

Prof. dr hab. Marian Truszczyński  
Prof. dr hab. Zygmunt Pejsak

# **ELISA**

## **W SEROLOGICZNYM ROZPOZNAWANIU ROZRODCZO-ODDECHOWEGO ZESPOŁU CHOROBOWEGO ŚWIŃ**

monografia

Puławy 2004

# Spis Treści

---

Przedmowa	2
1. Pojęcia podstawowe	5
2. Pozyskiwanie surowicy do badań serologicznych	6
3. Zasada wykonania testu ELISA	6
4. Walidacja	11
5. Analityczna i diagnostyczna czułość i specyficzność	12
6. Precyzja i dokładność	13
7. Powtarzalność i odtwarzalność	13
8. Wartość przewidywana wyniku dodatniego i ujemnego	14
9. Wartość testu ELISA w badaniach materiału terenowego w kierunku PRRS	14
10. Wykorzystanie testu ELISA w praktyce lekarsko-weterynaryjnej	16
11. Czynniki mające wpływ na skuteczność diagnostyczną ELISA	17
12. Interpretacja wyników	17
13. ELISA a test seroneutralizacji (SN) w przypadku PRRS	17
14. Zalety i ograniczenia testu ELISA	18
15. Wpływ umiejscowienia progu między wynikiem minimalnie dodatnim a minimalnie ujemnym na wykrywalność zakażenia	18
16. Wpływ czasu od zakażenia na czułość i specyficzność testu ELISA	19
17. Wpływ warunków laboratorium i kondycji personelu na wyniki badań	20
18. Wpływ odsetka pobranych próbek na możliwość wykrycia PRRS w stadzie	20
19. Badanie serologiczne a właściwości wirusa PRRS	23
20. ELISA a przeciwciała siarowe (bierne)	24
21. Pulowanie próbek	24
22. Przykłady uzyskanych testem ELISA profili serologicznych stad świń zakażonych wirusem PRRS	26
Piśmiennictwo	36

## Przedmowa

W okresie ostatnich 20 lat we wszystkich rozwiniętych rolniczo krajach świata obserwuje się dynamiczne zmiany w zakresie zasad hodowli i chowu zwierząt gospodarskich. Dotyczy to wszystkich gatunków zwierząt użytkowych. Wydaje się, że największe zmiany dotyczą drobiu i trzody chlewnej. Wszędzie obserwuje się znaczne zmniejszanie się liczby producentów przy jednoczesnym wzroście liczby ferm.

Mającą miejsce koncentracja i intensyfikacja produkcji żywca oraz dynamicznie wzrastający obrót trzodą chlewną, a także nieprzerwane wprowadzanie do stad nowych, często półsyntetycznych linii świń zarodowych prowadzi do coraz większych problemów związanych z ochroną zdrowia tego gatunku zwierząt. Coraz częściej pojawiają się mieszane zakażenia zwierząt wywołane różnorodnymi bezwzględnie oraz względnie chorobotwórczymi bakteriami i wirusami. Aktualnie zaliczyć do nich należy przede wszystkim takie drobnoustroje jak: *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, wirus zespołu rozrodczo-oddechowego, cirkowirus świń, wirus choroby Aujeszkyego, etc. Poważnym problemem stają się infekcje wywołane drobnoustrojami o właściwościach immunosupresyjnych. Zalicza się tu wirus zespołu rozrodczo-oddechowego, wirus choroby Aujeszkyego czy też *Mycoplasma hyopneumoniae*. Wymienione czynniki stwarzają przed lekarzami weterynarii, opiekującymi się średnimi i dużymi stadami świń poważne trudności w zakresie prawidłowego rozpoznania i uszeregowania przyczyn problemów zdrowotnych, a w ślad za tym wprowadzenia stosownego postępowania, zmierzającego do ograniczenia czy nawet likwidacji strat. Właściwe rozwiązanie problemu wymaga od lekarzy weterynarii coraz większej wiedzy teoretycznej i praktycznej. Jej posiadanie oraz ciągłe uzupełnianie jest jedynym sposobem umożliwiającym sprostanie potęgującym się wyzwaniom.

Obszerna wiedza zawodowa lekarzy weterynarii uwidacznia konieczność oparcia się w swoim postępowaniu rozpoznawczym na dobrych laboratoriach diagnostycznych, właściwe rozpoznanie przyczyny zaburzeń w zdrowiu jest bowiem podstawą jej eliminacji. Korzystanie z usług laboratorium jest nieodzowne nie tylko w celu ustalenia bakteryjnych czy wirusowych przyczyn zaburzeń zdrowotnych ale także dla określenia dynamiki szerzenia się infekcji, właściwości biologicznych wyizolowanych drobnoustrojów, poziomu odporności przeciwwakażnej oraz profilu serologicznego i immunologicznego stada w określonym zakresie.

W ostatnich latach zauważa się, że coraz większa liczba lekarzy weterynarii korzysta z usług weterynaryjnych laboratoriów rozpoznawczych. Można sądzić, że wraz z podnoszeniem się poziomu wiedzy terenowych lekarzy weterynarii oraz doskonaleniem poziomu usług laboratoryjnych konieczność ich wykorzystywania będzie stawała się zjawiskiem coraz bardziej powszechnym.

Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi usług laboratoryjnych jest z pewnością szybki rozwój technik diagnostycznych, w tym przede wszystkim ich coraz większa czułość i swoistość. Istotnym czynnikiem jest czas niezbędny do wykonania badań. Można stwierdzić, że wprowadzenie do diagnostyki techniki ELISA oraz metody PCR doprowadziło do zasadniczego skrócenia czasu badań laboratoryjnych, które aktualnie z reguły nie trwają dłużej niż 24 godziny.

Najbardziej popularną techniką badawczą stała się zaprezentowana w niniejszym opracowaniu technika ELISA. Przy pomocy tej metody w ciągu kilku godzin wykrywa się nie tylko obecność swoistych dla danego drobnoustroju (białka) przeciwciał humoralnych ale także obecność drobnoustrojów patogennych. Technika ELISA w stopniu zasadniczym uprościła metody pobierania materiału do badań. Zazwyczaj do przeprowadzenia testu potrzeba nie więcej niż 50-100 µl surowicy. Pół mililitra surowicy wystarcza zatem do przeprowadzenia badań w wielu kierunkach – co zazwyczaj staje się nieodzowne, z uwagi na częstą wieloczynnikową przyczynę choroby. Minimalna ilość materiału do badań uprościła też sposoby przekazywania go do laboratorium. Dzisiaj, korzystając z probówek Ependorfa, przeznaczone do analiz surowice przesyła się do laboratorium drogą pocztową, a wynik, na życzenie, otrzymać można drogą elektroniczną.

Przedstawione uwagi uzasadniają celowość stosowania w diagnostyce chorób zakaźnych trzody chlewnej testu ELISA. Przygotowane w tymże celu opracowanie monograficzne pt. „ELISA w serologicznym rozpoznawaniu rozrodczo-oddechowego zespołu chorobowego świń” poszerza

wiedzę zainteresowanych w zakresie specyfiki testu w odniesieniu do PRRS, zależnie od sytuacji natury epizootiologicznej w przebiegu choroby. Chodzi bowiem o trafne wykorzystanie wyników do podejmowania lekarsko-weterynaryjnych decyzji, służących ochronie zdrowia trzody chlewnej a w ślad za tym zwiększonej efektywności produkcji.

**Profesor zwyczajny, dr hab. dr h.c. mult. Marian Truszczyński**, ur. 21.07.1929 r. po ukończeniu z wyróżnieniem wydziału medycyny weterynaryjnej A.R. we Wrocławiu w 1953 r. rozpoczął karierę naukową w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach, gdzie pracuje do chwili obecnej. Do 1963 roku był asystentem i adiunktem w Zakładzie Chorób Świń. W tym czasie przebywał m.in. na stażach naukowych – w Instytucie Chorób Wirusowych Zwierząt im. Fryderyka Loefflera w Niemczech (1959 r.) i w Zakładzie Mikrobiologii Szkoły Medycznej Uniwersytetu w Bostonie, USA (1960/61). W roku 1959 uzyskał stopień doktora nauk weterynaryjnych, w 1963 r. doktora habilitowanego w zakresie mikrobiologii i immunologii, a w 1968 r. tytuł profesora. W latach 1963-1999 był kierownikiem Zakładu Mikrobiologii. Wypromował 19 doktorów, był opiekunem 5 przewodów habilitacyjnych, troje bezpośrednich współpracowników uzyskało tytuł profesora. Jest twórcą szkoły naukowej w dziedzinie mikrobiologii weterynaryjnej. Prowadzone przez niego i współpracowników badania dotyczyły doskonalenia laboratoryjnych metod rozpoznawania chorób zakaźnych zwierząt oraz skuteczności szczepionek. Jako autor podręcznika akademickiego p.t. „Bakteriologia Weterynaryjna” i współautor podręcznika „Zarys Mikrobiologii Weterynaryjnej” w istotnym stopniu przyczynił się do wykształcenia w tej dziedzinie lekarzy weterynaryjnych i pracowników naukowo i usługowo-badawczych, w skali kraju. Jako prezydent Komisji Standardów Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) i współredaktor Podręcznika Standardów Metod Diagnostycznych i Szczepionek (OIE) ma istotny udział w ujednocnieniu w skali światowej testów stosowanych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych zwierząt. Dorobek naukowy: 181 prac oryginalnych, 29 wydawnictw książkowych, 99 artykułów przeglądowych, 55 prac na temat organizacji nauki i polityki naukowej, 30 instrukcji wdrożeniowych. Jest członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk oraz Polskiej Akademii Umiejętności i kilku akademii zagranicznych. W latach 1972-2001 był dyrektorem naczelnym Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach a w latach 1996-1998 wiceprezesem PAN.

**Profesor dr hab. Zygmunt Pejsak** karierę rozpoczynał jako terenowy lekarz weterynarii. Przez pierwsze osiem lat swojej pracy sprawował pieczę nad hodowlą i produkcją trzody chlewnej na dużych fermach. Od roku 1980 związany jest z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym w Puławach, gdzie od 25 lat kieruje Zakładem Chorób Świń. Jest wybitnym specjalistą i uznanym autorytetem w Polsce i na świecie. Pełni funkcję eksperta FAO, OIE, jest członkiem korespondentem PAN, członkiem Komitetu Weterynaryjnego PAN i Komitetu Biotechnologii PAN. Pełni funkcję prezesa Polskiego Towarzystwa Weterynaryjnego. Należy do grona czołowych specjalistów w zakresie chorób świń na świecie. Od ponad 20 lat wygłasza referaty na wszystkich Kongresach International Pig Veterinary Society (IPVS). Jest Krajowym Kierownikiem Specjalizacji Lekarzy Weterynarii z zakresu Choroby Świń. Wypromował 8 doktorów, był opiekunem 4 przewodów habilitacyjnych.

W Polsce jest znanym propagatorem osiągnięć wiedzy weterynaryjnej nie tylko wśród lekarzy weterynarii, ale także wśród hodowców i producentów świń, wśród których cieszy się ogromnym autorytetem. Opracował oraz wdrożył do produkcji szereg szczepionek (Aptovac, Rhinovac, Suimastivac, etc.) oraz leków (Suibicol, KARNO-pig, Hydrodiar, etc.) powszechnie wykorzystywanych przez lekarzy weterynarii. Za dorobek naukowy i zasługi w szerzeniu wiedzy prof. Zygmunt Pejsak otrzymał wiele odznaczeń w kraju i za granicą.

## 1. Pojęcia podstawowe

Drobnoustroje, które wywołują choroby zakaźne zwierząt, w tym świń, są przyczyną zaburzeń w zdrowiu, manifestujących się objawami klinicznymi i zmianami anatomo-patologicznymi. Pierwsze i drugie na ogół nie są wystarczającą podstawą do pewnego rozpoznania określonej jednostki chorobowej. Drobnoustroje chorobotwórcze mogą też wywoływać infekcje, którym nie towarzyszą dostrzegalne badaniem klinicznym objawy, czyli infekcje o przebiegu bezobjawowym. W obu przypadkach (z objawami lub bez) następuje pobudzenie układu odpornościowego zwierzęcia, zwłaszcza limfocytów B i T przez zawarte w zakażających drobnoustrojach szczególne związki chemiczne, z reguły o strukturze białkowej (wyjątkowo wielocukrowej). Limfocyty posiadają właściwość rozpoznawania wymienionych elementów zakażającego drobnoustroju, które określa się jako antygeny. Ich swoistość determinują znajdujące się na powierzchni antygenów struktury aminokwasowe, niekiedy też i wielocukrowe, zwane epitopami. Efektem połączenia się antygeny z limfocytami B jest przekształcenie limfocytu B w komórkę plazmatyczną, która następnie wytwarza do surowicy krwi zwierzęcia swoiste dla epitopów antygeny białka, nazywane przeciwciałami. Obok tej humoralnej odpowiedzi ma miejsce również odpowiedź komórkowa, w której powstaniu uczestniczą – pod wpływem antygeny – limfocyty T. Odpowiedź komórkowa nie jest w niniejszym opracowaniu przedmiotem zainteresowania. Tematem są bowiem metody serologiczne, związane z odpowiedzią humoralną zwierzęcia na infekcję, a zwłaszcza diagnostyka serologiczna rozrodzco-oddechowego zespołu chorobowego świń (ang. porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS).

W metodach serologicznych wykorzystuje się dostrzegalny i możliwy do ilościowego pomiaru efekt swoistego reagowania antygeny z przeciwciałem, czyli z pasującą „jak klucz do zamka” immunoglobuliną (Ig) surowicy krwi. Właściwość ta posłużyła do opracowania licznych metod badawczych – w tym testów serologicznych – które znajdują zastosowanie przede wszystkim w wykrywaniu obecności i określaniu stężenia swoistych przeciwciał w surowicy zwierząt. W wypadku znanego przeciwciała a poszukiwanego swoistego dla niego antygeny chorobotwórczego drobnoustroju, jego identyfikacja również może mieć miejsce.

Przy znanym antygenie zmierza się do określenia czy w badanej surowicy występuje, i w jakim stężeniu, swoiste dla niego przeciwciało. Wykazanie jego obecności może wskazywać, z dużym prawdopodobieństwem, że badane zwierzę zostało zakażone drobnoustrojem chorobotwórczym, który ten antygen zawiera. Wynik badania serologicznego stanowi zatem pośredni dowód na zetknięcie się zwierzęcia z patogenem. Fakt ten wykorzystano jako ważny element w doborze metod diagnostycznych. W zespole tym decydującą rolę odgrywa bezpośrednio wykrycie i zidentyfikowanie drobnoustroju, który wywołał zakażenie. Dodać należy, że istotne znaczenie w rozpoznaniu choroby zakaźnej mają badania kliniczne, włącznie z wywiadem i analizą sytuacji epidemiologicznej oraz badania anatomo- i histopatologiczne.

Metody serologiczne znajdują na tle innych metod diagnostycznych szczególnie szerokie zastosowanie w rozpoznawaniu i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, w tym również świń. Wynika to z ich technicznie łatwiejszego wykonania niż, na przykład, metod bezpośredniej identyfikacji zarazka. To zaś daje możliwość badania dużej liczby zwierząt w stosunkowo krótkim czasie i przy mniejszym nakładzie kosztów. Zalety te wykorzystano zwłaszcza do określania sytuacji epidemiologicznej w stadzie oraz weryfikowania skutków realizowanych metod zwalczania (ang. surveillance). Dodać należy, że przy spełnieniu wymaganych warunków, o których będzie mowa, mimo pewnych ograniczeń w stosunku do metod bezpośredniej identyfikacji drobnoustroju wywołującego chorobę, uzyskuje się tym sposobem wiarygodne informacje na temat występowania lub niewystępowania określonej choroby zakaźnej w populacji badanych zwierząt oraz efektów jej zwalczania.

Spośród licznych metod badawczych, które znalazły zastosowanie w diagnostyce serologicznej (aglutynacja, precypitacja, odczyn wiązania dopełniacza, odczyn radioimmunologiczny i szeregu innych) najbardziej przydatny okazuje się być test immunoenzymatyczny, ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Skrót ten wywodzi się z języka angielskiego. E – jest pierwszą literą słowa



enzyme czyli enzym, L – słowa linked czyli połączony, I – immunosorbent czyli immunosorbcyjny i A – stanowi pierwszą literę słowa assay czyli metoda badawcza.

ELISA odznacza się wysoką czułością. Stwarza zatem możliwość stwierdzenia w surowicy badanej nawet niskich stężeń przeciwciał, nie wykrywalnych innymi testami serologicznymi. Cechuje się również dużego stopnia specyficznością, to jest małą liczbą odczynów fałszywie dodatnich. Dodatkowo, jest to metoda, która nie wymaga drogiego wyposażenia; jest też technicznie prosta.

## 2. Pozyskiwanie surowicy do badań serologicznych

Rodzaj pobieranych próbek do badań laboratoryjnych zależy od oczekiwanej informacji oraz metody badawczej, która ma zostać zastosowana. Do badania świń testem ELISA na obecność swoistych dla określonych chorób zakaźnych przeciwciał pobierana jest krew. Zabieg należy wykonać w warunkach aseptycznych po odkażeniu miejsca nakłucia. Krew pobierana jest bądź do połączonej z igłą sterylnej strzykawki, bądź z igły bezpośrednio do jałowej probówki lub kolbki. Pobierana jest zazwyczaj z żyły czczej przedniej lub żyły jarzmowej. Następnie przechowuje się ją w temperaturze otoczenia (możliwie nie powyżej 25°C) przez 1 do 2 godzin, do wytworzenia się skrzepu. Skrzep oddziela się od ścianek naczynia sterylną bagietką i umieszcza probówkę lub kolbkę w chłodziarce o temperaturze 4°C. Po kilkugodzinnej lub całonocnej inkubacji surowicę należy oddzielić od skrzepu przez dekantację lub ściągnięcie pipetą, wykonując to przy zachowaniu zasad aseptyki. W kolejności uzyskany materiał odwirowuje się przy około 1000 g przez 10-15 minut i oddziela od osadu krwinek zlewając surowicę do osobnej probówki.

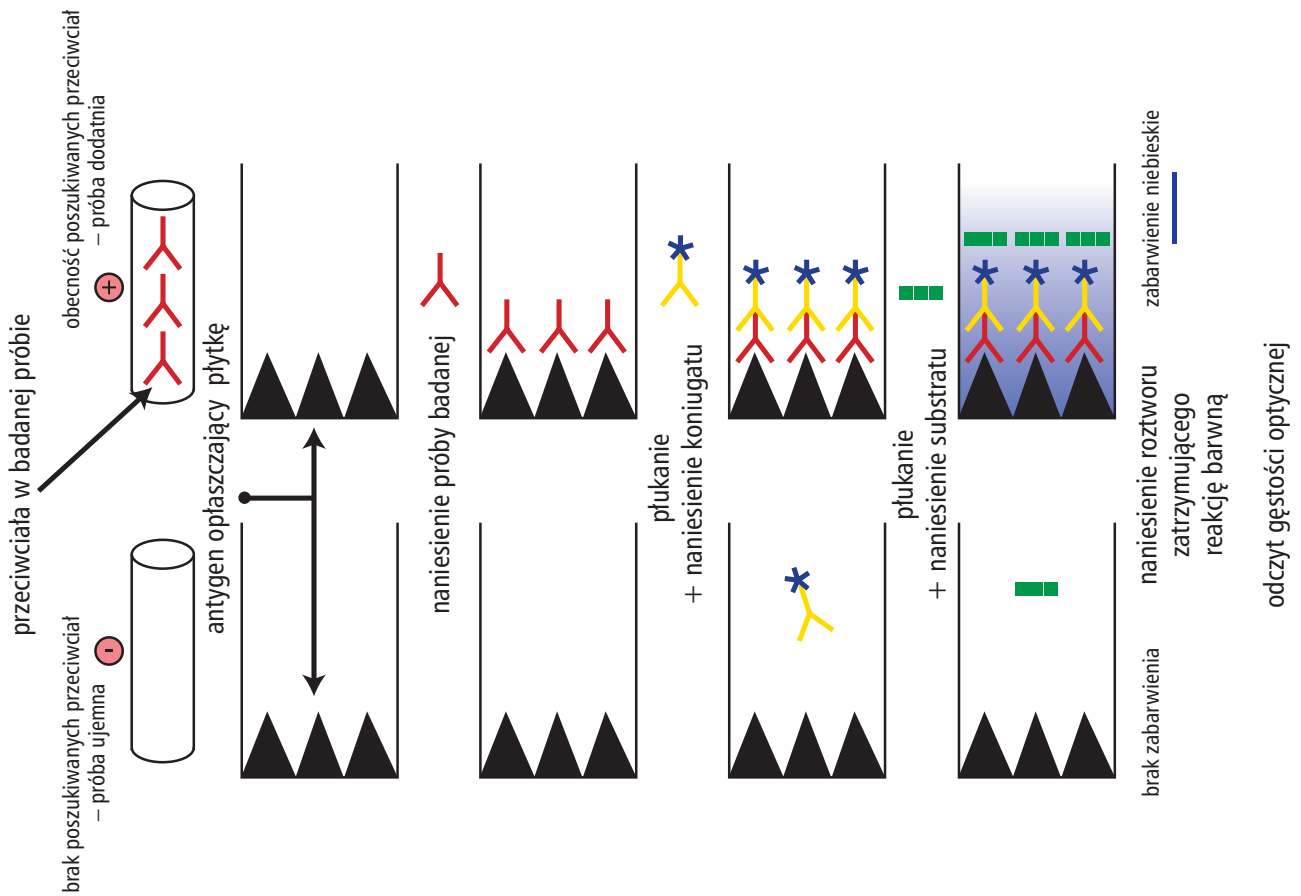
Nadająca się do badań testem ELISA surowica nie powinna wykazywać hemolizy, nie może być również zakażona drobnoustrojami oraz nie powinna być konserwowana kwasem bornym, tiomersalem lub innymi tego rodzaju dodatkami.

## 3. Zasada wykonania testu ELISA

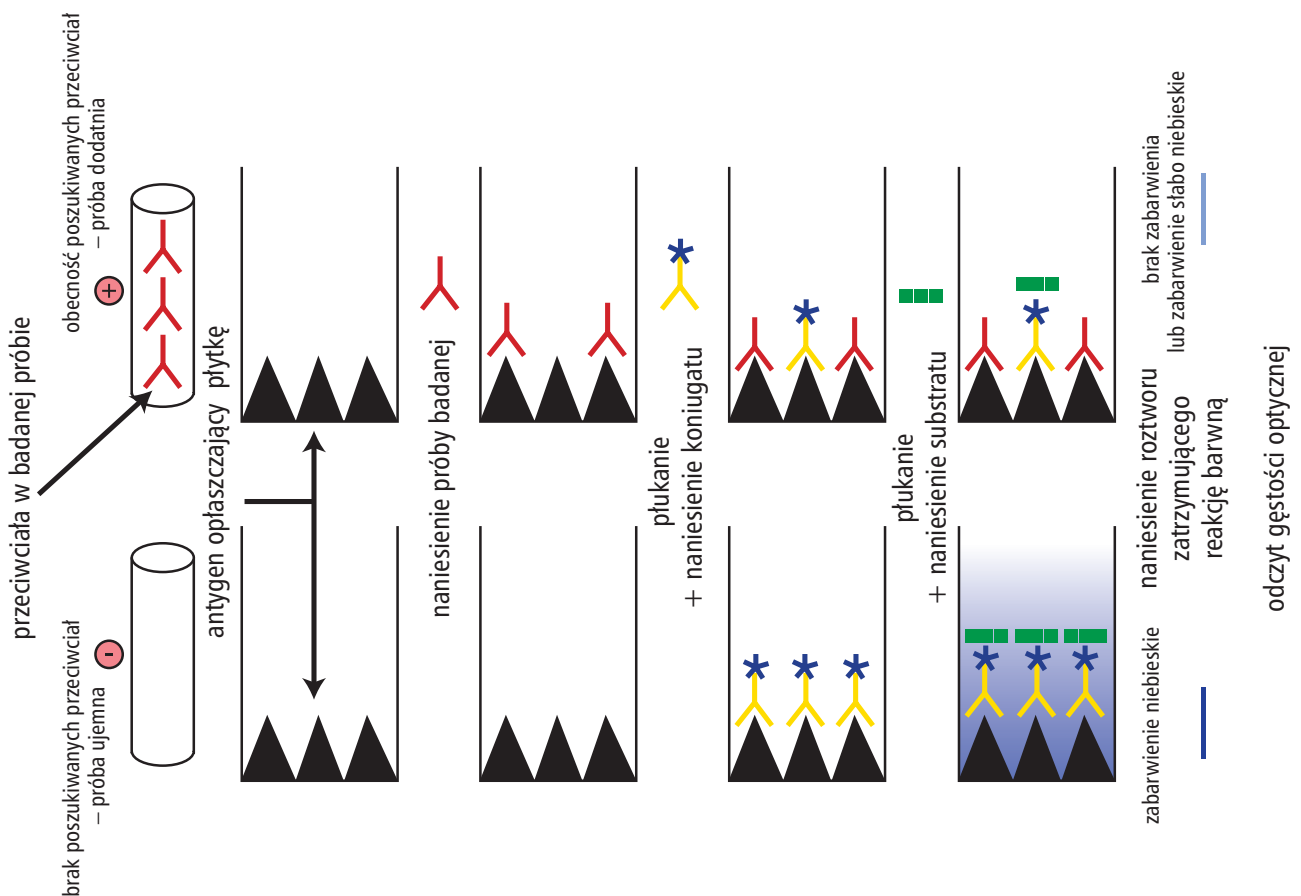
Na dnie zagłębień, czyli baseników płytki polistyrenowej (względnie z innego rodzaju plastiku) adsorbuje się w sposób gwarantujący przytwierdzenie mimo płużkania znany antygen, którym jest wirus lub bakteria względnie ich ekstrakt. W kolejności antygen nawarstwia się rozcieńczeniem surowicy badanej i inkubuje przez wymagany okres czasu (np. 1 godzinę lub przez noc) w temperaturze pokojowej. Następnie przepłukuje się każdy basenik płytki płynem fizjologicznym lub buforem PBS w celu usunięcia nie związanych z antygenem przeciwciał surowicy. Kolejnym nawarstwianym odczynnikiem jest koniugat. Stanowi go anty-surowica swoista dla białka surowicy badanej, połączona (skoniugowana) z enzymem – w tym przypadku z peroksydazą chrzanową, chociaż stosowane mogą być również inne enzymy. Ponownie następuje jednogodzinna (lub zależnie od techniki, dłuższa) inkubacja w temperaturze pokojowej, po czym przepłukuje się basenik płynem fizjologicznym lub PBS. W kolejności dodaje się do basenika swoisty dla enzymu substrat. W przypadku obecności enzymu, a tym samym obecności swoistego dla znanego antygeny przeciwciała, (z którym mógł się z tego względu związać koniugat), pojawia się reakcja barwna. Intensywność jej, czyli gęstość optyczną – OD (ang. optical density) określa się przy użyciu spektrofotometru.

Zaprezentowane poniżej ryciny przedstawiają schematycznie test pośredni ELISA służący do wykrywania przeciwciał (Ryc. 1) oraz ten sam test w odmianie określanej jako blocking ELISA (Ryc. 2).

Ryc 1. Schemat testu pośredniego ELISA



Ryc 2. Schemat testu blocking ELISA





Określenie ilości przeciwciał w badanej próbie (odpowiednika miana surowicy przy zastosowaniu innych testów serologicznych, np. odczynu aglutynacji) dokonuje się przez porównanie gęstości optycznej, czyli OD surowicy badanej z OD surowicy standardowej (czyli surowicy kontrolnej dodatniej o progowym jednoznacznie dodatnim stężeniu przeciwciał). W tym celu dzieli się wartość OD surowicy badanej czyli pobranej do badania próbki (S, ang. sample czyli próbka) przez wartość OD surowicy kontrolnej dodatniej zestawu (P czyli ang. positive = dodatni). Otrzymana liczba określająca stosunek S/P określa ilość przeciwciał obecnych w surowicy badanej. Wartości S/P niższe od ustalonej wartości progowej (np. 0,4) uznawane są jako wyniki ujemne. Nie oznacza to, że surowica, dla której w teście ELISA uzyskano wartość S/P niższą niż 0,4 nie zawiera przeciwciał. Mogą być one obecne, jednak ich poziom znajduje się poniżej założonego proggu czułości danego testu diagnostycznego.

Firma IDEXX zaproponowała dla zestawu ELISA do diagnostyki serologicznej zespołu rozrodzco-oddechowego świń wyrażanie wartości S/P liczbami całkowitymi od 0 (surowica ujemna) do 9 (surowica b. wysoko dodatnia) – tzw. grupy mian przeciwciał (ang. Titer Groups). Umowne grupy mian przeciwciał, czyli indeksy odpowiadające zakresom wartości S/P przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Grupy mian przeciwciał (indeksy) odpowiadające zakresom wartości S/P

Indeks	Wartość S/P	Indeks	Wartość S/P
0	0,4	5	2,5 – 2,99
1	0,4 – 0,99	6	3,0 – 3,49
2	1,0 – 1,49	7	3,5 – 3,99
3	1,5 – 1,99	8	4,0 – 4,50
4	2,0 – 2,49	9	≥ 4,51

#### Opis i zasada działania testu HerdChek\* PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR zgodnie z instrukcją firmy IDEXX.

Zestaw HerdChek\* PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR jest testem immunoenzymatycznym przeznaczonym do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi rozrodzco-oddechowego zespołu chorobowego (PRRS) w surowicy świń. Płytki w tym zestawie opłaszczono w ten sposób, że w dołkach kolumn nieparzystych znajduje się wirusowy antygen PRRS (dodatni), a w dołkach kolumn parzystych – antygen NHC (normal host cell – kontrolny, ujemny). W trakcie inkubacji badanych próbek surowic, zawarte w nich specyficzne przeciwciała tworzą kompleksy z wirusowym antygenem PRRS. Natomiast antygen kontrolny (NHC-ujemny) został zastosowany w celu sprawdzenia czy obce w surowicy immunoglobuliny skierowane przeciwko komórkowym komponentom szczepionek stosowanych u świń nie mają wpływu na wyniki testu.

Po inkubacji oraz usunięciu niezwiązanych białek z dołków płytki poprzez płukanie, do dołków wprowadza się koniugat, znakowany peroksydazą, przyłączający się do wszelkiego rodzaju przeciwciał zawartych w badanej surowicy. Po usunięciu nadmiaru koniugatu poprzez jego wypłukanie, do dołków wprowadza się substrat (TMB), w rezultacie czego dochodzi do reakcji barwnej.

Przy obliczaniu oraz interpretacji wyników należy uwzględnić stosunek natężenia reakcji barwnej w dołkach z antygenem PRRS do intensywności zabarwienia w dołkach z antygenem kontrolnym NHC.

#### Skład zestawu:

**Uwaga:** wszystkie odczynniki przechowywać w temperaturze od 2 do 7°C.

Zestaw przeznaczony jest tylko do użytku weterynaryjnego.

- A. 5 mikropłytek, każda z nich składa się z 6 pasków 2x8 dołków opłaszczonych wirusowym antygenem PRRS (kolumny nieparzyste) oraz antygenem kontrolnym, ujemnym NHC (kolumny parzyste)
- B. 1 flakon (60 ml) koniugatu (Anti-Porcine: HRPO conjugate)
- C. 1 fiolkę (4 ml) dodatniej surowicy kontrolnej (PRRS Positive Control)
- D. 1 fiolkę (4 ml) ujemnej surowicy kontrolnej (Porcine Negative Control)

- E. 1 flakon (150 ml) rozcieńczalnika do surowic badanych (Sample Diluent) w buforze fosforanowym ze stabilizatorami proteinowymi, zawierającego azydek sodu jako środek konserwujący.
- F. 1 flakon (60 ml) substratu (TMB substrate)
- G. 1 flakon (235 ml) roztworu do płukania (zagęszczonego 10-krotnie) – (Wash Concentrate) konserwowanego gentamycyną
- H. 1 flakon (60 ml) roztworu zatrzymującego reakcję barwną (Stop Solution)

**Czynności wstępne:**

1. Wyjąć zestaw z chłodni i ogrzać do temperatury pokojowej (18-23 °C). Wymieszać odczynniki przez delikatne zawirowanie lub wstrząsanie.
2. Przygotować odpowiednią objętość płynu do płukania. Skoncentrowany (10x) bufor do płukania powinien być przed użyciem umieszczony w temperaturze pokojowej i mieszany aż do uzyskania całkowitego rozpuszczenia zawartych w nim soli. Przed użyciem należy go rozcieńczyć 1:10 przy użyciu destylowanej/dejonizowanej wody (np. 30 ml koncentratu plus 270 ml wody na 1 płytkę do badania).
3. Rozcieńczyć 1:40 badane próbki surowic w osobnej płytce lub probówkach (np.: 10 µl surowicy rozcieńczyć w 390 µl rozcieńczalnika) – dobrze wymieszać.

**Uwaga:** Nie rozcieńczać surowic kontrolnych.

**Wykonanie testu:**

1. Opisać i zanotować pozycję każdej badanej próbki na odpowiednim formularzu.
2. Wlać po 100 µl **nie rozcieńczonej** ujemnej surowicy kontrolnej do dołków z wirusowym antygenem PRRS – C1 i D1 oraz do dołków z antygenem NHC – C2 i D2 (zachować kolejność!)
3. Wlać po 100 µl **nie rozcieńczonej** dodatniej surowicy kontrolnej do dołków z wirusowym antygenem PRRS – A1 i B1 oraz do dołków z antygenem NHC – A2 i B2 (zachować kolejność!)
4. Wlać po 100 µl badanych surowic (rozcieńczonych uprzednio 1:40) do sąsiadujących ze sobą dołków z antygenem PRRS i NHC (np. E1 i E2, F1 i F2 itd.).

Próby powinny być badane w dwóch powtórzeniach, rozmieszczenie surowic kontrolnych i badanych przedstawiono na poniższym schemacie.

	P R R S	N H C	P R S	N H C	P R S	N H C	P R S	N H C	P R S	N H C	P R S	N H C
A	P	P	5	5								
B	P	P	6	6								
C	N	N										
D	N	N										
E	1	1										
F	2	2										
G	3	3										
H	4	4										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

N – ujemna surowica kontrolna  
 P – dodatnia surowica kontrolna  
 1,2,3 itd. – numery kolejnych próbek badanych surowic

Kolumny 1,3,5,7,9,11 – dołki opłaszczane wirusowym antygenem PRRS  
 Kolumny 2,4,6,8,10,12 – dołki opłaszczane kontrolnym antygenem NHC

5. Inkubować płytki przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
6. Po inkubacji odessać dokładnie zawartość wszystkich dołków i poddać ją dekontaminacji.
7. Każdy dołek przepłukać 3-5-krotnie używając po ok. 300  $\mu$ l wody destylowanej lub dejonizowanej (po każdym płukaniu aspirować płyn). Unikać wysuszenia płytki pomiędzy płukaniem i przed dodaniem koniugatu. Pozostałe w dołkach po ostatnim płukaniu resztki płynu silnie wytrząsnąć na podłoże absorbujące.
8. Do każdego dołka nanieść po 100  $\mu$ l koniugatu – znakowanego HRPO.
9. Inkubować płytki przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
10. Płukanie jak w punktach 6 i 7.
11. Do każdego dołka nanieść po 100  $\mu$ l roztworu substratu TMB.
12. Inkubować przez 15 min. w temperaturze pokojowej.
13. Do każdego dołka nanieść po 100  $\mu$ l roztworu zatrzymującego reakcję barwną.
14. Odczytać OD (wartość absorpcji – gęstość optyczną) przy użyciu czytnika ELISA, stosując filtr o długości fali 650 nm.
15. Obliczyć wyniki.

### Wyniki:

Test jest ważny kiedy spełnione są poniższe warunki:

- Średnia gęstość optyczna  $\bar{x}$  OD dodatniej surowicy kontrolnej z antygenem PRRS (PC:PRRS) minus średnia gęstość optyczna  $\bar{x}$  OD ujemnej surowicy kontrolnej z antygenem PRRS (NC:PRRS) jest  $\geq 0,150$ .
- Średnia wartość OD dla surowicy kontrolnej dodatniej z antygenem NHC (PC:NHC) jest  $\leq 0,120$ .
- Średnia wartość kontroli negatywnej (NC:NHC) musi być  $\leq 0,250$ ; dodatkowo średnia wartość kontroli negatywnej NCx musi być  $\leq 0,150$ . Przy innym wyniku test musi być powtórzony.

Dodatnia surowica kontrolna jest wystandaryzowana i zawiera odpowiedni poziom specyficznych przeciwciał anti-PRRS. Zastosowanie antygeny NHC zapewnia możliwość uwzględnienia jego wpływu na wyniki uzyskane z antygenem PRRS.

Obecność lub brak przeciwciał anti-PRRS wyraża się poprzez stosunek OD próbki badanej (S) do OD dodatniej surowicy kontrolnej (P), tzn. S/P.

### Obliczanie wyników:

1. Obliczanie średniego OD ujemnej surowicy kontrolnej (NC:PRRS)

Wirusowy antygen PRRS (dołki C1, D1)

$$OD\ NC : PRRS = \frac{OD\ C1 + OD\ D1}{2}$$

$$\text{Przykład} = \frac{0,11 + 0,13}{2} = 0,12$$

2. Obliczanie średniego OD dodatniej surowicy kontrolnej (PC:PRRS), (PC:NHC)

Wirusowy antygen PRRS (dołki A1, B1):

$$OD\ PC : PRRS = \frac{OD\ A1 + OD\ B1}{2}$$

$$\text{Przykład} = \frac{0,360 + 0,384}{2} = 0,372$$

Antygen NHC (dołki A2, B2):

$$\text{OD PC : NHC} = \frac{\text{OD A2} + \text{OD B2}}{2}$$

$$\text{Przykład} = \frac{0,060 + 0,070}{2} = 0,065$$

3. Obliczanie stosunku próbki surowicy badanej do dodatniej surowicy kontrolnej (S/P)

$$\text{S/P} = \frac{\text{OD próbki: PRRS} - \text{OD próbki: NHC}}{(\text{OD PC:PRRS}) - (\text{OD PC:NHC})}$$

Przykład: jeżeli OD próbki PRRS = 0,750, a OD próbki NHC = 0,15  
to wówczas:

$$\text{S/P} = \frac{0,750 - 0,150}{0,372 - 0,065} = \frac{0,600}{0,307} = 1,95$$

**Interpretacja wyników:**

1. Próby ze współczynnikiem S/P < 0,4 uważa się za negatywne na obecność przeciwciał PRRS.
2. Próby ze współczynnikiem S/P ≥ 0,4 uważa się za pozytywne na obecność przeciwciał PRRS.

## 4. Walidacja

Przed kontynuowaniem omawiania znaczenia testu ELISA, zwłaszcza w diagnostyce PRRS, przedstawione zostaną dane dotyczące walidacji diagnostycznych metod badawczych, w tym testu ELISA.

W celu zapewnienia tym metodom badawczym wysokiej efektywności i wartości (ang. performance), na którą składa się analityczna i diagnostyczna czułość i specyficzność, precyzja i dokładność, powtarzalność i odtwarzalność oraz wartość przewidywalna wyniku dodatniego i ujemnego – muszą one być poddane – procesowi walidacji, czyli ocenie gwarantującej wartość poszczególnych parametrów. Potwierdza ona, że dany zestaw diagnostyczny spełnia wymagania, gwarantujące uzyskanie wiarygodnego wyniku, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy.

Ważną rolę w procesie walidacji odgrywają standardy międzynarodowe: surowica wysoce dodatnia w odniesieniu do czynnika etiologicznego wywołującej choroby zakaźnej, surowica nisko dodatnia (np. o S/P = 0.4) oraz surowica ujemna (w której stosowaną metodą badawczą nie stwierdza się swoistych przeciwciał).

Standardy te opracowywane i wytwarzane są w laboratoriach uznanych przez autorytatywne organizacje jak np. Światową Organizację Zdrowia (WHO) lub Międzynarodowy Urząd Epizootii czyli Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE) za referencyjne w skali międzynarodowej dla określonej choroby zakaźnej. Są nimi przeważnie laboratoria państwowe, ale mogą być również laboratoria prywatne, w tym znajdujące się w ramach instytucji przemysłu bioweterynaryjnego. Wytwarzane dla celów komercyjnych standardy i zestawy do diagnostyki serologicznej, w tym zestawy ELISA, muszą przechodzić proces walidacji, kontrolowany przez miarodajne czynniki państwowe.

Wytwarzane w międzynarodowych laboratoriach referencyjnych standardy surowic są przekazywane do krajowych laboratoriów referencyjnych – w Polsce do Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach – gdzie na ich podstawie sporządzane są standardy krajowe. Te zaś dostarczane są w miarę potrzeby do laboratoriów regionalnych, czyli Zakładów Higieny Weterynaryjnej poszczególnych województw.

## 5. Analityczna i diagnostyczna czułość i specyficzność

Analityczna czułość oznacza najmniejszą ilość substancji oznaczanej czyli analitu (w naszym przypadku przeciwciał swoistych) lub najniższą możliwą do wykrycia reakcję, wskazującą na ich obecność. Określenie analitycznej czułości w kategoriach absolutnych wymaga stosowania oczyszczonych analitów. W złożonych biologicznych systemach, takich jak interakcje antygen-przeciwciało, jest to często niemożliwe. Czułość analityczna bywa zatem określana pośrednio np. przez porównanie miana końcowego surowicy własnej z mianem standardowej surowicy referencyjnej, przy użyciu tego samego antygenu.

Analityczna specyficzność oceniana jest na podstawie testowania zbiorów określanych też zestawami próbek (ang. panels of samples), uzyskanych od zwierząt, u których wystąpiły infekcje, wywołane przez drobnoustroje spokrewnione z poszukiwanym. Im niższy jest poziom reakcji krzyżowej, tym wyższy jest poziom analitycznej specyficzności. W zależności od celu, w jakim metoda badawcza jest stosowana, poziom analitycznej specyficzności może być gatunkowo, grupowo lub subgrupowo specyficzny.

W sytuacji idealnej, ocena diagnostycznej czułości i specyficzności powinna wynikać z testowania zbioru próbek od zwierząt zakażonych określonym drobnoustrojem chorobotwórczym w warunkach kontrolowanego doświadczenia. Od zwierząt tych w kolejnych dniach po infekcji pobierane są próbki krwi. Ich badanie umożliwia wskazanie momentu pojawienia się przeciwciał. Surowica, w której przeciwciała stwierdzono po raz pierwszy uznawana jest za surowicę „minimalnie dodatnią”, o znanej przeszłości i znanym stanie co do zakażenia.

Często trudno jest uzyskać do zakażenia doświadczalnego zwierzęta, co do których na pewno wiadomo, że przedtem nie zetknęły się z drobnoustrojem chorobotwórczym, o który chodzi lub antygenowo pokrewnym. Uzyskanie próbek od zwierząt, które na pewno nie są zakażone (w tym przypadku chodzi o standardy surowic na pewno ujemnych) również może okazać się trudne. Tak jest w szczególności w rejonach, w których choroba występuje enzootycznie. W niektórych przypadkach, może zaistnieć w związku z tym konieczność badania grup zwierząt nie zakażonych (czyli ujemnych, stanowiących grupę kontrolną), które znajdują się na terenach znacznie oddalonych od populacji zwierząt, która jest przedmiotem badań (np. w przypadku BSE z Nowej Zelandii, jeżeli badanie dotyczy populacji bydła w Europie).

Diagnostyczna czułość – ang. sensitivity ( $S_n$ ) określana jest w grupie wszystkich zwierząt na pewno zakażonych, co przyjmuje się jako 100% odsetek reagujących dodatnio przy użyciu ocenianej metody. Wyniki ujemne są w tym przypadku wynikami fałszywie ujemnymi.

Diagnostyczna specyficzność – ang. specificity ( $S_p$ ) określana jest w grupie zwierząt, w której wszystkie osobniki są na pewno nie zakażone, co przyjmuje się jako 100% odsetek reagujących ujemnie przy użyciu ocenianej metody. Wyniki dodatnie stanowią w tym przypadku wyniki fałszywie dodatnie.

Liczba próbek referencyjnych, wymaganych w ocenie  $S_n$  i  $S_p$  danej metody badawczej określana jest za pomocą odpowiednich metod statystycznych, co nie wyklucza błędów związanych z istotą skomplikowanych i wieloczynnikowych reakcji biologicznych. Toteż zgodnie z ogólnie przyjętą zasadą dla określenia  $S_n$  zaleca się zbadanie nie mniej niż 300 na pewno zakażonych zwierząt, a dla określenia  $S_p$  nie mniej niż 1000 na pewno nie zakażonych zwierząt.

W celu kalkulowania ocen  $S_n$  i  $S_p$ , wyniki metody badawczej należy kwalifikować jako pozytywne bądź negatywne. Rozdzielający je punkt (ang. cut off) określany jest jako punkt graniczny.

Zakładając, że właściwe zestawy próbek od na pewno zakażonych i na pewno nie zakażonych zwierząt zostały zbadane oraz trafnie określono najniższe, dodatnie miana względnie indeksy S/P – wtedy możliwe jest sprecyzowanie (ang. calculated) czułości i specyficzności metody, co ilustruje tabela 2 i następujący tekst.



Tabela 2

Wynik testu:	Status co do zakażenia zwierzęcia	
	Zakażone	Niezakażone
Dodatni	TP	FP
Ujemny	FN	TN

$$\text{Diagnostyczna czułość} = TP / (TP + FN)$$

$$\text{Diagnostyczna specyficzność} = TN / (TN + FP)$$

(ang. TP – Truly Positive, TN – Truly Negative, FP – False Positive, FN – False Negative), gdzie „TP” reprezentuje prawdziwie pozytywne, „TN” prawdziwie negatywne, „FP” fałszywie pozytywne i „FN” fałszywie negatywne wyniki, zgodnie z wynikami testu, porównując do statusu zakażenia.

Porównanie diagnostycznej czułości i specyficzności jakiejkolwiek metody badawczej (czyli testu) z inną metodą badawczą (w obu przypadkach metod służących temu samemu celowi np. wykryciu, czy zwierzę jest zakażone wirusem PRRS) może mieć miejsce tylko wtedy, kiedy obiema metodami badane są próbki pochodzące od tych samych zwierząt na pewno zakażonych i na pewno nie zakażonych. W innym przypadku porównanie obarczone jest błędem.

Często nowe metody badawcze są porównywane z istniejącą, metodą standardową określaną jako tzw. „złoty standard” (ang. golden standard). Metoda ta uznana jest w danym czasie jako mająca aktualnie najwyższą diagnostyczną czułość i/lub specyficzność spośród wszystkich innych, będących w użyciu (służących do rozpoznawania tej samej choroby zakaźnej). W takiej sytuacji nowa metoda badawcza może być porównana z istniejącym standardem w kategoriach „względnej” czułości i specyficzności (Tabela 3). Jednakże warunkiem jest pewność, że wyniki standardowej metody badawczej są dokładnym odzwierciedleniem prawdziwego stanu infekcyjnego zwierzęcia.

Tabela 3

Wynik testu:	Wyniki testu standardowego	
	Dodatni	Ujemny
Dodatni	TP	FP
Ujemny	FN	TN

$$\text{Względna czułość} = TP / (TP + FN)$$

$$\text{Względna specyficzność} = TN / (TN + FP)$$

Gdzie „TP” przedstawia prawdziwie pozytywne, „TN” przedstawia prawdziwie negatywne, „FP” przedstawia fałszywie pozytywne i „FN” przedstawia fałszywie negatywne wyniki, zgodnie z wynikami standardowej metody badawczej, do której następuje porównanie.

W przypadku niezrozumiałych niezgodności należy ponownie przeanalizować czy dysponujemy zwierzętami o prawdziwie i trafnie określonym statusie co do ich zakażenia.

## 6. Precyzja i dokładność

Precyzja jest miarą rozrzutu wyników wielokrotnego badania tej samej próbki. Dokładność jest miarą zgodności między wartością walidowanej metody badawczej a wartością metody referencyjnej uznawanej jako „złoty standard”, co do miana lub koncentracji identyfikowanego czynnika.

## 7. Powtarzalność i odtwarzalność

Powtarzalność powinna być określana zawsze w tym samym laboratorium. Stopień zmienności powinien być określany na podstawie powtórzeń (ang. replicates) badania próbek kontrolnych, tak w obrębie każdej, wykonywanej serii badań jak też między seriami wykonywanych badań (ang. between runs) przy użyciu tej samej metody badawczej. Górne i dolne granice błędu dopuszczalnego



powinny być ustanowione dla każdej spośród dodatnich i ujemnych kontroli jako miara dokładności testu. Te granice określają czy wyniki z badań wszystkich grup próbek mogą być przyjęte czy też wyniki badań którejs z grup próbek powinny być odrzucone.

Odtwarzalność (ang. reproducibility) jest określana poprzez badanie znanych próbek w szeregu laboratoriów, które używają identycznych metod badawczych i takich samych odczynników. Stopień w jakim zbiorczy wynik dla każdej próbki różni się od wartości spodziewanej jest wskaźnikiem odtwarzalności testu i dostarczania miary precyzji i dokładności między laboratoriami.

Stopień zgodności wyników uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych uznaje się jako ważny element w ocenie metody badawczej.

## 8. Wartość przewidywana wyniku dodatniego i ujemnego

Wartość przewidywana wyniku dodatniego (PV+) jest odsetkiem wyników pozytywnych, uzyskanych w metodzie badawczej, które poprawnie identyfikują zakażone zwierzęta.

Przewidywana wartość wyniku ujemnego testu (PV-) jest odsetkiem ujemnych wyników, uzyskanych w metodzie badawczej, które poprawnie identyfikują nie zakażone zwierzęta.

Przewidywana wartość (ang. performance) metody badawczej jest zależna od ocen jej diagnostycznej czułości i specyficzności. Wpływ na wartość przewidywaną ma również dynamika infekcji, zależna od patogenności i zakaźności szczepu chorobotwórczego drobnoustroju oraz wrażliwości populacji zwierząt będących przedmiotem badań (ang. target population) jak również punkt czasowy pobranych do badań prób.

Należy mieć świadomość, że zwalidowana metoda badawcza wymaga stałego nadzoru co do utrzymania się w takim samym stanie, w celu zapewnienia jej wiarygodności. Dane tej wewnętrznej kontroli jakości stanowią niezbędną gwarancję precyzji i dokładności metody w obrębie laboratorium.

W celu określenia jednorodności czyli identyczności (ang. uniform production quality) wszystkich nowych partii reagentów (ang. batches) powinno zostać przeprowadzone badanie zbioru próbek o różnych, występujących w praktyce mianach przeciwciał.

Modyfikacje metodyki produkcji odczynników lub parametrów metody badawczej wymagają oceny czy nastąpiła jakakolwiek zmiana w jej wartości diagnostycznej (ang. performance characteristics of the assay). Małe modyfikacje, które poprawiają powtarzalność i odtwarzalność bez wpływu na analityczne możliwości metody badawczej, czyli jej wartość diagnostyczną, mogą nie wymagać pełnej, nowej oceny diagnostycznej czułości i specyficzności.

Każda poważniejsza modyfikacja metody badawczej, jak wprowadzenie odczynnika tego samego, ale wytworzonego za pomocą innej technologii produkcji lub zastosowanie innego odczynnika, wymaga kompletnej, ponownej oceny wartości diagnostycznej, czyli walidacji metody badawczej i porównania z pierwotną instrukcją, czyli protokołem danej procedury, uznanej za standardową.

W trakcie kontrolowania metody, co do jej wartości po wprowadzeniu zmian wymienionych – na samym wstępie może okazać się, że wyniki uzyskane są identyczne z wynikami testu standardowego. Wtedy ponowna, pełna walidacja nie jest konieczna.

## 9. Wartość testu ELISA w badaniach materiału terenowego w kierunku PRRS

W przypadku próbek z terenu, ocena diagnostycznej czułości i specyficzności, czyli wiarygodności wyników powinna dodatkowo uwzględniać konkretne sytuacje.

Czułość diagnostyczna testu w warunkach praktyki terenowej łączy się ze sprawnością wykrywania zwierząt zakażonych. Ma to szczególnie duże znaczenie w przypadku populacji wolnych od infekcji, w których pojawiają się pierwsze osobniki zakażone.

Pożądana diagnostyczna specyficzność (Sp) gwarantuje, że wynik ujemny świadczy, iż badane zwierzę, a zwłaszcza badana populacja zwierząt jest rzeczywiście wolna od infekcji. Obrazuje to tabela 4 i 5.

Tabela 4 Potencjalne wyniki testu diagnostycznego

	Zwierzęta zakażone	Zwierzęta niezakażone
Test pozytywny wzgl. wynik pozytywny	A Prawdziwie dodatnie	B Fałszywie dodatnie
Test negatywny wzgl. wynik negatywny	C Fałszywie ujemne	D Prawdziwie ujemne

Tabela 5 Definicja specyficzności (Sp), czułości (Sn) i wartości przewidywanej (predictive value, PV)

Parametry testu	Wzór
Diagnostyczna czułość (Se)	$\frac{A}{A+C}$
Diagnostyczna specyficzność (Sp)	$\frac{D}{B+D}$
Pozytywna przewidywana wartość (PV+)	$\frac{A}{A+B}$
Negatywna przewidywana wartość (PV-)	$\frac{D}{C+D}$

A – Wyniki prawdziwie dodatnie

B – Wyniki fałszywie dodatnie

C – Wyniki fałszywie ujemne

D – Wyniki prawdziwie ujemne

Jak wynika z przedstawionych danych – im wyższa jest Sp tym niższe jest prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich (Smith, 1995). Chroni to przed niewłaściwym uznaniem populacji wolnej od infekcji za zakażoną oraz przed zawyżeniem odsetka zwierząt zakażonych (ang. prevalence) w populacji dotychczas uważanej za ujemną.

Dodatkowo zaleca się by, w celu jeszcze większego uwiarygodnienia uzyskanych wyników badań, w tym przy użyciu metod serologicznych, a zatem również testu ELISA, laboratoria krajowe i regionalne przeszły realizowany przez specjalnie powołane instytucje proces akredytacji, z uwzględnieniem wymagań ISO/IEC (ang. International Standards Organization/International Electrotechnical Commission), w tym zwłaszcza dokumentu ISO 17025.

Uzyskanie przez laboratorium diagnostyczne akredytacji wspiera, oprócz spełnienia uprzednio podanych warunków, uznanie otrzymywanych wyników za wiarygodne, nie tylko w odniesieniu do potrzeb krajowych lecz również w międzynarodowym obrocie zwierzętami i produktami zwierzęcymi.

Mimo dysponowania zwalidowanymi testami serologicznymi oraz wykonywania badań w laboratoriach akredytowanych, z kompetentnym i zaangażowanym personelem – nie można wykluczyć możliwości uzyskania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Te pierwsze są rezultatem możliwości zakażenia badanego zwierzęcia drobnoustrojem o podobnych pod względem swoistości antygenach do antygenów drobnoustroju, który wywołuje chorobę, w kierunku której prowadzone jest postępowanie diagnostyczne. Drugie – czyli wyniki fałszywie ujemne – mogą łączyć się z niemożnością wytwarzania przez zakażone zwierzę przeciwciał swoistych dla czynnika etiologicznego, czyli drobnoustroju wywołującego chorobę. Mimo to ocenia się, iż w sytuacji normalnej, mającej miejsce najczęściej, uzyskane przy pomocy testów serologicznych wyniki, w tym testem ELISA, są w 95% wiarygodne.

Można zatem stwierdzić, że badania serologiczne spełniają ważną rolę w rozpoznawaniu chorób zakaźnych w terenie. Jednakże, jak wspomniano, w pewnym odsetku, z reguły niższym niż liczba próbek pobranych do badań serologicznych wymagana jest dodatkowo izolacja i bezpośrednia identyfikacja czynnika etiologicznego, wywołującego daną chorobę. Niezbędną czynnością w rozpoznawaniu i zwalczaniu chorób zakaźnych jest lekarsko-weterynaryjne badanie kliniczne i związane z tym przeglądy stad zwierząt pod kątem ich stanu zdrowia.

Wartość badań serologicznych podnosi badanie wielokrotne tych samych zwierząt w stadzie

i konfrontowanie uzyskanych wyników. Wzrost mian, czyli stężeń przeciwciał w powtarzonym badaniu, a nawet ilościowo taki sam lub niższy wynik dodatni, potwierdza poprzednie rozpoznanie, charakteryzując dodatkowo dynamikę procesu zakażenia.

## 10. Wykorzystanie testu ELISA w praktyce lekarsko-weterynaryjnej

Poniżej przedstawione zostaną zadania, dla rozwiązania których zalecane jest wykorzystanie testu ELISA, użytego do określania obecności w surowicy badanych zwierząt przeciwciał swoistych. Są nimi:

1. Wykrycie pierwszych, względnie nowych przypadków infekcji, czyli uzyskanie odpowiedzi czy występuje ona w danej populacji zwierząt (ang. incidence).
2. Ustalenie odsetka zakażonych zwierząt w stadzie, względnie szerzej, w szeregu stad zlokalizowanych na terenie kraju lub jego strefy – w określonym punkcie czasowym, kiedy infekcja występuje od dłuższego czasu – chodzi o informację czy odsetek zwierząt zakażonych spada, czy też wzrasta (ang. prevalence).
3. Monitorowanie (ang. monitoring) czyli wielokrotne badanie tych samych zwierząt, znajdujących się z reguły w dużej grupie, metodami serologicznymi, w tym testem ELISA, w kierunku określonej choroby zakaźnej.
4. Wspomaganie zwalczania choroby zakaźnej przez okresowe sprawdzanie przy użyciu metod serologicznych, w tym testu ELISA, czy w wyniku realizowanego postępowania lekarsko-weterynaryjnego – liczba zwierząt reagujących dodatnio zmniejsza się i w jakim stopniu, czy też nie obserwuje się tego rodzaju efektu (ang. surveillance).

Zależnie od rodzaju choroby zakaźnej stosowane są różne testy serologiczne. Bliższe dane na ten temat znajdują się w Podręczniku Standardów dla Testów Diagnostycznych i Szczepionek (ang. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines), wydanym (2000 r.) przez OIE w Paryżu. Z danych tych wynika, że ELISA znajduje coraz szersze zastosowanie w rutynowej diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt w realizacji uprzednio wymienionych zadań.

Tabela 6 zawiera informacje o wartości testu ELISA w serodiagnostyce następujących chorób zakaźnych świń: chorobie Aujeszkiego, zespole rozrodzco-oddechowym, czyli PRRS, klasycznym pomorze świń i mykoplazmowym zapaleniu płuc.

Tabela 6 Serodiagnostyka ważnych chorób zakaźnych świń

Nazwa choroby	Test zalecany
Choroba Aujeszkiego	ELISA*
Zespół rozrodzco-oddechowy PRRS	ELISA
Pomór klasyczny	ELISA*
Mykoplazmowe zapalenie płuc	ELISA*

Objaśnienia: ELISA\* oznacza, że test ten jest zalecany przez OIE, w pierwszej kolejności, w porównaniu z innymi testami, do diagnostyki serologicznej nie tylko w czasie monitorowania choroby wewnątrz kraju, ale również w przypadku świń, które mają być eksportowane.

ELISA bez \* oznacza natomiast, że test ten jest równorzędny obok innych testów, które mogą być stosowane w diagnostyce serologicznej. Ze względu na czułość i prostotę wykonania również w tym przypadku posiada on przewagę nad innymi testami, stosowanymi w serodiagnostyce wymienionych chorób świń.

W zasadzie test ELISA należy stosować do określania statusu (=profilu, patrz rozdział 22 str. 26-35) serologicznego stada czy dużej liczbowo grupy zwierząt, w tym również świń, a nie jednego lub kilku zwierząt. Wyjątkowo może to mieć miejsce np. w celach eksportu lub importu cennego osobnika oraz zakupu zwierzęcia do stacji produkcji nasienia czy zarodków.

## 11. Czynniki mające wpływ na skuteczność diagnostyczną ELISA

Skuteczność testu ELISA – przy monitorowaniu infekcji w grupie zwierząt, zależy od dynamiki rozprzestrzeniania się zarazka w stadzie, niezależnie od wartości (ang. performance) danego testu. W przypadku populacji wrażliwej i dużej zakaźności czynnika etiologicznego, czego efektem jest zakażenie w krótkim czasie dużego odsetka zwierząt w danej grupie, szansa na wykrycie seroreagentów jest duża. Natomiast przy utrzymującej się infekcji przez czas dłuższy (powyżej miesiąca) i przewlekłym przebiegu zakażenia w stadzie, poziom swoistych przeciwciał w surowicy krwi z czasem się obniża. Wtedy, mimo wysokiego odsetka zakażonych w stadzie zwierząt, szanse ich wykrycia nawet tak czułym testem jakim jest ELISA, są znacznie mniejsze. W takiej sytuacji liczba pobranych próbek musi być większa niż w przypadku infekcji cechującej się dużą dynamiką szerzenia się w stadzie.

## 12. Interpretacja wyników

W celu ułatwienia właściwej interpretacji wyników uzyskanych testem ELISA należy pamiętać o kilku kwestiach istotnych w trakcie monitorowania i zwalczania infekcji. Stwierdzenie w grupie świń testem ELISA jednego lub kilku przypadków niskododatnich wyników może wskazywać, że są one fałszywie dodatnie. Obliguje to do powtórzenia po 2-3 tygodniach badań tych samych zwierząt oraz możliwie innych, przebywających w tym samym kojcu, a nawet kojcach sąsiednich. Wzrost w następnych badaniach liczby wyników dodatnich i/lub wartości indeksu S/P dowodzi, że w pierwszym badaniu nie uzyskano wyników fałszywie dodatnich. Natomiast, jeżeli w drugim badaniu stwierdza się ponownie nieliczne wyniki o niskiej wartości indeksu S/P, to wtedy należy uznać, że w stadzie nie występuje choroba, w kierunku której prowadzono badanie.

## 13. ELISA a test seroneutralizacji (SN) w przypadku PRRS

ELISA zaliczana jest do tzw. testów szybkich (ang. quick tests) w przeciwieństwie do tzw. testów wolnych (ang. slow tests), do których należy test SN (Robersts, 2003). Określenie „szybki” łączy się z możliwością wykrycia w przypadku PRRS przeciwciał swoistych już 7 dni po zakażeniu (Yoon et al. 1995) przy mianie granicznym S/P odpowiadającym  $>0,4$ . Dodatkowo, testem tym już po 10 dniach od zakażenia można wykazać miana S/P  $>2,00$ . Stosując w analogicznej sytuacji test SN, dopiero po 3-4 tygodniach od infekcji stwierdza się poziom przeciwciał przy rozcieńczeniu surowicy 1:4, odpowiadający S/P 0,4 czyli wynikowi dodatniemu. Po takim czasie ELISA wykazuje w tej samej surowicy S/P równe 2,00 (Benfield et al. 1992; Yoon et al. 1995). Wcześniejsze wykrycie zwierzęcia zakażonego ma istotne znaczenie w eliminowaniu ze stada siewców wirusa. Wiadomo natomiast, że jego siewstwo zanika po 2-4 tygodniach licząc od infekcji, czyli wtedy, kiedy przy użyciu SN, osobnik zainfekowany może dopiero być określony jako zakażony (Benfield et al. 1994; Christianson et al. 1993, Willis et al. 1997). Dodatkowo, test SN, niezależnie od mniejszej czułości niż ELISA, jest technicznie trudniejszy do wykonania i droższy.

Maksymalny poziom przeciwciał wykrywalnych testem ELISA ma miejsce po 4 tygodniach, wynosząc S/P  $> 2,0$ , po czym następuje spadek w ciągu 6 miesięcy do wyniku ujemnego (Yoon et al. 1995). Miana przeciwciał SN uznane za dodatnie ( $> 1:4$ ) są wykrywalne przez ponad rok (Yoon et al. 1995). Dane te charakteryzuje i uzupełnia tabela 7.

Tabela 7 Interpretacja wyników badań laboratoryjnych w kierunku PRRS

	SN < 4 rozcz. 1:4 miano 4	SN ≥ 4
ELISA < 2.0	Ta grupa obejmuje zarówno wrażliwe zwierzęta, jak też zwierzęta zakażone, których przeciwciała spadły do niskiego poziomu	Ta grupa obejmuje zwierzęta 9 tygodni po zakażeniu; podobny wynik utrzymuje się od 6 do 10 miesięcy
ELISA ≥ 2.0	Ta grupa obejmuje zwierzęta 10-20 dni po zakażeniu	Ta grupa zwierząt obejmuje osobniki 3-5 tyg. po zakażeniu

Jak wynika z przedstawionych danych – test ELISA, jako bardziej czuły niż SN, jest metodą z wyboru do możliwie wczesnego wykazania PRRS w stadzie macior oraz u prosiąt w okresie odchowu. To ostatnie ma znaczenie pomocnicze dla określenia zwierzęcia, które jest siewcą wirusa. Monitoring prosiąt w odchowu nie może bowiem zastąpić badania macior.

## 14. Zalety i ograniczenia testu ELISA

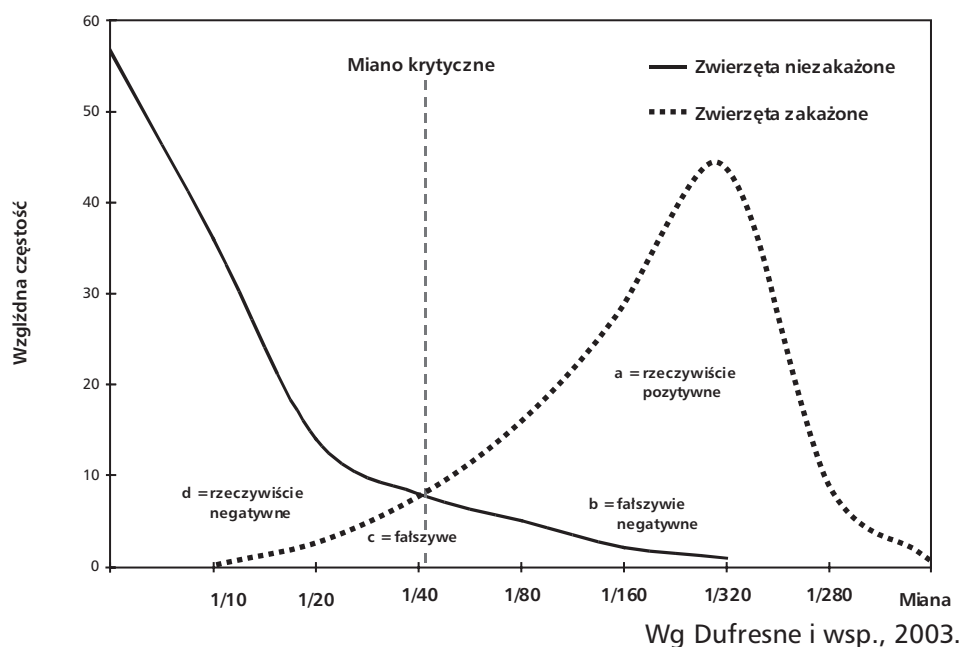
W związku ze stosunkowo najwcześniejszą możliwością stwierdzenia przeciwciał swoistych dla wirusa PRRS przy zastosowaniu testu ELISA – stanowi on najczęściej stosowaną metodę badania populacji świń, uważanej za wolną od infekcji albo z nielicznymi osobnikami zakażonymi. Z tych samych względów używa się go u świń przed przerzutem i/lub wprowadzeniem do populacji wolnej od infekcji. Ma to również miejsce dla potwierdzenia, że populacja uznana na podstawie poprzedniego badania za nie zainfekowaną jest nadal wolna od osobników zakażonych. Mając na uwadze wiarygodność wyników uzyskanych w badaniach testem ELISA, należy zdawać sobie sprawę, jak to stwierdzono uprzednio, że żaden test serologiczny nie jest w 100%-tach pewny, w sensie wskazania osobnika zakażonego. Natomiast uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego może mieć wysoce szkodliwe skutki, jeżeli na tej podstawie nastąpi wprowadzenie do populacji dotychczas negatywnej jednego lub kilku zwierząt zakażonych wirusem PRRS lub innym chorobotwórczym drobnoustrojem. Z drugiej strony wyniki fałszywie dodatnie mogą dać podstawę do nieuzasadnionego eliminowania ze stada zwierząt niezakażonych. Oba rodzaje błędów są przyczyną strat gospodarczych. Ich zminimalizowanie zależy od diagnostycznej czułości i specyficzności testu stosowanego w przeglądach serologicznych. Odnosi się to przede wszystkim do badania dużych grup zwierząt a w znacznie mniejszym stopniu pojedynczego osobnika.

## 15. Wpływ umiejscowienia progu między wynikiem minimalnie dodatnim a minimalnie ujemnym na wykrywalność zakażenia

Jak uprzednio scharakteryzowano,  $S_n$  i  $S_p$  zależą od efektywności diagnostycznej (ang. performance) danego testu. Jednakże wpływ na diagnozę może mieć również próg między wynikiem pozytywnym i negatywnym (cut-off), ustalany arbitralnie. Istnieje bowiem zależność: im mniejsza czułość tym większa specyficzność i odwrotnie. Praktycznie, jeżeli próg przesuwany jest na rzecz czułości to wtedy zwiększa się pewność, że wykryje się zakażenie, ale przy narastającym niebezpieczeństwie wyników fałszywie dodatnich. Konsekwencją jest eliminowanie z produkcji zwierząt zdrowych. Może to być opłaczalne wobec możliwości wprowadzenia zwierząt zakażonych do stada zwierząt zdrowych. Wykres 1 obrazuje próg (cut-off) między wynikiem dodatnim i ujemnym.



Wykres 1 Stosunek między czułością (Sn), a specyficzną (SP) dla ciągłych (ustawicznych, stałych = continuous) zmiennych testu



Dla stosowanego do badań terenowych testu konieczne jest optymalizowanie Sn i Sp przez takie ustawienie punktu granicznego, które zapewnia najwyższą liczbę wyników prawdziwie dodatnich, które trafnie wskazują na występowanie infekcji u zwierząt badanych (wykres 1). Sn lub Sp może być odpowiednio zwiększone lub zmniejszone przez przesunięcie wartości punktu granicznego w prawo lub w lewo, jednakże, jak wspomniano, każda zmiana w wartości progowej poprawia jeden element (np. Sn) kosztem drugiego (np. Sp). Zgodnie z tym (wykres 1), jeżeli próg przesunie się w prawo wtedy zwiększa się Sp, wobec czego więcej niezakażonych osobników zostaje poprawnie zaklasyfikowanych jako ujemne. Niestety konsekwencją może stać się zaklasyfikowanie pewnego odsetka zwierząt zakażonych jako serologicznie ujemne czyli niezakażone (Thrusfield, 1995). W przeciwieństwie do tego, jeżeli próg wykrywalności jest przesunięty w lewo, zwiększa się Sn a spada Sp. Następstwem takiej sytuacji jest niebezpieczeństwo uznania pewnego odsetka zwierząt za serologicznie dodatnie mimo, że nie są one w istocie rzeczy zakażone, czyli uzyskanie wyników fałszywie dodatnich. Idealnie ustawiony próg wykrywalności zapewnia minimalną liczbę wyników fałszywie dodatnich względnie fałszywie ujemnych (Martin i Bennet, 1987; Smith, 1995).

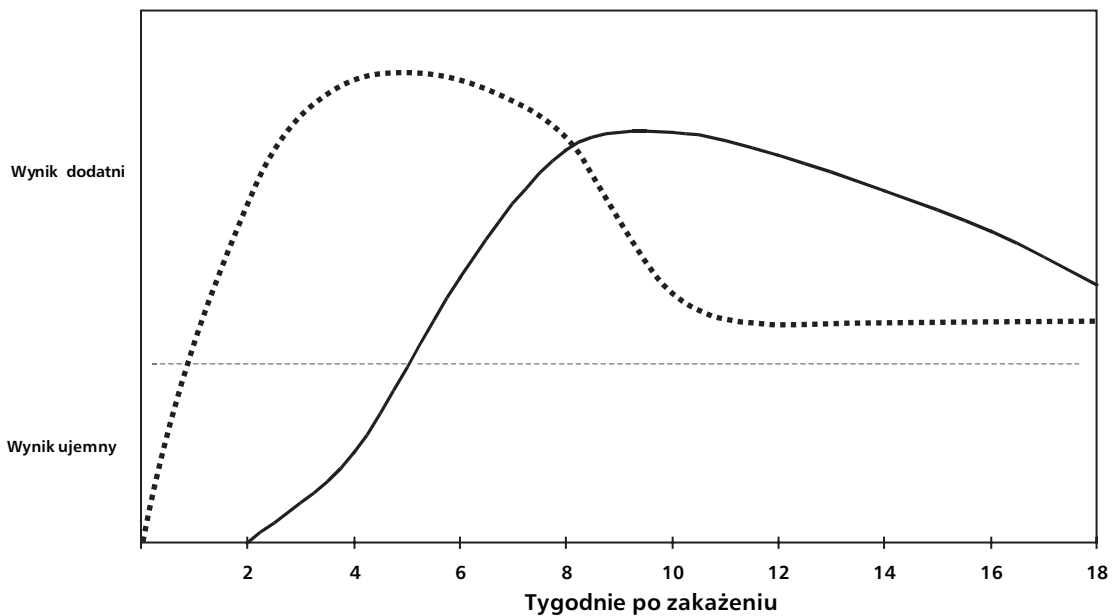
Przykładowo – zmniejszanie wartości progowej w teście ELISA (np. z S/P 0.4 do S/P 0.3) łączy się z ograniczeniem ryzyka wprowadzenia loszek zakażonych wirusem PRRS do stada wolnego od tej infekcji. Uzyskuje się wtedy wprawdzie zmniejszenie liczby wyników fałszywie ujemnych (zwiększa się bowiem Sn) ale niestety również zwiększenie ilości wyników fałszywie dodatnich (zmniejsza się bowiem Sp). Postępując w ten sposób osiąga się większą pewność nie wprowadzenia do stada osobników zakażonych, przy równoczesnej możliwości eliminowania z produkcji zwierząt, które nie są zainfekowane, a które przy tak ustawionym progu dały wynik fałszywie dodatni.

## 16. Wpływ czasu od zakażenia na czułość i specyficzną testu ELISA

Kształtowanie się w czasie określonych testem ELISA i odczynem SN przeciwciał swoistych dla wirusa PRRS przedstawia wykres 2.



Wykres 2 Kształtowanie się w czasie określonych testem ELISA i odczynem SN przeciwciał swoistych dla wirusa PRRS



Wg Dufresne i wsp., 2003.

Linia ciągła – oznacza kształtowanie się miana SN

Linia przerywana – oznacza kształtowanie się miana przeciwciał w teście ELISA

## 17. Wpływ warunków laboratorium i kondycji personelu na wyniki badań

Na  $S_n$  i  $S_p$  mają wpływ warunki panujące w laboratorium takie jak temperatura, wilgotność czy warunki przechowywania zestawów diagnostycznych i odczynników. W grę wchodzi też zmieniająca się zależnie od dnia precyzja wykonywania testu przez personel laboratorium.

Oprócz omówionych czynników wpływających na efektywność testu takich jak wartość ustalonego progu granicznego, okres trwania infekcji czy jakość pracy personelu laboratoryjnego, na wiarygodność wyników ma również – jak wspomniano uprzednio – wpływ odsetek próbek pobranych w stosunku do liczby zwierząt w stadzie. Znaczenie w tym względzie ma również szybkość szerzenia się infekcji w stadzie i częstość próbobrania.

## 18. Wpływ odsetka pobranych próbek na możliwość wykrycia PRRS w stadzie

W przypadku badania testem ELISA dużej liczby zwierząt, w tym świń w chlewni z uwzględnieniem grup technologicznych lub grup wiekowych, istotne jest określenie od jakiej liczby spośród nich ma zostać pobrana krew, by uzyskany w odniesieniu do całej grupy zwierząt wynik obrazował stopień zakażenia w stadzie. Dodatkowo, dla określenia dynamiki sytuacji epidemiologicznej w stadzie niezbędne jest powtórzenie badań tych samych zwierząt co najmniej jeden raz a raczej kilkakrotnie, w odstępach kilku do kilkunastu tygodni. Zbadanie wszystkich zwierząt, co najmniej dwukrotnie, daje najbardziej wiarygodne informacje co do zakresu i dynamiki szerzenia się infekcji. Jednakże ze względów ekonomicznych i/lub technicznych może to być niemożliwe. By temu zaradzić podjęto badania, w wyniku których okazało się, że w celu uzyskania pewności o występowaniu określonej infekcji w stadzie nie jest konieczne zbadanie wszystkich zwierząt.

Przykładowo, gdy w stadzie 1000 świń 50% osobników reaguje w teście ELISA dodatnio to w takiej sytuacji wystarczyłoby zbadać 5 losowo wybranych osobników by z 95%-owym prawdopodobieństwem być pewnym, że w badanym stadzie występuje choroba, w kierunku której prowadzone są badania. Natomiast – również przykładowo – jeżeli w stadzie liczącym 1000 zwierząt jest zakażony tylko 1 osobnik, to wtedy konieczne jest zbadanie 950 zwierząt, by w 95%-ach mieć pewność, że w grupie tej występuje infekcja, na obecność której prowadzone jest badanie testem

ELISA. Wyjątek stanowią grupy świń, u których infekcja ma przebieg przewlekły i poziom przeciwciał w surowicy zakażonych osobników może nie być wykrywalny testem ELISA.

Od loch w stadzie podstawowym liczącym powyżej 30 zwierząt na 30 pobranych próbek (zależnie od wielkości grupy badanej liczby te są inne) po 6 próbek powinno pochodzić od loch: a) luźnych, b) prośnych w poszczególnych trymestrach ciąży i c) w czasie karmienia.

Z grupy liczącej ponad 39 osobników po 10 próbek należy pobrać: a) od prosiąt po urodzeniu, b) od warchlaków przed przerzutem do tuczarni, c) od tuczników przed ubojem i d) od loszek remontowych przed wprowadzeniem do stada podstawowego (zarodowego).

Kilkakrotne przebadanie według podanego schematu lub, zależnie od przebiegu infekcji, analogicznych schematów, odpowiedniej liczby surowic, pochodzących od różnych grup wiekowych świń – umożliwia określenie tzw. profilu immunologicznego (ściślej – serologicznego) stada (patrz rozdział 22, str. 26-35). Analogiczne postępowanie, przy poszerzeniu badań, stwarza też możliwość oceny sytuacji epidemiologicznej na obszarze kraju lub jego części. Należy pamiętać, że podane relacje liczbowe mają zastosowanie wtedy, gdy wszystkie zwierzęta grupy technologicznej lub wiekowej przebywają w tym samym budynku. Jeżeli ferma jest duża np. lochy przebywają w różnych budynkach, podaną liczbę próbek należy pobrać od zalecanej liczby zwierząt z każdego obiektu.

Tabela 8 Liczba próbek wymaganych do wykrycia jednego lub więcej osobników reagujących dodatnio w populacji 1000 zwierząt

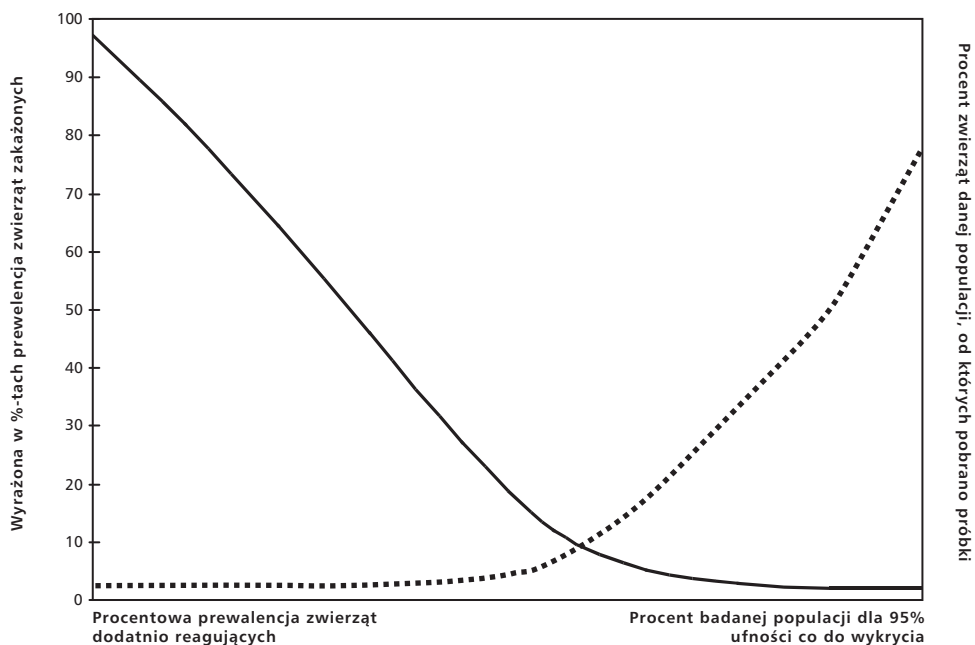
Poziom ufności	Odsetek osobników reagujących dodatnio			
	≥10%	≥5 %	≥ 2%	≥ 1%
90%	23	45	109	206
95%	30	58	139	259
99%	45	87	205	369

Dostosowano wg Cannon i Roe, 1982

W tabeli 8 przedstawione są reprezentatywne liczby próbek wymagane do uzyskania 90%, 95% względnie 99% ufności, co do wykrycia jednego lub większej liczby osobników dodatnio reagujących w teście ELISA w populacji liczącej 1000 zwierząt, w której procent osobników zakażonych wynosi odpowiednio 1%, 2%, 5% lub 10%.

Wskazane jest, by pojawiające się przypadki zakażenia, w populacji uznanej dotychczas za wolną od infekcji, zostały wykryte możliwie najwcześniej. Jeżeli odsetek zakażonych zwierząt jest niski, wtedy, jak wynika z wykresu 3 konieczne jest zbadanie odpowiednio większego odsetka zwierząt. Rosną wtedy szanse wykrycia osobników zainfekowanych, a tym samym zwiększa się poziom ufności co do wykrywania nowych zakażeń.

**Wykres 3** Dynamiczna współzależność między prevalencją, czyli odsetkiem zakażonych w stadzie zwierząt, a liczbą pobranych od nich i badanych próbek w celu wykrycia infekcji w stadzie



Wg Chase i Polson, 2000

**Tabela 9** Liczba prób do badań serologicznych ukierunkowanych na wykrycie zakażenia stada przy 95% prawdopodobieństwa wykrycia (wg J.T. Done, 2002)

Wielkość stada	Współczynnik szerzenia się czynnika zakaźnego Liczba prób				
	1*	2	5	10	20**
50	50	48	35	22	12
100	95	78	45	25	13
150	130	95	49	26	13
200	155	105	51	27	14
300	189	117	54	28	14
500	225	129	56	28	14
750	246	135	57	28	14
1000	258	138	57	29	14
1500	271	142	58	29	14
2000	277	143	58	29	14
5000	290	147	59	29	14

\* – czynnik zakaźny szerzy się wolno

\*\* – czynnik zakaźny szerzy się szybko

W piśmiennictwie światowym zaprezentowano dane dotyczące zasad próbobrania w zależności od szybkości szerzenia się czynnika infekcyjnego w stadzie (tabela 9, 10 i 11). Należy podkreślić, że za obiekt (jednostkę epidemiologiczną) uznaje się każdy budynek, w którym przebywają zwierzęta. Oznacza to, że jeżeli chlewnia złożona jest z 5 budynków, w których w każdym z nich znajduje się 200 świń, wskaźnik próbobrania odnosi się do każdego budynku a nie chlewni jako takiej.

**Tabela 10 Liczba prób do badań serologicznych ukierunkowanych na wykrycie zakażenia stada przy 99% prawdopodobieństwa wykrycia (wg J.T. Done, 2002)**

Wielkość stada	Współczynnik szerzenia się czynnika zakaźnego Liczba prób				
	1*	2	5	10	20**
50	50	50	42	29	17
100	99	90	59	36	19
150	143	117	68	38	20
200	180	136	73	40	20
300	235	160	78	41	20
500	300	183	83	42	21
750	343	197	85	43	21
1000	368	204	86	43	21
1500	395	212	88	44	21
2000	410	216	88	44	21
5000	438	223	89	44	21

\* – Czynniki zakaźne szerzą się bardzo wolno

\*\* – Czynniki zakaźne szerzą się bardzo szybko

**Tabela 11 Liczba prób potrzebnych do wykrycia zwierząt zakażonych w populacji (według Kluge i wsp., 1992)**

Populacja	Liczba zwierząt badanych w populacji					
	10%		20%		30%	
	95%	99%	95%	99%	95%	99%
≤ 100	25	36	13	19	9	13
101-200	27	40	13	20	9	13
201-300	28	41	14	20	9	13
301-500	28	42	14	21	9	13
501-1000	29	43	14	21	9	13
> 1000	29	44	14	21	9	13

Ważnym czynnikiem w określaniu sytuacji epidemiologicznej w stadzie, uważanym za ujemne, jest częstość pobierania próbek czyli próbobrania do badań diagnostycznych.

Optymalne wskazania, co do wielkości próbobrania (czyli odsetka zwierząt w stadzie, od których pobrano krew) oraz częstości powtarzania tych samych badań mogą zostać określone dzięki wykorzystaniu symulacyjnych modeli próbobrania (Polson i Jordan, 2003).

Równocześnie ze spadkiem odsetka zwierząt zakażonych spada przewidywana wartość wyników dodatnich przy jednoczesnym wzroście przewidywanej wartości wyników ujemnych. Odwrotne zjawisko ma miejsce w przypadku wzrostu odsetka zwierząt zakażonych w grupie. Oznacza to, że jeżeli odsetek osobników zakażonych obniży się do zera, a uzyskiwane są w teście ELISA wyniki dodatnie, to są to najprawdopodobniej rezultaty fałszywie dodatnie. Istnieje więc zagrożenie, że zostaną wyeliminowane (wybite) zwierzęta zdrowe.

## 19. Badanie serologiczne a właściwości wirusa PRRS

W badaniach serologicznych stada w kierunku PRRS należy zdawać sobie sprawę z pewnych właściwości typowych dla tego wirusa. Jest on uważany jako wysoce infekcyjny (ang. infectious), ale nie wysoce zaraźliwy (ang. contagious) (Benfield, 2002, Yoon et al. 1998). Znane są przypadki powolnego w czasie przenoszenia się wirusa PRRS z osobnika na osobnika (Nodelijk et al. 2000).

Obserwuje się, że zainfekowane prosięta nie są w stanie zakazić będących w tym samym kojcu innych prosiąt, również wrażliwych na zakażenie. W grę może tu m.in. wchodzić okresowy brak siewstwa wirusa przez zwierzęta zainfekowane.

Na ogół prawdopodobieństwo wykrycia infekcji PRRS w stadach będzie większe wtedy, kiedy procent zakażonych osobników będzie wyższy, a okres między infekcją i badaniem serologicznym odpowiednio dłuższy (choć nie zbyt długi). Szansa ta rośnie również wtedy, gdy prosięta pochodzą od macior, które nie posiadają w siarze swoistych przeciwciał.

W populacjach o niskim odsetku zwierząt zakażonych poprawa wykrywalności łączy się ze zwiększeniem liczby pobieranych próbek i częstości próbobrania.

## 20. ELISA a przeciwciała siarowe (bierne)

Stosowana w badaniach serologicznych w kierunku PRRS ELISA, podobnie jak inne testy serologiczne, nie odróżnia przeciwciał matczynych, które prosięta otrzymują wraz z siarą od przeciwciał, które prosię wytwarza w następstwie infekcji wirusem PRRS. Zakłada się, że przeciwciała matczyne mogą być wykryte do 5-6 tygodnia życia prosiąt. Z tego powodu, jeżeli mamy do czynienia z maciorami posiadającymi przeciwciała swoiste, test ELISA należy stosować u prosiąt po tym okresie, czyli w wieku powyżej 6 tygodni.

## 21. Pulowanie próbek

Pulowanie próbek surowic w liczbie 3 do 5-ciu może mieć efekt rozcieńczający przeciwciała, jeżeli w pulowanej surowicy obok próbek zawierających przeciwciała znajdują się próbki ujemne. Wtedy prawdopodobne jest uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego.

Należy dodać, że podejście do badań serologicznych w kierunku PRRS w stadach świń uważanych za wolne od infekcji lub o niskim procencie zwierząt zakażonych różni się zasadniczo od podejścia do populacji o wysokim odsetku zwierząt zakażonych. W pierwszym przypadku konieczne jest stosowanie metod szczególnie czułych, by jak najszybciej wskazać trafnie każde zakażone zwierzę. W drugiej sytuacji jest to mniej ważne, gdyż na pewno wobec wysokiego odsetka zwierząt zakażonych wykrycie przynajmniej części z nich nie będzie trudne. I jeszcze jedno – jeżeli badaniem klinicznym i w wyniku przeglądów stada oraz analizy epidemiologicznej nie jesteśmy w stanie sformułować podejrzeń o PRRS, a mimo to chcemy rozstrzygnąć czy występują w nim osobniki zakażone to wtedy postępujemy tak jak ze stadem ujemnym lub o niskim odsetku zwierząt zakażonych.

Reasumując przedstawione dane, w tym prawidłowości występujące w wykrywaniu testem ELISA świń zakażonych wirusem PRRS, wolno stwierdzić, że skuteczność identyfikowania takich osobników może być zwiększona:

1. dzięki użyciu testu ELISA cechującego się szczególnie dużą wartością diagnostyczną (ang. performance)
2. przez zoptymalizowanie zależnie od intencji wartości miana granicznego (np. z S/P 04 do S/P 03)
3. przez zwiększenie liczby pobranych próbek czyli odsetka badanych zwierząt
4. przez zwielokrotnienie częstości próbobrania.

Spośród testów serologicznych przeznaczonych do badań serologicznych populacji świń w kierunku PRRS najbardziej wartościowym jest pośrednia ELISA (Herd Check<sup>®</sup> PRRS IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, Maine). Test ten cechuje się wysoką czułością i równocześnie specyficnością oraz względnie niskim kosztem.

W szeregu przypadków już po 14 dniach od wprowadzenia wirusa do stada większość zwierząt może ulec zakażeniu i wtedy po 3 tygodniach od infekcji wykrywa się około 100% tego rodzaju osobników. W celu uniknięcia ryzyka otrzymywania wyników fałszywie ujemnych w okresie wczesnego zakażenia w stadzie, badanie testem ELISA należy wykonać co najmniej 3 tygodnie po potencjalnej ekspozycji.

W przypadku wartościowych populacji świń, w których w pierwszym badaniu wykazano niski odsetek zwierząt dodatnio reagujących – dla wyjaśnienia czy chodzi o rzeczywiste zakażenie czy też o wynik fałszywie dodatni – zalecane jest, obok powtórnych badań tym samym testem, zastosowanie w kolejnych badaniach innych wiarygodnych testów, przynajmniej w odniesieniu do zwierząt, które uprzednio reagowały dodatnio.



## 22. Przykłady uzyskanych testem ELISA profili serologicznych stad świń zakażonych wirusem PRRS

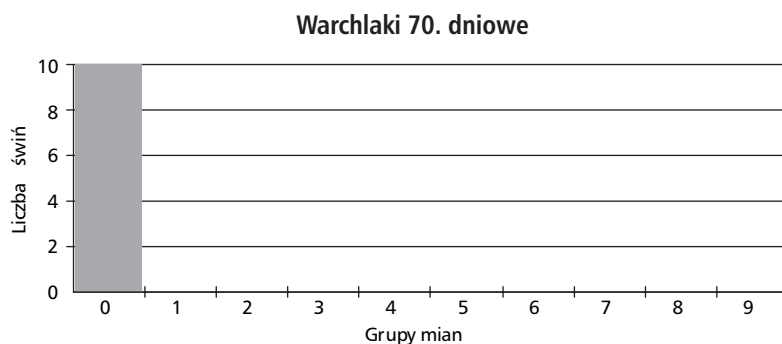
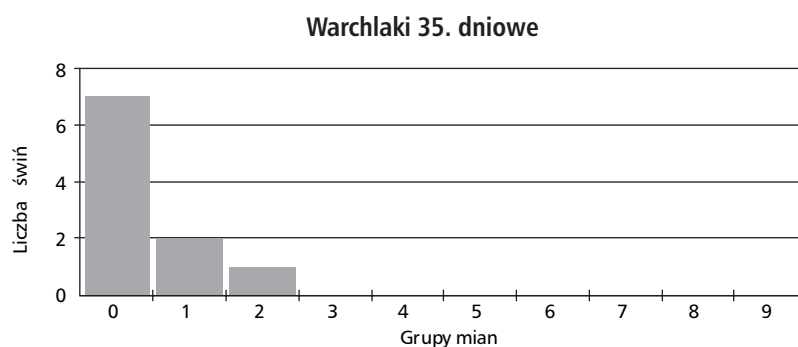
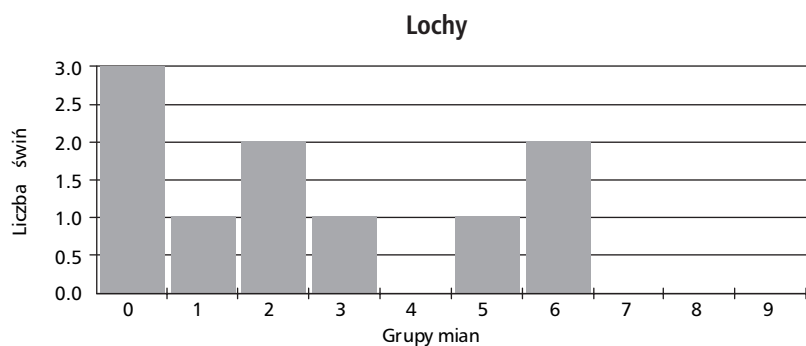
Poniżej zaprezentowano uzyskane z użyciem oprogramowania xChek® firmy IDEXX Laboratories, Inc., przykładowe profile serologiczne stad świń badanych w kierunku PRRS przy użyciu zestawu immunoenzymatycznego HerdChek\* PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR.

Przykłady:

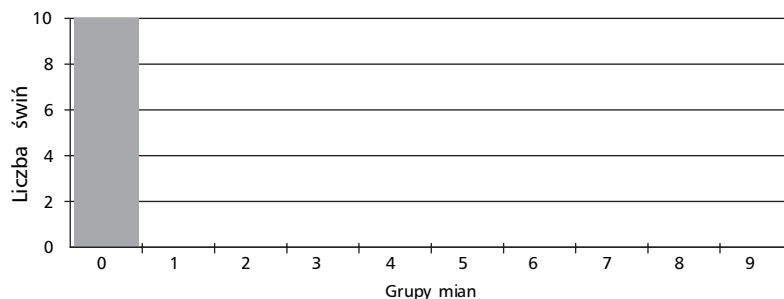
Tabela 12. Świeże zakażenie stada podstawowego PRRS

grupy mian S/P kolejne numery surowic badanych	lochy	warchlaki 35 dni	warchlaki 70 dni	tuczniaki 120 dni
1	0	0	0	0
2	6	0	0	0
3	5	1	0	0
4	1	2	0	0
5	0	0	0	0
6	2	0	0	0
7	0	1	0	0
8	3	0	0	0
9	6	0	0	0
10	2	0	0	0

Diagramy dotyczące tabeli 12:



## Tuczniki 120. dniowe

**Interpretacja:**

Zróznicowane miana przeciwciał u loch oraz brak serokonwersji u zwierząt 70-ciodniowych i starszych wskazują na niedawne zakażenie stada, do którego doszło w stadzie podstawowym. Przy takim obrazie profilu stada najczęściej obserwuje się typowe dla PRRS objawy: ronienie, przedwczesne porody, rodzenie się słabych prosiąt, padnięcia prosiąt przed odsadzeniem. Należy się spodziewać, że objawy te będą się utrzymywać do chwili naturalnego uodpornienia się stada podstawowego, jakkolwiek nie muszą wystąpić u wszystkich loch czy miotów. Stopniowo, w ciągu kilku miesięcy zakażenie wirusem PRRS będzie obejmowało kolejne sektory produkcji, w wyniku czego może dojść do wystąpienia zaburzeń ze strony układu oddechowego u warchlaków i/lub tuczników. Szybkość szerzenia się zakażenia w stadzie oraz nasilenie objawów klinicznych zależy od sposobu utrzymania świń, warunków środowiskowych oraz towarzyszącej flory bakteryjnej.

**Postępowanie:**

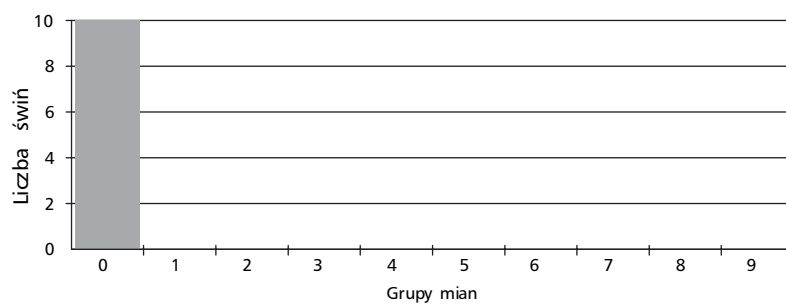
Należy zaprzestać wprowadzania do rozrodu wrażliwych loszek lub loch. Można wprowadzić program szczepień przeciw PRRS w stadzie podstawowym w celu ograniczenia strat związanych z zaburzeniami w rozrodzie. W razie konieczności przeprowadzenia remontu stada loszki należy zaszczepić na co najmniej 30 dni przed wprowadzeniem do rozrodu, lub aklimatyzować je przez przynajmniej 60 dni w stadzie podstawowym umożliwiając im kontakt nos w nos z zakażonymi lochami.

Tabela 13. Enzootyczne zakażenie stada PRRSV

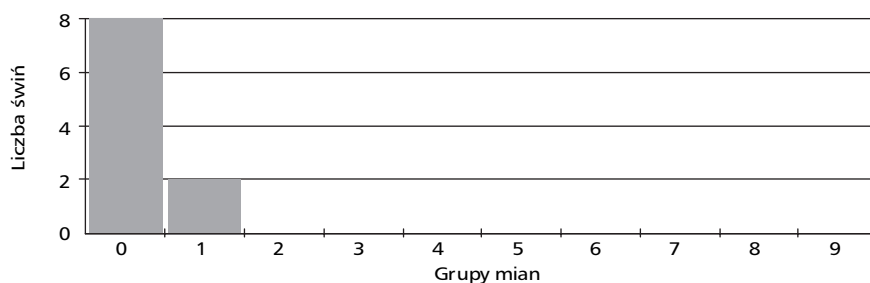
grupy mian S/P kolejne numery surowic badanych	lochy	warchlaki 35 dni	warchlaki 70 dni	tuczniaki 120 dni
1	0	0	4	6
2	2	0	5	5
3	1	1	4	5
4	0	0	1	4
5	3	0	6	6
6	2	0	2	3
7	0	1	1	5
8	1	0	5	6
9	1	0	2	6
10	2	0	3	4

Diagramy dotyczące tabeli 13:

Lochy



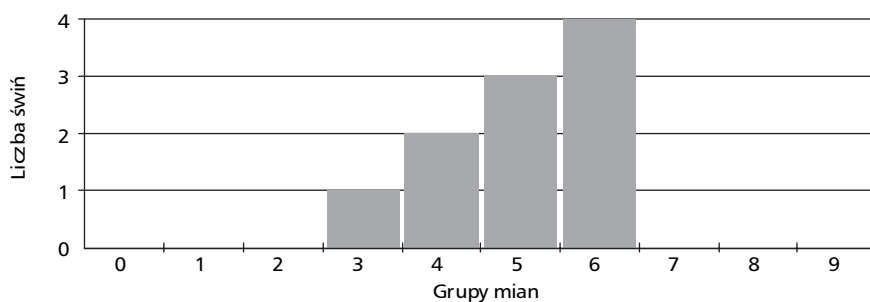
Warchlaki 35. dniowe



Warchlaki 70. dniowe



Tuczniaki 120. dniowe



**Interpretacja:**

Niskie miana przeciwciał przy obecności surowic ujemnie reagujących u loch, równocześnie zróżnicowane miana u 70 dniowych warchlaków oraz wysokie miana u tuczników wskazują na długotrwałe zakażenie stada. W takiej sytuacji nie obserwuje się zazwyczaj rozrodznych objawów nasuwających podejrzenie PRRS. Mogą one dotyczyć nowo wprowadzanych, wrażliwych loszek jeśli nie przeprowadzono ich właściwej aklimatyzacji. Aktywne krążenie wirusa ma miejsce w warchlakarni. W tej grupie wiekowej mogą występować zaburzenia ze strony układu oddechowego.

**Postępowanie:**

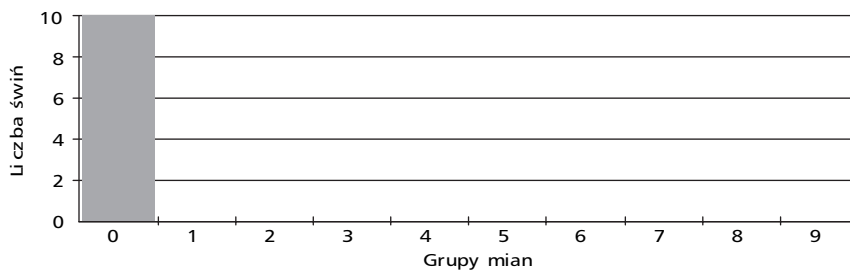
Należy zapewnić właściwe przygotowanie loszek remontowych poprzez aklimatyzację i/lub szczepienie na 30-60 dni przed wprowadzeniem do rozrodu. Alternatywnie można wprowadzić program szczepień całego stada podstawowego. Jeśli straty związane z zaburzeniami ze strony układu oddechowego utrzymują się mimo prowadzonej profilaktyki i leczenia chorób bakteryjnych układu oddechowego, można wprowadzić program szczepień prosiąt szczepionką przeciw PRRS. W prezentowanym przykładzie szczepienie powinno nastąpić między 30 i 40 dniem życia.

**Tabela 14. Zakażenie stada w rezultacie wprowadzenia do tuczarni świń z zakupu zainfekowanych PRRSV**

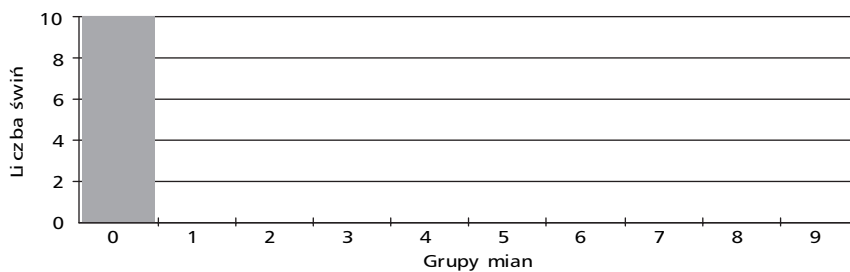
grupy mian S/P kolejne numery surowic badanych	lochy	warchlaki 35 dni	warchlaki 70 dni	tuczniki 120 dni
1	0	0	0	4
2	0	0	0	5
3	0	0	0	1
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	3
7	0	0	0	2
8	0	0	0	6
9	0	0	0	5
10	0	0	0	3

**Diagramy dotyczące tabeli 14**

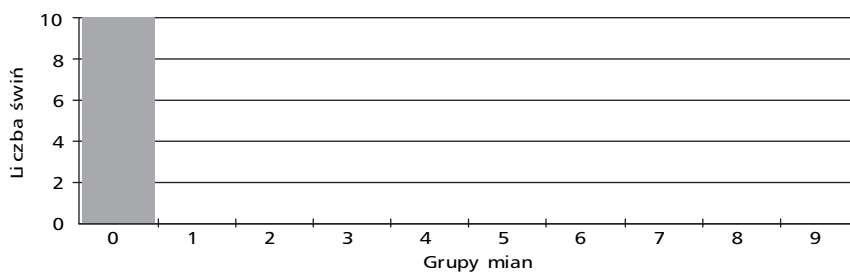
**Lochy**



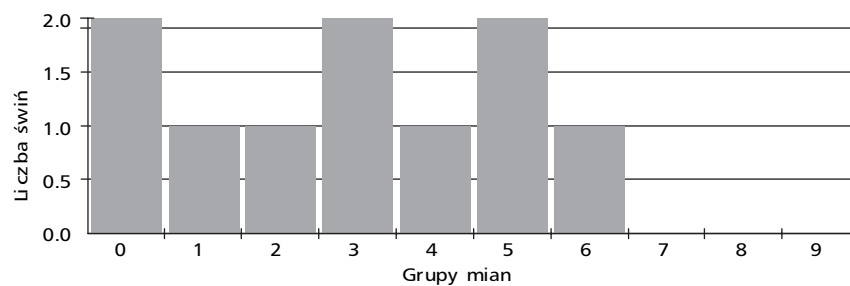
**Warchlaki 35. dniowe**



**Warchlaki 70. dniowe**



**Tuczniki 120. dniowe**



**Interpretacja:**

W przypadku wykrycia przeciwciał dla wirusa PRRS w grupie tuczników i ich braku w pozostałych sektorach wyjaśnieniem może być zakup zakażonych zwierząt do tuczu. Najprawdopodobniej nie obserwuje się wówczas żadnych objawów klinicznych lub jedynie zaburzenia ze strony układu oddechowego o niewielkim nasileniu. Jeśli nie zostaną podjęte żadne kroki, zakażenie stopniowo obejmie całe stado ze wszystkimi tego konsekwencjami.

**Postępowanie:**

Jeśli istnieją odpowiednie warunki należy poprawić bioasekurację stada podstawowego oraz warchlakarni i wybić zwierzęta w sektorze tuczu. Do ponownego jego zasiedlenia może dojść dopiero po dokładnej dezynfekcji pomieszczeń. Jeśli nie ma takiej możliwości można zastosować program szczepienia stada podstawowego i ewentualnie prosiąt.

**Precyzyjne określenie momentu zakażenia świń**

Badanie takie może zostać wykorzystane dla oceny skuteczności programu zwalczania PRRS podjętego na fermie lub precyzyjnego określenia właściwego momentu szczepienia przeciw PRRS. Badanie może dotyczyć warchlaków lub tuczników, które nie były szczepione przeciw PRRS. W tym celu należy trwale oznakować 10 prosiąt z różnych miotów przed odsadzeniem i badać ich krew na obecność przeciwciał dla PRRSV co jeden lub dwa tygodnie do chwili kiedy wszystkie z nich ulegną zakażeniu. Biorąc pod uwagę, że przeciwciała pojawiają się po 14 dniach od zakażenia możemy z dużą dokładnością określić jego moment.



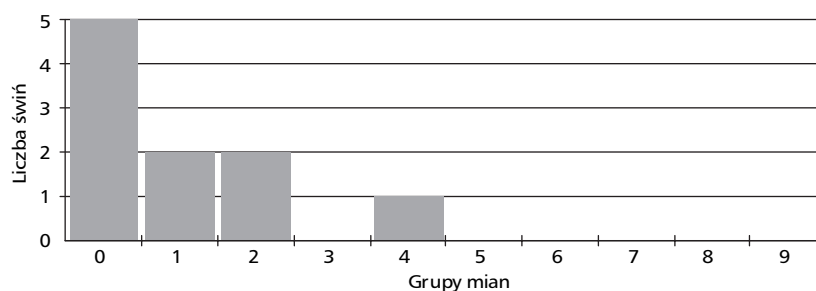
Tabela 15. Ocena profilu serologicznego stada w celu ustalenia terminu szczepień przeciw PRRS

grupy mian S/P kolejne numery surowic badanych	14 dni	22 dni	36 dni	50 dni	64 dni	78 dni
1	0	0	0	0	0	2
2	1	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	3	5
4	0	0	0	0	1	3
5	0	0	0	0	1	3
6	0	0	0	0	_*	-
7	1	1	0	0	0	1
8	2	1	1	0	0	3
9	2	1	1	0	0	2
10	4	3	1	0	0	1

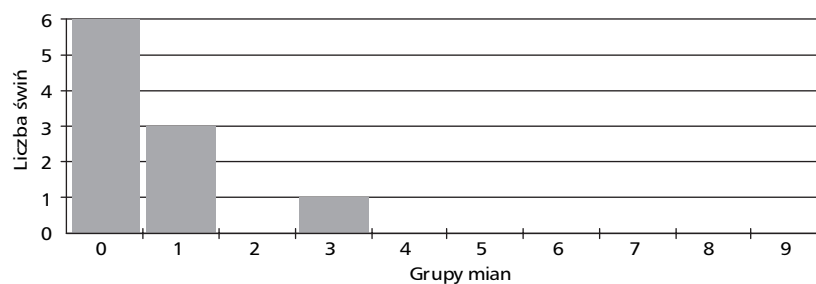
\* padł

Diagramy dotyczące tabeli 15

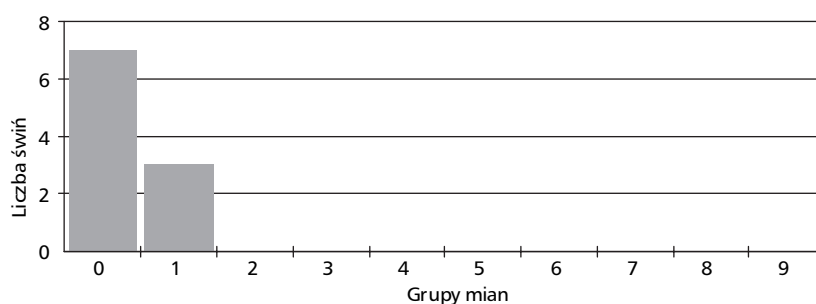
Prosięta 14. dniowe



Prosięta 22. dniowe



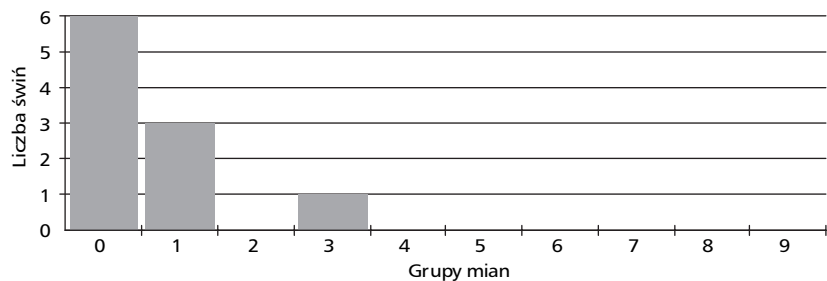
Warchlaki 36. dniowe



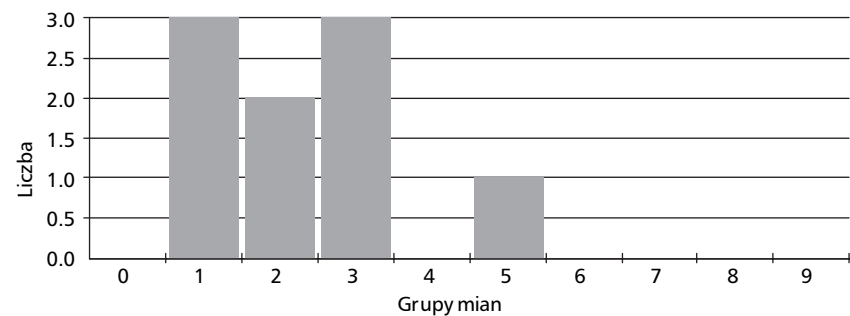
Warchlaki 50. dniowe



**Warchlaki 64. dniowe**



**Warchlaki 78. dniowe**



**Interpretacja:**

Lochy przekazują prosiętom dość wysoki poziom odporności. Pozwala to na ich naturalne zabezpieczenie przed zakażeniem do około 50 dnia życia. Szczepienie prosiąt powinno nastąpić około 30 dnia życia.

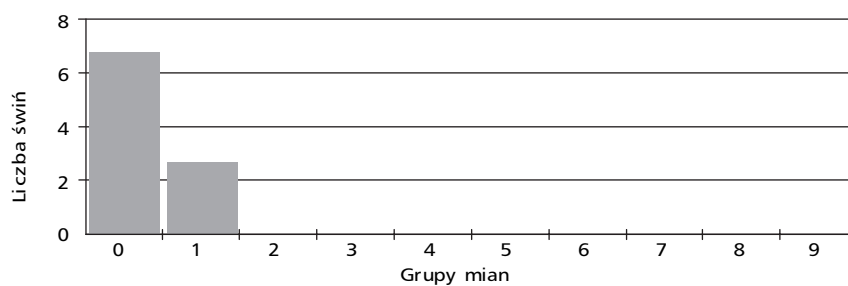
Tabela 16. Ocena profilu serologicznego stada w celu ustalenia terminu szczepień przeciw PRRS

grupy mian S/P kolejne numery surowic badanych	14 dni	22 dni	36 dni	50 dni	64 dni	78 dni
1	0	0	0	1	3	3
2	0	0	0	3	-	-
3	0	0	0	4	3	3
4	1	0	0	2	3	3
5	0	0	0	4	4	3
6	1	0	0	2	3	3
7	1	0	0	-*	-	-
8	0	0	0	2	3	4
9	0	0	0	1	2	2
10	0	0	0	2	3	3

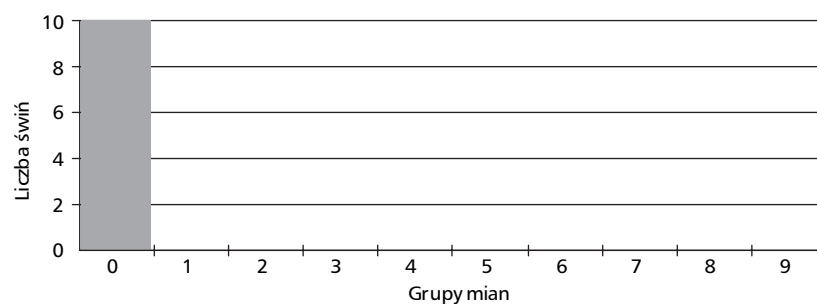
\* padł

Diagramy dotyczące tabeli 16

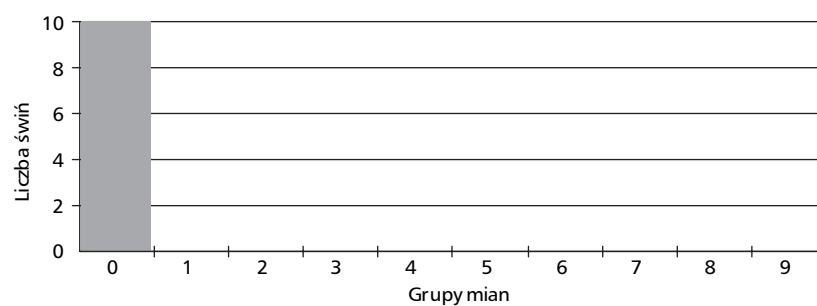
Prosięta 14. dniowe



Prosięta 22. dniowe

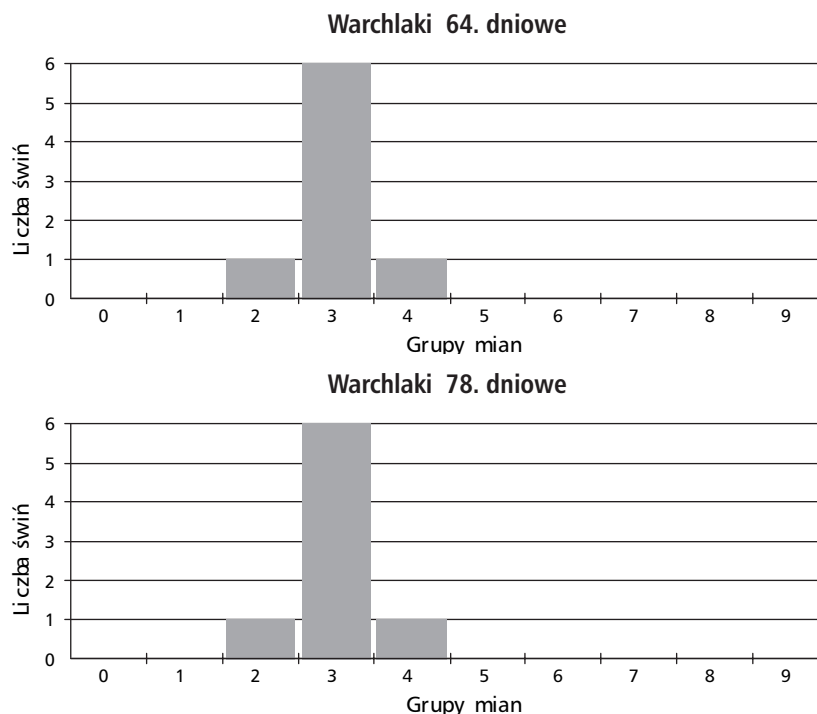


Warchlaki 36. dniowe



Warchlaki 50. dniowe





**Interpretacja**

Lochy przekazują prosiętom niski poziom odporności, na co wskazuje krótkie utrzymywanie się przeciwciał siarowych. Do zakażenia dochodzi około 30-36 dnia życia. Szczepienie prosiąt należy przeprowadzić w 14 dniu życia. W takim przypadku należy wykonać szczepienie stada podstawowego.

## Piśmiennictwo

1. Benfield D, Harris L, Nelson E, et al. 1992a. Properties of SIRS virus isolate ATCC VR-2332 in the United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4:19-20.
2. Benfield DA, Nelson E, Collins JE, et al. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4:127-133.
3. Benfield DA, Yaeger MJ, Collins JE. 1994. Experimental studies on the transmission and persistence of swine infertility and respiratory disease virus (Mystery Swine Disease). 1994 Research Investment Report. National Pork Producers Council, PO Box 10383, Des Moines, Iowa 50308, pp. 5-14.
4. Cannon RM, Roe RT. 1982. *Livestock disease surveys: A field manual for veterinarians*. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry. Australian Government Publishing Service, Canberra.
5. Chase C., Polson D. 2000. Sampling the herd: When is Enough? *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, 465-478.
6. Christianson WT, Choi CS, Collins JE, et al. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57:262-268.
7. Collins J, Dee S, Halbur P, et al. 1996. Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Swine Health and Production* 4(1):33-35.
8. Dufresne L., Polson D.D., Holck J.T., Roberts J. 2003. Serological Monitoring in negative and low prevalence populations. *PRRS Compendium*. Wyd. National Pork Board, Des Moines, USA, 87.
9. Nodelijk G, de Jong MC, Van Nes A, et al. 2000. Introduction, persistence and fade-out of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a Dutch breeding herd: a mathematical analysis. *Epidemiol Infect* 124:173-182.
10. Pejsak Z.: *Choroby świń*. Polskie Wydawnictwo Rolnicze. Poznań 2002.
11. Polson D, Jordan D. 2002. A simulated model approach to sample size determination. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress* 1:256.
12. Polson DD, Jordan D, Holck JT, DuFresne L. 2002. Test specificity, its impact on case specificity, and a proactive procedure to aid in the interpretation of unexpected test results. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress* 1:257.
13. Smith RD. 1995. *Veterinary Clinical Epidemiology, A Problem-Oriented Approach* (2nd edition). CRC Press, Boca Raton, Florida.
14. *Standard Jakości OIE i Przewodnik dla Laboratoriów Weterynaryjnych. Choroby zakaźne*. Wyd. Office International des Epizooties, Paryż, 2002.
15. Thrusfield MV. 1995. *Veterinary Epidemiology* (2nd edition). Blackwell Science Ltd, Oxford.
16. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, et al. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol* 57:69-81.
17. Yoon K-J, Zimmerman JJ, Chang CC, et al. 1998. Effect of challenge dose and route on transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress* 2:129.
18. Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swensen SL, et al. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7:305-312.
19. Zimmerman J., Yoon K.J.: *PRRS Compendium*. Wyd. National Pork Board, Des Moines, USA, 2003.

Prof. dr hab. Marian Truszczyński  
Prof. dr hab. Zygmunt Pejsak

# **ELISA**

## **W SEROLOGICZNYM ROZPOZNAWANIU ROZRODCZO-ODDECHOWEGO ZESPOŁU CHOROBOWEGO ŚWIŃ**

monografia

Puławy 2004





Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe  
**ESKULAP** Spółka Jawna  
44-105 Gliwice, ul. Elsnera 6  
tel.: 0-prefix-32 270 02 07, 270 06 28  
tel./fax: 0-prefix-32 270 02 08  
infolinia: 0 801 120 104  
e-mail: [eskulap@eskulap.gliwice.pl](mailto:eskulap@eskulap.gliwice.pl)  
<http://www.eskulap.gliwice.pl>