

JERZY ROLA, JAN ŻMUDZIŃSKI

Ocena testu ELISA do wykrywania przeciwciał dla wirusa BHV 1

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

Summary

Evaluation of the ELISA test for the detection of antibodies against BHV 1 virus

The aim of the study was to evaluate the ELISA (Rhône Mérieux) test for the detection of antibodies against BHV 1 virus. The SN test was used as a control one. One hundred and forty four sera from two farms were tested. Twenty four (33.8%) positive sera in the ELISA and only 17 (23.9%) in the classical SN test (serum dilution 1:2, 37 °C/1h) were found in animals from farm B which contained 71 cows. The results of ELISA and classical SN tests were consistent in 70.8%. A complete agreement (100%) of results between ELISA and SN tests were noted by use of the SN test in Bitsch's modification (24 hrs incubation at room temperature). In addition, it was found that the higher titer in the SN test, the higher OD values in the ELISA test were observed (correlation coefficient $r = 0.9551$).

Diagnostyka serologiczna ma istotne znaczenie dla oceny sytuacji epizootycznej oraz jest podstawą w programach zwalczania zakażeń wirusem BHV 1. Coraz częściej przy obrocie bydła, szczególnie przy eksporcie, wymagana jest deklaracja, że zwierzę jest wolne od zakażenia wirusem BHV 1. Również nasienie używane do inseminacji krów nie powinno zawierać wirusa BHV 1. Obecność przeciwciał potwierdza, że zwierzę zetknęło się z wirusem, może zatem być zakażone latentnie i może być siewcą wirusa. Powszechnie stosowanymi i uznanymi testami serologicznymi są test neutralizacji wirusa (SN) i test ELISA. Jednakże, w piśmiennictwie dotyczącym wirusa BHV 1 występują doniesienia stwierdzające, że klasyczny test SN nie jest wystarczająco czuły, przez co może dawać wyniki fałszywie ujemne (1, 2, 3, 4). Sytuacja taka może wystąpić u zwierząt latentnie zakażonych, u których nie doszło do reaktywacji zakażenia przez dłuższy okres, przez co poziom przeciwciał jest bardzo niski. Dodatkowo wykonanie testu SN jest czasochłonne i wymaga prowadzenia hodowli komórkowej. Z kolei test ELISA, aby był testem czułym i wiarygodnym, musi być dobrze opracowany i właściwie wykonany.

Celem pracy była ocena testu ELISA firmy Rhône Mérieux do wykrywania przeciwciał dla wirusa BHV 1. Jako test odniesienia zastosowano test SN.

Materiał i metody

Surowice. Do badań użyto 144 surowice pobrane od krów z 2 gospodarstw rolnych.

Test ELISA. W badaniach użyto gotowych zestawów ELISA oferowanych przez firmę Rhône Mérieux. Test wykonywano ściśle wg zaleceń producenta. Pomiaru gęstości optycznej (OD) dokonywano przy użyciu spektrofotometru (MCC/340 Labsystems Multiskan) przy długości fali 450 nm.

Klasyczny odczyn seroneutralizacji (SN) – wykonywano metodą beta w 96-dółkowych płytkach (Costar) z płaskim dnem. Badane surowice inaktywowano w temp. 56°C przez 30 min. Następnie wykonywano rozcieńczenie 1:2 przeznaczając po 3 dołki na każdą surowicę. Do 50 µl badanej surowicy w rozcieńczeniu 1:2 dodawano 50 µl zawiesiny wirusa IPV 468 zawierającej dawkę 100 TCID₅₀. Mieszaninę wirus/surowica wstrząsano i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C, w 4% CO₂. Po tym czasie dodawano 100 µl zawiesiny komórek linii ciągłej MDBK o koncentracji 10⁵ komórek/ml. Wynik odczytywano po 3-5 dniach inkubacji w temp. 37°C, w 4% CO₂. Na płytce umieszczano także kontrolę wirusa, kontrolę komórek oraz kontrolę znanej, dodatniej surowicy.

Odczyn neutralizacji wg Bitscha – wykonywano identycznie jak klasyczny SN stosując surowicę nierozcieńczoną i wydłużając okres inkubacji mieszaniny wirus/surowica do 24 godz. w temp. pokojowej.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań serologicznych uzyskane w teście ELISA i w klasycznym SN z surowicami rozcieńczonymi 1:2 przedstawiono w tab. 1. W gospodarstwie B liczącym 71 krów stwierdzono w teście ELISA 24 dodatnie surowice, a tylko 17 z nich reagowało dodatnio w klasycznym SN. Odsetek surowic dodatnich w teście ELISA stanowił więc 33,8% podczas gdy w klasycznym SN jedynie 23,9%. Porównując liczbę dodatnich wyników w teście ELISA z liczbą dodatnich wyników klasycznego SN stwierdzono zgodność pomiędzy oboma testami na poziomie 70,8%.

W przypadku gospodarstwa A wszystkie przebadane surowice były ujemne w obu testach.

Surowice dodatnie w teście ELISA, a ujemne w klasycznym SN (rozcieńczenie surowicy 1:2, okres inkubacji 1 godz./37°C) poddano weryfikacji w klasycznym SN używając surowic nierozcieńczonych

Tab. 1. Wyniki badań serologicznych w teście ELISA i w klasycznym SN (1 h / 37°C, rozcieńczenie surowicy 1:2)

Gospodarstwo	Liczba badanych prób	ELISA		SN		Zgodność wyników testu SN wobec ELISA %
		dotatni	ujemny	dotatni	ujemny	
		liczba (%)		liczba (%)		
A	73	0	73 (100)	0	73 (100)	100
B	71	24 (33,8)	47 (66,2)	17 (23,9)	54 (76,1)	70,8

i w teście SN wg Bitscha używając surowic nierozcieńczonych i stosując 24-godzinny okres inkubacji w temperaturze pokojowej. Ogółem weryfikacji poddano 7 surowic. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 2. Dla 5 surowic wykazujących najwyższe wartości gęstości optycznej (\bar{OD} 0,787 \pm 0,259) uzyskano dodatni wynik w SN już po 1 godz. inkubacji wirusa z surowicą nierozcieńczoną (próbki nr 24, 26, 39, 49, 67). Jedynie surowice nr 3 i 19, dodatnie w teście ELISA, pozostały nadal ujemne w klasycznym teście SN. Surowice te posiadały niskie wartości gęstości optycznej odpowiednio 0,300 i 0,438 w teście ELISA. Dopiero test neutralizacji wg Bitscha (surowica nierozcieńczona, wirus 100 TCID₅₀, 24 godz. okres neutralizacji w temp. pokojowej) wykazał obecność przeciwciał dla wirusa BHV 1 w surowicach nr 3 i 19. Stosując zatem test neutralizacji w modyfikacji Bitscha uzyskano zgodność wyników testów ELISA i SN na poziomie 100% przy badaniu surowic zawierających przeciwciała dla wirusa BHV 1. Również 100% zgodność wyników testu ELISA i testu SN uzyskano podczas badania surowic nie zawierających przeciwciał dla wirusa BHV 1.

Interesujące wyniki uzyskano porównując miano SN i wartości OD w teście ELISA dla surowic dodatnich. Wyniki te przedstawiono w tab. 3. Na

Tab. 2. Weryfikacja dodatnich wyników testu ELISA wobec klasycznego (1 godz./37°C) i wg Bitscha (24 godz./20°C) testu SN z surowicą nierozcieńczoną

Nr surowicy	OD ELISA	SN (1 godz./37°C; sur. nierozcieńczona)		SN (24 godz./20°C; sur. nierozcieńczona)	
		dotatni	ujemny	dotatni	ujemny
3	0,300		-	+	
19	0,438		-	+	
24	1,075	+			
26	0,842	+			
39	0,387	+			
49	1,028	+			
67	0,603	+			

podstawie danych tych zaobserwowano prawidłowość, że im wyższe miano przeciwciał w teście SN tym wyższa wartość OD w teście ELISA przy malejącej wartości odchylenia standardowego. Współczynnik korelacji pomiędzy wartością miana w teście SN wyrażoną jako logarytm odwrotności rozcieńczenia oraz wartością OD testu ELISA był wysoki – $r = 0,9551$. Potwierdza to sugestię, że zgodność wyników testu ELISA i klasycznego testu SN zbliża się do wartości 100% przy badaniu surowic zawierających przeciwciała dla wirusa BHV 1 o wysokich mianach.

Tab. 3. Porównanie mian SN i wartości OD surowic dodatnich w teście ELISA

Miano SN log	OD 450 nm
0,3010	0,547
0,6021	1,038 \pm 0,546
0,9031	1,132 \pm 0,369
1,2041	1,288 \pm 0,210
1,5051	1,477 \pm 0,185
1,8062	1,250 \pm 0,053

$r = 0,9551$

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi piśmiennictwa (1, 2, 3, 5, 7, 10, 11). Bitsch (1, 2, 3) wykazał, że test SN, w którym mieszanina wirus/surowica inkubowana była przez 24 godz. był testem czulszym od klasycznego (czas inkubacji 1 godz./37°C) testu SN. Również Cho i Bohac (5) oraz Deregt i wsp. (7) wykazali, że wydłużenie okresu inkubacji mieszaniny reakcyjnej do 24 godz. spowodowało podwyższenie czułości testu SN. Ponadto autorzy ci stwierdzili, że dodatek dopełniacza do mieszaniny wirus/surowica powodował dodatkowy wzrost czułości testu SN. Z kolei badania jakie przeprowadzili Potgieter oraz Rossi i Kiessel dostarczyły informacji o zależności pomiędzy klasą immunoglobulin, obecnością dopełniacza, a efektywnością neutralizacji wirusa. Pierwszy z wymienionych autorów wykazał, że proces neutralizacji wirusa BHV 1 przez prze-

ciwciała klasy IgM zależny był od obecności dopełniacza, podczas gdy zależności takiej nie obserwowano w przypadku przeciwciał klasy IgG (10). Rossi i Kiessel (11) stwierdzili, że zarówno przeciwciała klasy IgM jak IgG, produkowane bezpośrednio po zakażeniu wirusem BHV 1, wymagały do neutralizacji wirusa obecności dopełniacza, przy czym zależność ta była silniej wyrażona w przypadku przeciwciał klasy IgM. Collins i wsp. (6) porównując 3 testy serologiczne (test seroneutralizacji, wiązania dopełniacza, ELISA) oceniali ich przydatność do określenia miana przeciwciał oraz czasu pojawienia się pierwszych przeciwciał u zwierząt zakażonych doświadczalnie. Autorzy stwierdzili, że test ELISA był testem czulszym od testów OWD i SN, a ponadto

wykrywał swoiste przeciwciała wcześniej niż pozostałe testy.

Piśmiennictwo

1. Bitsch V.: Acta vet. scand. 14, 683, 1973a.
2. Bitsch V.: Acta vet. scand. 14, 767, 1973b.
3. Bitsch V.: Acta vet. scand. 19, 497, 1978.
4. Bolton D. C., Cho H. J., Ardans A. A., Kelly B., Zee Y. C.: Vet. Microbiol. 6, 265, 1981.
5. Cho H. J., Bohac J. G.: Can. J. Comp. Med. 49, 189, 1985.
6. Collins J. K., Bulla G. A., Riegel C. A., Butcher A. C.: Vet. Microbiol. 10, 133, 1984/85.
7. Deregt D., Cho H. J., Kozub G. C.: Can. J. Vet. Res. 57, 56, 1993.
8. Herring A. J., Nettleton P. F., Burrells C.: Vet. Rec. 107, 155, 1980.
9. Payment P., Assaf R., Trudel M., Marois P.: J. Clin. Microbiol. 19, 633, 1979.
10. Potgieter L. N. D.: Can. J. Comp. Med. 39, 427, 1975.
11. Rossi C. R., Kiessel G. K.: Arch. Virol. 51, 191, 1976.

Adres autora: dr Jerzy Rola. ul. Kościuszki 19/16, 24-100 Puławy

MARIAN KONDRACKI, DARIUSZ BEDNAREK

Wpływ doustnie podanego chlorku wapnia na stężenie wapnia w surowicy krów po wycieleniu

Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Effect of calcium chloride applied orally on the serum level of calcium in cows after calving

The aim of the studies was to evaluate the effect of calcium chloride in water-oil emulsion on the serum level of calcium and other mineral elements in cows during the first 48 h after calving. The experiments were done on 12 conventionally fed multiparous dairy cows, 4-8 years old. The animals were divided into two equal groups (experimental and control). No later than 30 min. after calving, the cows from the experimental group received 139 g of CaCl₂ (50 g Ca) in a water-oil emulsion orally but controls received a water-oil emulsion only. Blood serum concentrations of Ca, inorganic P, Mg, Cl, Na and K were determined just before calving and then after 5, 10, 15, 30 min. and 1, 6, 24 and 48 h.

It was determined that after calving the serum calcium content may quickly increase after an oral administration of calcium chloride in a water-oil emulsion. This increase level of calcium persisted at least for 6 h. For the effective prevention of hypocalcemia it is necessary to repeat the dose of the solution after 12 h. No effect of calcium chloride administration on other mineral elements was noted. The observations enable the introduction of the preparation for veterinary use and hence for large - scale production.

Jedną z często występujących chorób metabolicznych u krów mlecznych jest porażenie poporodowe. Schorzenie to spowodowane jest hipokalcemią, która wynika z zaburzenia równowagi między nagłym dużym zapotrzebowaniem na wapń, związanym z porodem i rozpoczęciem laktacji, a niewystarczającą na pokrycie tych wymagań absorpcją z jelit i resorpcją z kości.

Dotychczas stosowane leczenie krów chorych na porażenie poporodowe za pomocą dożylniej iniekcji roztworów wapnia jest kłopotliwe i kosztowne ze względu na częstą potrzebę ponownego lub nawet kilkakrotnego ich podawania przez lekarza wet. (4, 16). Dlatego też w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie doustnymi preparatami, które uzupełniałyby niedobory wapnia w okresie największego zapotrzebowania oraz byłyby dobrze tolerowane przez krowy i wygodne do stosowania przez hodowców (13). Na podstawie dokonanych obserwacji stwierdzono, że chlorek wapnia w żelu lub emulsji wodno-olejowej, podawany kilkakrotnie doustnie krowom w okresie okołoporodowym, zmniejsza istotnie ich zachorowalność na porażenie poporodowe, a także wspomaga dożylnie leczenie zwierząt chorych i zapobiega nawrotom (3, 7, 11, 14, 15). Stosowanie chlorku wapnia w emulsji wodno-olejowej jest bardziej bezpieczne, bowiem jak wyka-