

# Diagnostyka laboratoryjna grypy koni

## – zasady i znaczenie

Iwona Markowska-Daniel, Lucjan Witkowski, Jerzy Kita

z Samodzielnej Pracowni Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Grypa koni jest najbardziej zaraźliwą chorobą wirusową układu oddechowego koniowatych (1). Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus grypy koni (equine influenza virus – EIV). Należy on do rodziny *Orthomyxoviridae* (2). Genom EIV składa się z ośmiu jednoniciowych segmentów RNA o ujemnej polarności (3). Obecność RNA w genie i jego specyficzna struktura determinują zmienność genetyczną, a w ślad za tym zmienność antygenową EIV. Konsekwencją tego są poważne trudności w rozpoznawaniu choroby. Najczęściej dochodzi do wymiany genów kodujących glikoproteiny powierzchniowe: hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA), które znajdują się w otoczce lipidowej otaczającej genom (4).

Wprawdzie diagnoza kliniczna grypy koni nie jest trudna, z uwagi na charakterystyczny przebieg zakażenia oraz typowe objawy chorobowe, niemniej jednak do

postawienia jednoznacznego rozpoznania konieczne jest przeprowadzenie badań laboratoryjnych (5).

Dla prawidłowego laboratoryjnego rozpoznania choroby niezbędne jest pobranie wartościowych epidemiologicznie, reprezentatywnych próbek, z uwzględnieniem czasu, jaki upłynął od zakażenia do pobrania próbek, danych o wieku zwierząt oraz prowadzeniu szczepień stada przeciwko grypie (6).

Należy pamiętać, że nie ma idealnej metody diagnostycznej, żadna nie gwarantuje 100% czułości i swoistości. Każda metoda ma różne możliwości i ograniczenia, takie jak czułość, swoistość, czas i koszt analizy, wydajność (skala badań), dostępność zestawów komercyjnych, konieczność zastosowania specjalistycznej aparatury, łatwości wykonania i interpretacji wyniku (6). Z tego powodu optymalne jest stosowanie dwóch różnych technik laboratoryjnych. Dobór

metody zależy przede wszystkim od celu badania. Inne techniki znajdą zastosowanie przy rozpoznaniu choroby w przypadku jej podejrzenia u indywidualnych koni, a inne w monitoringu stada czy nadzorze nad grypą koni w skali krajowej lub globalnej.

Diagnostyka laboratoryjna grypy koni oparta jest zarówno na badaniu bezpośrednim, tj. badaniu wirusologicznym i/lub genetycznym wymazów z jam nosowych, ewentualnie wycinków płuc pobranych od zwierząt padłych, jak i na badaniu pośrednim, tj. wykrywaniu obecności przeciwciał swoistych dla EIV (7). Techniki serologiczne są znacząco tańsze niż metody bezpośrednie, w związku z tym są one częściej wykorzystywane. Należy jednak mieć świadomość, że badanie serologiczne jest obciążone ryzykiem pojawienia się wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Dlatego dla uzyskania wiarygodnego wyniku badaniu serologicznemu powinny być poddane surowice od większej liczby koni.

### Reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction – PCR)

W ostatnich latach diagnostyka wielu chorób zwierząt, w tym także grypy koni, została zdominowana przez techniki biologii molekularnej. Najpowszechniej wykorzystywany jest test PCR (8, 9). Opracowano

## Laboratory diagnosis of equine influenza – principles and significance

Markowska-Daniel I., Witkowski L., Kita J.,  
Laboratory of Veterinary Epidemiology and  
Economics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw  
University of Life Sciences – SGGW

Equine influenza is the most infectious viral disease of the equine respiratory tract. However the diagnosis based on the clinical picture and spread of diseases is relatively easy. Laboratory investigations are essential for final diagnosis of equine influenza. Therefore an overview of the diagnostic methods, enabling detection of the virus, its genetic material, as well as antibodies, with emphasis on highlighting their advantages and limitations is presented.

To obtain a correct diagnosis, epidemiologically appropriate samples must be acquired, taking into account the time from infection to sampling, the vaccination program as well as the animal age.

It should be stressed that there is no ideal diagnostic method, every test has some advantages and limitations, such as sensitivity and specificity, scale, time and cost of analysis, availability of commercial kits, necessity to use a specified apparatus, simplicity of a test and analysis of the results. The choice of a suitable technique depends on the aim of the study; other techniques will be useful for testing of individuals suspected of infection, and others for monitoring of herd health status or surveillance programs.

Laboratory diagnosis of equine influenza is based on direct (isolation of virus or its RNA from nasal swabs or lung tissue from dead animals) and indirect (detection of virus specific antibodies) techniques. The most widely used techniques include PCR and serological examinations. They enable assessment of the immune status of horses and time of infection, monitoring the spread of disease, characterizing new isolates and evaluation of vaccination efficacy. These are also cheaper than direct tests. However it should be taken into account that they are not accurate and test results obtained with their use should be confirmed by other more precise techniques due to the risk of false positive or negative results. Therefore, in order to receive unequivocal results, the samples of sera from a larger number of horses should be taken. In summary, laboratory examinations are important for detection of equine influenza and for surveillance programs. In recent years, significant progress has occurred in this area. There is no doubt that the use of specialized laboratories by horse owners and veterinarians caring for the health of the herd will minimize the economic costs of equine influenza.

**Keywords:** equine influenza, laboratory diagnostics, virology, molecular techniques, serology.

szereg odmian tego testu, obecnie najczęściej wykorzystywana jest metoda ilościowa PCR (quantitative PCR – qPCR), która umożliwia śledzenie amplifikacji materiału genetycznego EIV w czasie rzeczywistym (Real Time PCR, RT-PCR; 10, 11, 12, 13).

Posiada ona czułość przewyższającą używaną w tradycyjnym teście PCR oraz umożliwia określenie liczby kopii materiału genetycznego EIV. Ponieważ materiałem genetycznym EIV jest RNA, jego amplifikacja musi być poprzedzona przepisaniem informacji genetycznej z RNA na komplementarną nić DNA (cDNA).

Technika PCR polega na enzymatycznym powieleniu fragmentu DNA wyosobnionego z materiału biologicznego, stanowiącego matrycę, który jest ograniczony przez dwa oligonukleotydowe startery składające się na ogół z 18–30 nukleotydów, z których każdy jest komplementarny do jednego końca matrycy. Reakcja zachodzi w obecności enzymu termostabilnej polimerazy DNA (Taq polimeraza) i dodanych do mieszaniny reakcyjnej nukleotydów.

Z uwagi na krótki czas replikacji wirusa obecność jego materiału genetycznego testem PCR można wykryć jeszcze przed czasem wystąpienia objawów. Szczególnie dotyczy to koni nie w pełni uodpornionych po szczepieniu.

### Zalety i wady

Powszechne wykorzystanie PCR do diagnostyki grypy koni wynika z możliwości szybkiej diagnostyki (wynik badania uzyskuje się w ciągu kilku godzin). Kolejną zaletą metody jest jej czułość. Teoretycznie rozpoznanie może być postawione nawet wtedy, gdy w badanej próbce materiału biologicznego znajduje się tylko kilka cząstek wirusa lub nawet nie ma go wcale, natomiast obecne są fragmenty RNA, ewentualnie dostępny materiał biologiczny jest nieświeży, niewłaściwie pobrany lub toksyczny dla tkanki. W związku z tym metoda może być wykorzystana także w tych przypadkach, gdy klasyczne metody, takie jak np. izolacja wirusa, nie są możliwe. Metoda PCR jest w pełni zautomatyzowana, jednocześnie w pojedynczym bloku termocyklera można badać 96 próbek, co pozwala na prowadzenie badań na szeroką skalę. Posiada ona jednak pewne ograniczenia. Warunkiem skuteczności PCR jest optymalizacja parametrów reakcji, a zwłaszcza dobór odpowiedniej sekwenencji starterów. Sekwencje te musi charakteryzować wysoka zachowawczość i unikalność. Ograniczenia te wynikają głównie z dużej czułości metody. Czułość jest bronią obusieczną, bowiem przy nieprzestrzeganiu podstawowych zasad pracy z materiałem genetycznym bardzo łatwo może dojść do kontaminacji pomieszczeń laboratoryjnych, czego konsekwencją jest uzyskiwanie wyników fałszywie dodatnich. Z kolei wysoka swoistość reakcji, w przypadku źle zaprojektowanych starterów lub doboru nieprawidłowej metody ekstrakcji kwasu nukleinowego, może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych

(6). Inną przeszkodą w wykrywaniu RNA EIV metodą PCR mogą być zanieczyszczenia chemiczne lub enzymatyczne. Pomimo wspomnianych ograniczeń test PCR jest obecnie najpowszechniej wykorzystywaną techniką wirusologiczną.

### Izolacja wirusa (virus isolation – VI)

Klasyczna technika wirusologiczna polega na izolacji EIV z próbek pobranych od chorych koni (14, 15). Do tego celu wykorzystuje się zarodki kurze SPF lub hodowle komórkowe. Do izolacji najbardziej przydatne są wymazy z nosa, które należy pobierać od zwierząt w okresie pierwszych 3–4 dni trwania choroby (7). Od padłych koni do izolacji wirusa pobiera się wycinki płuc z pogranicza tkanki zdrowej i zmienionej zapalnie.

### Zalety i wady

Izolacja jest metodą w stu procentach swoistą. Niemniej jednak jest ona długotrwała, pracochłonna, kosztowna, wymaga wyspecjalizowanego personelu i aparatury. Jej czułość określa się na około 54%.

### Badania serologiczne

Szerokie zastosowanie w diagnostyce grypy koni znalazły badania serologiczne. Pozwalają one na przybliżone ustalenie statusu immunologicznego koni. Warto pamiętać, że stwierdzenie obecności swoistych przeciwciał wskazuje na kontakt konia z EIV, ale nie jest jednoznaczne z występowaniem grypy w stadzie koni. Badania serologiczne umożliwiają także przybliżone ustalenie czasu zakażenia oraz monitorowanie szerzenia się choroby (15).

Moment stwierdzenia serokonwersji zależy od techniki badawczej, szczepu wirusa, wieku zwierzęcia oraz obecności czynników immunosupresyjnych.

Poza stosowaniem badań serologicznych do wykrywania obecności swoistych przeciwciał, są one wykorzystywane do charakterystyki nowych izolatów w Europie, Ameryce Północnej i ostatnio także w Dubaju (15, 16). Dane uzyskane w takich badaniach są podstawą decyzji, który szczep należy wykorzystać do produkcji szczepionki (17). Nowe izolaty mogą być m.in. charakteryzowane (typowane) na podstawie różnicy miana przeciwciał hemaglutynacyjnych z różnymi surowicami referencyjnymi. Wykazano, że surowice referencyjne produkowane z użyciem frettek są szczepowo bardziej swoiste niż surowice produkowane na koniach, dlatego powinny one być stosowane do różnicowania nowych izolatów (18).

Badania serologiczne są również przydatne do oceny skuteczności szczepień, w tym także do wykazania błędów

w szczepieniach (15). Oficjalnie rekomendowanym przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (7) do testowania szczepionek jest test zahamowania hemaglutynacji (haemagglutination inhibition assay – HI). Szczepionkę przeciwko grypie uważa się za satysfakcjonującą, jeśli chroni przed wystąpieniem objawów klinicznych i stymuluje produkcję przeciwciał o mianie co najmniej 1:64, jakkolwiek wymagane jest wyższe miano, jeśli szczepionka ma zapobiegać zakażeniu i siewstwu wirusa (19).

Badania serologiczne odgrywają również dużą rolę w nadzorze nad grypą koni, czego przykładem mogą być badania nad seroprevalencją grypy koni w Nigerii (20) i Izraelu (21).

Do badań serologicznych powinny być przesyłane surowice pobrane od koni w szczycie zachorowania i po 2–4 tygodniach. Czynne zakażenie określa się wówczas na podstawie analizy wyników mianowania par surowic. Dwukrotne badanie (badanie par surowic od tych samych zwierząt) jest niezbędne dla uzyskania jednoznacznego wyniku dowodzącego zakażenia. Minimum czterokrotny wzrost miana w parach surowic dowodzi niedawnego zakażenia koni EIV (22).

Należy mieć świadomość, że dla uzyskania wiarygodnego wyniku bardzo istotny jest czas wykonania badań serologicznych. Badania przeprowadzone zbyt wcześnie, w krótkim odstępie czasu od zakażenia EIV, mogą dać wynik mylący. Aby organizm wytworzył przeciwciała możliwe do wykrycia, zazwyczaj musi upłynąć co najmniej 10–14 dni.

Należy także pamiętać, że w stadzie szczepionym zjawiskiem normalnym będzie wykrywanie przeciwciał przeciwko antygenowi, który znajdował się w podanej szczepionce. Z tego powodu, zlecając badania, należy uzyskać w wywiadzie informację odnośnie do stosowanego w stadzie kalendarza szczepień. W przypadku uzyskania wyników wątpliwych zaleca się ponowne badanie tej samej surowicy przy użyciu tego samego testu, ponowne badanie tej samej surowicy przy użyciu testów alternatywnych, ewentualnie przy braku rozstrzygnięcia, ponowne badanie stada w odstępie 2 tygodni.

### Test zahamowania hemaglutynacji (haemagglutination inhibition – HI)

Wirus grypy koni posiada właściwości hemaglutynacyjne, to znaczy, że HA EIV, dzięki swoim właściwościom enzymatycznym, łączy się z kwasem sialowym obecnym w receptorach erytrocytów, powodując zlepianie się krwinek czerwonych w większe agregaty. Zjawiska to zostało odkryte w latach 40. ubiegłego wieku i było podstawą do opracowania testu HI. Jest to test typowo swoisty (23). Stanowi on tzw. złoty standard w serologicznej diagnostyce grypy koni.

W przypadku obecności w badanej surowicy przeciwciał swoistych dla konkretnego podtypu HA EIV dochodzi do zablokowania właściwości hemaglutynacyjnych wirusa, w związku z czym krwinki osiadają na dnie basenika mikropłytki, tworząc charakterystyczny osad przypominający guzik. Jeśli z kolei w badanej surowicy brak jest swoistych dla tego podtypu przeciwciał, nie dochodzi do hamowania zdolności wirusa do aglutynacji krwinek, w związku z czym erytrocyty osadzają się na dnie basenika mikropłytki, tworząc charakterystyczną chmurkę.

Test HI umożliwia nie tylko wykrycie obecności przeciwciał, ale również określenie ich poziomu (miana przeciwciał). Miano surowicy to odwrotność najwyższego jej rozcieńczenia, przy którym występuje jeszcze hamowanie właściwości hemaglutynacyjnych EIV. Zależnie od wysokości miana możemy ocenić, czy mamy do czynienia z serokonwersją spowodowaną niedawnym zakażeniem lub szczepieniem, czy też zwierzę miało kontakt z wirusem w przeszłości.

W ocenie wyników badań serologicznych próbek krwi pobranych od młodych zwierząt należy uwzględnić możliwość wykrycia przeciwciał matczynych, przekazanych wraz z siarą (24).

Surowica, będąca obiektem badawczym w teście HI, musi być odpowiednio przygotowana, w celu eliminacji nieswoistych aglutynin i inhibitorów reakcji hemaglutynacji, które mogą skutkować wynikiem fałszywie dodatnim. Do tego celu wykorzystuje się inaktywację termiczną połączoną z inaktywacją chemiczną w postaci różnych absorbantów, najczęściej wyciągu z *Vibrio cholerae* (receptor destroing enzyme – RDE), kaolinu lub nadjodanu potasu (25). Wykazano, że sam kaolin był niewystarczający do wyeliminowania fałszywie dodatnich reakcji w badaniu ze szczepem H7N7 EIV. Z kolei Tween 80 zmieszany z eterem dodawany do antygeny wzmacnia aktywność HA szczepów podtypu H3N8, eliminuje ich infekcyjność i zapobiega krzyżowej kontaminacji. W konsekwencji takie postępowanie wprawdzie wzmacnia czułość testu, ale może obniżyć jego swoistość (18).

Również ilość antygeny stosowana w teście HI może rzutować na jego wynik. Miano wirusa to odwrotność jego najwyższego rozcieńczenia, w którym występuje hemaglutynacja krwinek. Jest ono wyrażane w jednostkach hemaglutynacyjnych (haemagglutination unit – HAU). Jednostka hemaglutynacyjna to ilość wirusa w jednostce objętości, która jest potrzebna do aglutynacji tej samej objętości zawiesiny erytrocytów. Najczęściej w teście HI stosuje się 8 HAU. W celu określenia miana przeciwciał badana surowica musi być odpowiednio rozcieńczona. Szczegółowy protokół testu HI jest dostępny w podręczniku diagnostycznym OIE (2016).

### Zalety i wady

Test HI jest prosty w wykonaniu, szybki, tani, nie wymaga specjalistycznej aparatury, posiada wysoką czułość i swoistość. Wynik testu odczytuje się wizualnie, stąd jest on obciążony subiektywizmem. Z tego powodu doświadczenie diagnosty może rzutować na końcową interpretację wyniku. Ograniczenia związane z omawianym testem dotyczą także łączenia HA do pozostałości kwasu sialowego na erytrocytach. Przeciwciała HI, które łącząc się z HA, zapobiegają hemaglutynacji krwinek, nie reprezentują ochronnych przeciwciał neutralizujących. Ich poziom nie zawsze koreluje z ochroną przed zakażeniem. Niemniej, jak pokazują to badania Morley i wsp. (22), w przypadku grypy koni test HI wykazuje dobrą korelację z testem neutralizacji. Kolejne ograniczenie wiąże się z faktem, że test HI nie jest w pełni wystandaryzowany, w związku z tym mogą występować różnice w wynikach uzyskiwanych przez różne laboratoria. Przykładowo Daly i wsp. (26) wykazali, że te same próbki surowic badane w 8 laboratoriach uwiarygodniły różnice w mianie nawet do 4 rozcieńczeń. Z tego powodu w każdym badaniu powinny być uwzględnione odpowiednie kontrole testu. Na czułość testu ma także wpływ pochodzenie erytrocytów (gatunek dawcy). Poza tym, w związku ze zmiennością EIV, istnieje konieczność okresowej aktualizacji antygeny używanego w teście HI. Do wykonania badania używany jest pełny wirus, dlatego nie można na jego podstawie rozróżnić koni szczepionych od zakażonych (5). Niezależnie od wymienionych ograniczeń test HI jest zalecany i szeroko wykorzystywany, zarówno do diagnostyki, jak i nadzoru (monitoringu), szczególnie w krajach o niższym poziomie ekonomicznym (16). Nie ulega wątpliwości, że opracowanie szybkiego, prostego w użyciu, taniego testu do jednoczesnej analizy dużej liczby surowic stanowiłoby dobrą alternatywę dla testu HI.

### Test hemolizy radialnej (single radial hemolysis – SRH)

Test SRH jest używany od lat 70. ubiegłego wieku do wykrywania przeciwciał swoistych dla EIV (27). W 2004 r. OIE uznało go jako preferowany do oceny szczepionki przeciwko grypie koni. Do dnia dzisiejszego jest on uznawany za najbardziej czuły i swoisty test serologiczny w diagnostyce grypy koni, ponieważ określa on przeciwciała funkcjonalne (OIE). Wykorzystuje się w nim właściwości lizy komórek przez dopełniacz w obecności przeciwciał. Jeśli w próbce surowicy obecne są przeciwciała anty-HA komponenty dopełniacza łączą się z nimi, a następnie wiążą się z HA wirusa obecnego w agarze z dodatkiem krwi,



tworząc charakterystyczne pierścienie hemolizy. Powierzchnia (średnica) strefy lizy mierzona w mm<sup>2</sup> koreluje z poziomem przeciwciał swoistych dla danego szczepu, które są obecne w badanej próbce surowicy konia. Szczegółowy protokół wykonania testu SRH zawarty jest w podręczniku diagnostycznym OIE. Wynik jest uznawany za dodatni, gdy strefa hemolizy sięga do 25 mm<sup>2</sup> lub jest o 50% większa w porównaniu do kontroli. Należy podkreślić, że w teście SRH występują różnice między okresem ostrym i konwalescencji. Za wystarczającą wartość ochronną w stosunku do szczepu homologicznego użytego do zakażenia przyjmuje się poziom przeciwciał > 150 mm<sup>2</sup>, w przypadku szczepów heterologicznych wymagany jest wyższy poziom przeciwciał. Wartość ta została wyznaczona na podstawie wyników badań terenowych młodych koni pełnej krwi, którym podawano szczepionkę, a następnie określano poziom przeciwciał testem SRH (28). Wartości graniczne (cut-off values) w teście SRH stanowiły podstawę decyzji OIE w zakresie konieczności uaktualnienia składu szczepionek poprzez dobór nowych szczepów (29). Test nie jest standaryzowany, w związku z tym wykazuje różnice w wynikach między laboratoriami (30). Daly i wsp. (26) wykazali, że różnice pomiędzy 9 laboratoriami wynosiły niemal do czterech rozcieńczeń.

### Zalety i wady

Najważniejszą zaletą testu SRH jest silna korelacja pomiędzy ochroną immunologiczną po szczepieniu i/lub zakażeniu a poziomem przeciwciał wykrywanych przy jego użyciu, potwierdzona eksperymentalnym zakażeniem koni EIV. Dowodzi to dużej czułości i swoistości testu. Wykazano, że test SRH jest bardziej czuły niż HI, ponieważ do jego wykonania nie stosuje się rozcieńczenia badanej surowicy, co zapewnia liniarny odczyt. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku użycia surowic referencyjnych test SRH jest testem bardziej powtarzalnym w porównaniu do HI (18). Wadą testu jest brak możliwości określania przeciwciał klasy IgM, w związku z czym nie nadaje się on do wykrywania wczesnego zakażenia. Z tego powodu testem diagnostycznym z wyboru nadal pozostaje HI. Do testu SRH, analogicznie jak ma to miejsce w odniesieniu do HI, używany jest pełny wirus, dlatego przy jego użyciu nie można rozróżnić koni szczepionych od zakażonych (5).

### ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Test ELISA jest używany do diagnostyki grypy koni w wielu laboratoriach. Wynik dodatni testu sugeruje, iż zwierzę miało

kontakt z EIV, ale nie dowodzi aktualnego zakażenia, bowiem przeciwciała klasy IgG mogą się utrzymywać na wysokim poziomie przez długi okres po ustąpieniu objawów choroby.

Opracowano wiele rodzajów testów ELISA, na przykład blokujący (blocking), pośredni (indirect), konkurencyjny (competition) oraz bazujący na komórkach (cell-based ELISA). W diagnostyce grypy koni najczęściej wykrywa się przeciwciała przeciwko nukleoproteinie (NP), będącej jednym z najbardziej konserwatywnych białek EIV (31).

Zasada działania testu ELISA polega na tym, że mikroplątka opłaszczają antygenem EIV. Jeśli w badanej surowicy znajdują się swoiste przeciwciała, tworzą one kompleksy immunologiczne z antygenem. Kompleksy te są następnie wiązane przez znakowane enzymem przeciwciała (koniuugat), które katalizują reakcję. Powstałe w reakcji kompleksy antygen-przeciwciało-koniugat można oznaczyć spektrofotometrycznie, dodając odpowiedni substrat (6).

Istotną jest możliwość wykorzystania strategii DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) do kontrolowania grypy koni. Jeśli do immunizacji koni przeciwko grypie zastosuje się szczepionkę pojednostkową i jednocześnie dysponuje się odpowiednim zestawem ELISA, istnieje możliwość różnicowania zwierząt zakażonych i szczepionych, ponieważ zwierzęta zaszczepione takim biopreparatem nie wytwarzają przeciwciał przeciwko białkom wirusowym nieobecnym w składzie szczepionki (32, 33). Przykładowo, test ELISA bazujący na komórkach, w którym mierzone są przeciwciała przeciwko niestrukturalnym białkom NS1, jest uznawany za przydatny element strategii DIVA dla koni, ponieważ przeciwciała te są obecne tylko u koni zakażonych, a nie występują u koni szczepionych szczepionką inaktywowaną.

### Zalety i wady

Z uwagi na krótki czas analizy, dużą skalę badań (możliwość jednoczesnego zbadania próbek od wielu zwierząt), prostotę wykonania, dostępność testów komercyjnych, brak konieczności dysponowania wyspecjalizowaną aparaturą, poza czytnikiem mikroplątek, oraz niską ceną badania, test ELISA jest szeroko stosowany. Przykładowo, badania przesiewowe przeprowadzone testem ELISA w odmianie blokującej w 2007 r. w Australii, podczas wybuchu grypy koni, wykazały zarówno dużą czułość, jak i swoistość testu. Ograniczeniem metody ELISA jest fakt, że jest to metoda półilościowa, określająca przeciwciała neutralizacyjne. W związku z tym nie znajduje ona zastosowania w badaniu szczepionek. Poza tym określenie przeciwciał anty-NP

nie jest specyficzne dla podtypu, w związku z czym w celu określenia podtypu EIV niezbędne jest wykonanie dalszych badań.

### Test seroneutralizacji (seroneutralization assay – SN)

Test seroneutralizacji identyfikuje przeciwciała hamujące wniknięcie EIV do komórki i jego dalszą replikację (34). Należy podkreślić, że seroneutralizacja może być wykonywana tylko z żywym wirusem. Surowica używana do tego testu musi być odpowiednio przygotowana, tzn. poddana działaniu temperatury, seryjnie rozcieńczona i w etapie końcowym inkubowana ze standardową ilością wirusa. Postępowanie musi być zgodne ze standardowym protokołem. Mieszanie surowicy i wirusa można zakażać do worka o mocznikowego zarodki kurze SPF, a zebrany płyn użyć do określenia miana metodą HI (35). Obserwowane obniżenie infekcyjności wirusa jest związane z jego neutralizacją przez przeciwciała.

### Zalety i wady

Seroneutralizacja jest czułym i swoistym narzędziem do diagnostyki zakażenia koni EIV jako, że test mierzy biologiczną funkcję przeciwciał. Określenie przeciwciał neutralizacyjnych stanowi złoty standard w ocenie skuteczności szczepionki przeciwko grypie koni. Ograniczeniem metody jest znaczący koszt badania, w porównaniu z HI, oraz konieczność dysponowania laboratorium wirusologicznym z pracownią hodowli komórkowych. Jest to także test długotrwały, wynik badania uzyskuje się po kilku dniach. Ponadto nie może on być wykorzystany do jednoczesnego badania dużej liczby próbek. Nie mniej jednak test ten jest uznawany za bardzo przydatny do oceny odpowiedzi immunologicznej po podaniu szczepionki. Ponadto jest on polecany przy doborze aktualnego szczepu do szczepionki (36). Z powodu przedstawionych ograniczeń test SN nie jest używany do rutynowej diagnostyki grypy koni.

Do jakościowego określenia przeciwciał neutralizujących używany jest test łysinkowy (plaque reduction neutralization test – PRNT). W teście tym używa się agarozy lub celulozy w celu ograniczenia przedostania się wirusa znajdującego się w supernatancie do sąsiednich dołków mikroplątka. Metoda ta uważana jest za złoty standard do określania przeciwciał neutralizujących. Jakkolwiek komórki MDCK z trypsyną są permissive dla EIV (OIE 2015), wiele szczepów wykazuje efekt cytotatyczny w bardzo ograniczonym zakresie. W związku z tym miano przeciwciał neutralizacyjnych określane jest po uprzednim utrwaleniu hodowli. Następnie taki antygen może być użyty do

testu ELISA bazującego na białku NP, do jakościowego określenia replikacji wirusa. Otrzymanie wyniku takiego badania jest możliwe po 24 godzinach (37).

### Podsumowanie

Badania laboratoryjne odgrywają bardzo ważną rolę zarówno w rozpoznawaniu grypy u koni, jak i w nadzorze nad chorobą. W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej, choć niektóre testy serologiczne, takie jak HI i SRH, mimo że używane są od wczesnych lat 30. i 70. ubiegłego wieku, pozostają aktualne do dziś. Pomimo znacznego postępu celowe są dalsze badania w omawianym zakresie. Nie ulega wątpliwości, że korzystanie z wyspecjalizowanych laboratoriów diagnostycznych przez hodowców koni oraz lekarzy weterynarii sprawujących nadzór nad stanem zdrowia tego gatunku zwierząt przyczyni się do minimalizowania strat ekonomicznych powodowanych przez EIV.

### Piśmiennictwo

- Cullinane A., Newton J.R.: Equine influenza – a global perspective. *Vet. Microbiol.* 2013, **167**, 205–214.
- Palese P., Shaw M.L.: Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. W: David M. Knipe and Peter Howley (edit): *Fields virology*. Lippincott W. & Wilkins, Philadelphia 2007, 1647–1689.
- Resa-Infante P., Jorba N., Coloma R., Ortin J.: The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* 2011, **8**, 207–215.
- Lu L., Lycett S.J., Leigh Brown A.J.: Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evol. Biol.* 2014, **14**, 16.
- Young K.M., Lunn D.P.: Immunodiagnostic testing in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2000, **16**, 79–103.
- Markowska-Daniel I.: Zasady wyboru testów laboratoryjnych do diagnostyki chorób zakaźnych świń. *Weterynaria w terenie* 2011, **5**, 1, 14–19.
- Anon.: Equine influenza. W: *OIE Terrestrial Manual*, Paryż, Francja, 2016, 1–16.
- Adeyefa C.A.O., Quayle K., McCauley J.W.: A rapid method for the analysis of influenza virus genes: application to the reassortment of equine influenza virus genes. *Virus Res.* 1994, **32**, 391–399.
- Oxburgh L., Hagström A.: A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. *Vet. Microbiol.* 1999, **67**, 161–174.
- Quinlivan M., Cullinane A., Nelly M., Van Maanen K., Helden J., Arkins S.: Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 759–763.
- Quinlivan M., Dempsey E., Ryan F., Arkins S., Cullinane A.: Real-Time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 5055–5057.
- Lu Z., Chambers T.M., Boliar S., Branscum A.J., Sturgill T.L., Timoney P.J., Reedy S.E., Tudor L.R., Dubovi E.J., Vickers M.L., Sells S., Balasuiya U.B.: Development and evaluation of one-step TaqMan real time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix, and hemagglutinin genes of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 2009, **47**, 3907–3913.
- Aeschbacher S., Santschi E., Gerber V., Stalder H.P., Zanoni R.G.: Development of a real-time RT-PCR for detection of equine influenza virus. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2015, **157**, 191–201.
- Myers C., Wilson W.D.: Equine influenza virus. *Clinical techniques in equine practice* 2006, **5**, 187–196.
- Kinsley R., Scott S.D., Daly J.M.: Controlling equine influenza: Traditional to next generation serological assays. *Vet. Microbiol.* 2016, **187**, 15–20.
- Woodward A.L., Rash A.S., Blinman D., Bowman S., Chambers T.M., Daly J.M., Damiani A., Joseph S., Lewis N., McCauley J.W., Medcalf L., Mumford J., Newton J.R., Tiwari A., Bryant N.A., Elton D.M.: Development of a surveillance

scheme for equine influenza in the UK and characterization of viruses isolated in Europe, Dubai and the USA from 2010–2012. *Vet. Microbiol.* 2014, **169**, 113–127.

- Bryant N.A., Rash A.S., Woodward A.L., Medcalf E., Helweg M., Wohlfender F., Cruz F., Herrmann C., Borchers K., Tiwari A., Chambers T.M., Newton J.R., Mumford J.A., Elton D.M.: Isolation and characterization of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. *Vet. Microbiol.* 2011, **147**, 19–27.
- Mumford J.A., Wood J.: Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 1992, **79**, 137–146.
- European medicines Agency. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP). Guideline on data requirements for changes to the strain composition of authorized equine influenza vaccines in line with OIE recommendations. 2014, 7.
- Olusa T.A.O., Adeyefa C.A.O.: Serosurveillance of equine H3 influenza virus in horses in Ibadan, Nigeria. *Trop. Vet.* 2009, **27**, 15–19.
- Aharonson-Raz K., Davidson I., Porat Y., Altory A., Klement E., Steinman A.: Seroprevalence and rate of infection of equine influenza virus (H3N8 and H7N7) and equine herpesvirus (1 and 4) in the horse population in Israel. *J. Equine Vet. Sci.* 2014, **34**, 828–832.
- Morley P.S., Hanson L.K., Bogdan J.R., Townsend H.G.G., Appleton J.A., Haines D.M.: The relationship between single radial hemolysis, haemagglutination inhibition, and virus neutralization assays used to detect antibodies specific for equine influenza viruses. *Vet. Microbiol.* 1995, **45**, 81–92.
- Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P.: Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccine. *Scan. J. Immunol.* 2004, **59**, 1–15.
- Van Maanen C., Bruin G., de Boer-Luijtz E., Smolders G., de Boer G.F.: Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet. Q.* 1992, **14**, 13–17.
- Boliar S., Stanislawek W., Chambers T.M.: Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine H7N7 influenza virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006, **18**, 264–267.
- Daly J., Daas A., Behr-Gross M.E.: Collaborative study for the establishment of a candidate equine influenza subtype 2 American-like strain A/EQ/South Africa/4/03 – horse antiserum biological reference preparation. *Pharmazie* 2007, **1**, 7–14.
- Schield G.C., Pereira M.S., Chakraverty P.: Single-radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Bull. WHO* 1975, **52**, 43–50.
- Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J.: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev. Vet. Med.* 2000, **46**, 129–141.
- Gildea S., Fitzpatrick D.A., Cullinane A.: Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010–2012). *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2013, **7**, 61–72.
- Wood J.M., Montomoli E., Newman R.W., Daas A., Buchheit K.H., Terao E.: Collaborative study on influenza vaccine clinical trial serology – part 2: reproducibility study. *Pharmazie* 2011, **36**, 54–54.
- Ji Y., Guo W., Zhao L., Li H., Lu G., Wang Z., Wang G., Liu C., Xiang W.: Development of an antigen-capture ELISA for the detection of equine influenza virus nucleoprotein. *J. Virol. Methods* 2011, **175**, 120–124.
- Galvin P., Gildea S., Nelly M., Quinlivan M., Arkins S., Walsh C., Cullinane A.: The evaluation of three diagnostic tests for the detection of equine influenza nucleoprotein in nasal swabs. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2014, **8**, 376–383.
- Kirkland P.D., Delbridge G.: Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies. *Aust. Vet. J.* 2011, **89**, 45–46.
- Han T., Marasco W.A.: Structural basis of influenza virus neutralization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011, **1217**, 178–190.
- Yamanaka T., Cullinane A., Gildea S., Bannai H., Nemoto M., Tsujimura K., Kondo T., Matsumura T.: The potential impact of a single amino-acid substitution on the efficacy of equine influenza vaccines. *Equine Vet. J.* 2014, **47**, 456–462.
- Ozaki H., Shimizu-Nei A., Sugita S., Sugiura T., Imagawa H., Kida H.: Antigenic variation among equine H3N8 influenza virus hemagglutinins. *J. Vet. Res.* 2001, **48**, 177–186.
- Khurelbaatar N., Krueger W.S., Heil G.L., Darmaa B., Ulzii-maa D., Tserenrorov D., Batteredne A., Anderson B.D., Gray G.C.: Little evidence of avian or equine influenza virus infection among a cohort of Mongolian adults with animal exposure, 2010–2011. *Plos One* 2014, **9**, e85616.

Prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel,  
e-mail: iwona\_markowska\_daniel@sggw.pl

## Automat biochemiczny MINDRAY BS-120



## Automat hematologiczny 3-diff MINDRAY BC-2800vet



## Najnowszy automat hematologiczny 5-diff MINDRAY BC-5000vet



(cytometria przepływowa + laser)

**STAMAR**®

Autoryzowany  
i wyłączny dystrybutor sprzętów  
firmy **mindray**  
do laboratorium weterynaryjnego

Tel.: 601 845 055 (Marek)  
726 300 777 (Dominika)