wsp. (17) pozytywnie ocenili jego wartość w diagnostyce brucelozy świń. Ponadto metodę stosowano do badania w kierunku brucelozy surowic kóz, owiec, a nawet dzikich zwierząt, takich jak bizona i foki (10, 14, 20, 22). Te ostatnie mogą być zakażone przez odkryte w ostatnich latach pałeczki *Brucella*, określane jako *B. pinnipediae* (7, 9). FPA znajduje również zastosowanie w diagnostyce brucelozy ludzi (11). Uzyskane na materiale pochodzącym od bydła wyniki potwierdziły specyficzność metody – wszystkie surowice pochodzące od zwierząt zdrowych były ujemne w FPA. Z drugiej strony, wszystkie surowice pochodzące od zwierząt zakażonych reagowały dodatnio w FPA, co świadczy że metoda jest czuła i pozwala na wykrycie obecności specyficznych przeciwciał anty-*Brucella*. Ciekawie przedstawiają się rezultaty badań surowic pochodzących z badań potwierdzających. Wskazują one na większą specyficzność FPA w stosunku do innych, dotychczas stosowanych metod, szczególnie do OKAP i OA, ale też i OWD. Zwraca uwagę fakt, że część dodatnich wyników uzyskanych w OWD nie została potwierdzona dodatnim wynikiem w FPA. Miało to miejsce w sytuacji, kiedy wynikowi dodatniemu w OWD nie towarzyszył dodatni wynik w ELISA. Może to świadczyć, że za część dodatnich wyników w OWD odpowiadają drobnoustroje reagujące krzyżowo z antygenem *Brucella*.

W warunkach naszego kraju duża specyficzność metody wskazuje na perspektywy jej wykorzystania jako jednej z metod potwierdzających, wykorzystywanych przez Laboratorium Referencyjne Brucelozy, w odniesieniu do bydła. Należy jednak nadmienić, że dotychczas nie dokonano pełnej standaryzacji metody w skali międzynarodowej, na co wskazują rezultaty badań uzyskane w różnych krajach UE w ramach testów porównawczych (12). Barię do szerszego jej wykorzystania jest też konieczność posiadania dość kosztownego wyposażenia w postaci czytnika, probówek ze szkła boro-krzemowego i odczynników. Doświadczenia własne wskazują również, że metoda jest wrażliwa nawet na drobne zmiany warunków wykonywania testu.

Badania mające na celu ocenę wartości diagnostycznej FPA będą kontynuowane, w tym na materiale pochodzącym od świń, gdzie potrzeba zastosowania nowych testów, pozwalających na odróżnienie reakcji specyficznych indukowanych przez drobnoustroje *Brucella* od reakcji krzyżowych, jest jeszcze większa niż u bydła.

Piśmiennictwo

- Anon.: Instrukcja nr 26/2003 Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 25 czerwca 2003 r. dotycząca przeprowadzenia badań laboratoryjnych w kierunku brucelozy metodą odczynu aglutynacji probówkowej (OA).
- Anon.: Instrukcja nr 27/2003 Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 25 czerwca 2003 r. dotycząca przeprowadzenia badań laboratoryjnych w kierunku brucelozy metodą odczynu kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP).
- Anon.: Instrukcja nr 28/2003 Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 25 czerwca 2003 r. dotycząca przeprowadzenia badań laboratoryjnych w kierunku rozpoznawania brucelozy zwierząt metodą odczynu wiązania dopełniacza (OWD).
- Anon.: Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWz.401/Bru-28/2006 z dnia 24 lipca 2006 r. w sprawie postępowania przy prowadzeniu badań kontrolnych występowania i przy zwalczaniu brucelozy.
- Anon.: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, Paris 2004.
- Bahn P., Nöckler K.: Validation of the Fluorescence Polarisation Assay (FPA) for the serological diagnosis of brucellosis. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 2005, 118, 372-376.
- CloECKAERT A., Grayson M., Grepinet O., Boumedine K. S.: Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction sit-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect. 2003, 5, 593-602.
- Dajer A., Luna-Martinez E., Zapata D., Villegas S., Gutierrez E., Pena G., Gurria F., Nielsen K., Gall D.: Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. Prev. Vet. Med. 1999, 40, 67-73.
- Foster G., MacMillan A. P., Godfroid J., Howie F., Ross H. M., CloECKAERT A., Reid R. J., Brew S., Patterson I. A. P.: A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Vet. Microbiol. 2002, 563-580.
- Gall D., Nielsen K., Forbes L., Davis D., Elzer P., Olsen S., Balsevicius S., Kelly L., Smith P., Tan S., Joly D.: Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. J. Wildl. Dis. 2000, 36, 469-476.
- Lucero N. E., Escobar G. I., Ayala S. M., Silva Paulo P., Nielsen K.: Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. J. Med. Microbiol. 2003, 52, 883-887.
- McGIVEN J. A., Stack J. A., Perrett L. L., Tucker J. D., Brew S. D., Stubberfield E., MacMillan A. P.: Harmonisation of European tests for serological diagnosis of infection in bovines. Rev. Sci. Tech. 2006, 25, 1039-1053.
- McGIVEN J. A., Tucker J. D., Perrett L. L., Stack J. A., Brew S. D., MacMillan A. P.: Validation of FPA and eLISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. J. Immunol. Methods. 2003, 278, 171-178.
- Minas A., Stournara A., Minas M., Stack J., Petridou E., Christodoulou-poulos G., Krikelis V.: Validation of a fluorescence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests used for diagnosing *B. melitensis* infection in sheep and goats. J. Immunol. Methods 2007, 320, 94-103.
- Nielsen K., Gall D., Bermudek R., Renteria T., Moreno F., Corral A., Monroy O., Monje F., Smith P., Widdison J., Mardrueno M., Calderon N., Guerrero N., Tinoco R., Osuna J., Kelly W.: Field trial of the brucellosis fluorescence polarization assay. J. Immunoassay Immunochem. 2002, 23, 307-316.
- Nielsen K., Gall D., Smith P., Kelly W., Yeo J., Kenny K., Heneghan T., McNamara S., Maher P., O'Connor J., Walsh B., Carroll J., Rojas X., Rojas F., Perez B., Wolff O., Bufoni L., Salustio E., Gregoret R., Samartino L., Dajer A., Luna-Martinez E.: Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. Vet. Microbiol. 2001, 80, 163-170.
- Nielsen K., Gall D., Smith P., Vigliocco A., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A., Elzer P., Enright F.: Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. Vet. Microbiol. 1999, 68, 245-253.
- Nielsen K., Smith P., Gall D., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A., Rojas X., Kelly W.: Validation of the fluorescence polarization assay for detection of milk antibody to *Brucella abortus*. J. Immunoassay Immunochem. 2001, 22, 203-211.
- Nielsen K., Smith P., Widdison J., Gall D., Kelly L., Kelly W., Nicoletti P.: Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O:157:H7. Vet. Microbiol. 2004, 100, 25-30.
- Nielsen O., Nielsen K., Braun R., Kelly L.: A comparison of four serologic assays in screening for *Brucella* exposure in Hawaiian monk seals. J. Wildl. Dis. 2005, 41, 126-133.
- Ramirez-Pfeiffer C., Nielsen K., Marin-Ricalde F., Rodriguez-Padilla C., Gomez-Flores R.: Comparison of fluorescence polarization assay with card and complement fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high-prevalence area. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006, 110, 121-127.
- Ramirez-Pfeiffer C., Nielsen K., Smith P., Marin-Ricalde F., Rodriguez-Padilla C., Gomez-Flores R.: Application of the fluorescence polarization assay for detection of caprine antibodies to *Brucella melitensis* in areas of high prevalence and widespread vaccination. Clin. Vaccine Immunol. 2007, 14, 299-303.

Adres autora: doc. dr hab. Krzysztof Szulowski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kszjanow@piwet.pulawy.pl