

# Diagnostyka serologiczna grypy ptaków

Anna Pikuła, Krzysztof Śmietanka, Zenon Minta

z Zakładu Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach

Wirusy grypy ptaków (avian influenza virus – AIV) należą do rodziny Orthomyxoviridae rodzaju *Influenzavirus A*. Na podstawie białek powierzchniowych wirionu – hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA) wirusy grypy typu A zostały podzielone na podtypy. Dotychczas zidentyfikowano 16 podtypów hemaglutyniny (H1-H16) oraz 9 podtypów neuraminidazy (N1-N9; 1, 2). Wszystkie 16 podtypów HA wirusów grypy wyizolowano od ptaków blaszkodziobych (Anseriformes), głównie kaczek, oraz niektórych przedstawicieli rzędu siewkowych (Charadriiformes), a ptaki obydwu tych grup systematycznych uważa się za naturalny rezerwuuar wirusa w przyrodzie (3).

Genom wirusa grypy złożony z jednociowego RNA koduje co najmniej 10 białek, które można podzielić na 3 grupy: powierzchniowe, wewnętrzne i niestrukturalne (4). Część cząsteczki wirusa grypy posiada trzy białka powierzchniowe: hemaglutyninę (HA), neuraminidazę (NA) oraz białko matriks M2. Białka wewnętrzne stanowią: PA, PB1, PB2 (białka polimerazy) oraz nukleokapsyd (NP) i matriks M1, natomiast białka niestrukturalne to NS1 i NS2. Białka powierzchniowe jako jedyne zdolne są do indukcji przeciwciał neutralizujących i tym samym zapewniają ochronę w przypadku zakażenia. W wyniku odpowiedzi immunologicznej może również dochodzić do powstawania przeciwciał przeciwko białkom wewnętrznym, zwłaszcza NP i M1. Oba białka charakteryzują się wysoką konserwatywnością sekwencji aminokwasowych i są charakterystyczne dla wszystkich wirusów grypy typu A (5).

Zakażenia u ptaków wolno żyjących przebiegają głównie bezobjawowo

w postaci grypy ptaków o niskiej patogenności (low pathogenic avian influenza – LPAI). Natomiast u zakażonego drobiu, w następstwie zaistnienia wielu nie do końca wyjaśnionych procesów, niektóre wirusy należące do podtypów H5 i H7 zwiększają swoją zjadliwość i wywołują wysoce patogenną postać choroby (highly pathogenic avian influenza – HPAI; 2)

Wirus grypy ptaków wywołuje wiele różnych objawów chorobowych, ale żaden z nich nie jest charakterystyczny. Z tego powodu ostateczne rozpoznanie zakażenia opiera się na izolacji i identyfikacji wirusa metodami laboratoryjnymi. Obecnie Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) zaleca izolację na wirusa zależonych zarodkach kurzych SPE, a następnie jego identyfikację przy użyciu testów immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID) lub AC-ELISA bądź metod umożliwiających identyfikację podtypu HA (test hamowania hemaglutynacji – HI) oraz podtypu NA (test hamowania neuraminidazy – NI; 6). Należy podkreślić, że wymogi stawiane krajowym laboratoriom referencyjnym diagnostyki grypy ptaków obejmują zdolność do identyfikacji dwóch najgroźniejszych dla drobiu podtypów wirusa – H5 i H7 (7).

Metody stosowane w serologicznej diagnostyce grypy ptaków umożliwiają wykrycie przeciwciał dla wszystkich wirusów typu A (test immunodyfuzji w żelu agarowym i ELISA), jak również pozwalają na różnicowanie podtypów hemaglutyniny (test hamowania hemaglutynacji) i neuraminidazy (test hamowania neuraminidazy). Charakterystyka tych metod jest tematem tego artykułu.

## Serological diagnosis of avian influenza

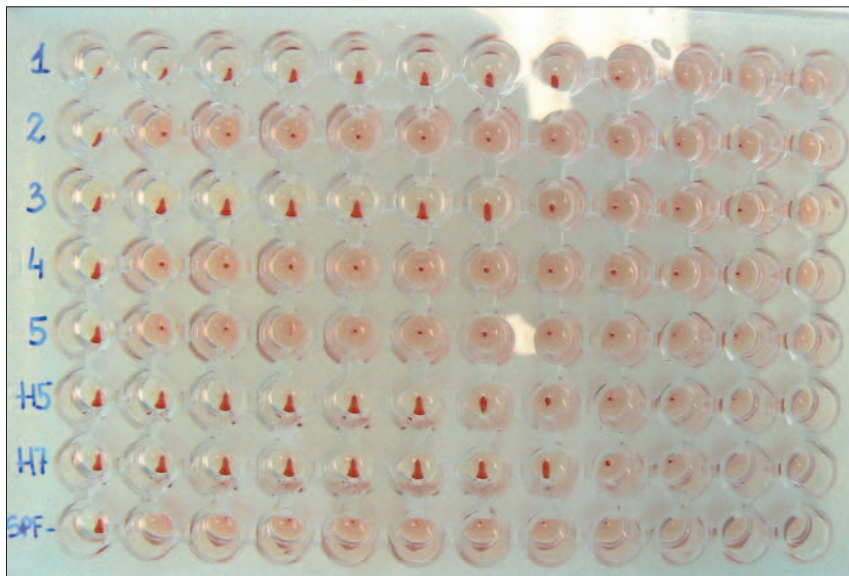
Pikuła A., Śmietanka K., Minta Z., Department of Poultry Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy

All avian influenza viruses (AIV) belong to the type A influenza viruses. Basing on the haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) surface antigens they can be divided into 16 subtypes HA and 9 subtypes NA that form different combinations. This article describes serological assays used in the diagnosis of avian influenza: agar gel immunodiffusion test (AGID), indirect and competitive ELISA, haemagglutination-inhibition test (HI) and neuraminidase-inhibition test (NI). AGID and indirect (i) ELISA tests detect type A group-specific antibodies. AGID test is cheap but time consuming and less sensitive than iELISA. On the other hand, the major limitation of most iELISA kits is that they use host-specific conjugates and can only be applied for chicken and turkey sera. Recently several commercial competitive (c) ELISA kits that detect antibodies against the AIV nucleoprotein have become available and the major advantage is that they can detect antibodies in different species of birds. Although several cELISA for specific detection of antibodies against HA (mostly H5 and H7), have been developed in various laboratories, the differentiation of HA subtypes is usually performed by means of haemagglutination inhibition test (HI). The major drawback of HI test is the limited specificity resulting from the interference of NA subtype as well as the presence of non-specific haemagglutination inhibitors in tested sera. The NI test allows for differentiation of NA subtypes but is rarely used in practice.

**Keywords:** avian influenza, serological diagnosis, AGID, ELISA, HI.

## Test immunodyfuzji w żelu agarowym – AGID

Metoda AGID (agar gel immunodiffusion test) polega na dyfuzji antygenu i przeciwciał z przeciwegłych studzienek w półstałym podłożu agarowym. Na granicy



**Ryc. 1.** Wynik testu hamowania hemaglutynacji (HI); 1-5 – surowice badane, wynik dodatni dla podtypu H5 w surowicach 1 i 3, a w pozostałych wynik ujemny; H5 i H7 – surowice kontrolne dodatnie dla podtypów H5 i H7 AIV; SPF – surowica kontrolna ujemna

zestknięcia obu reagentów następuje precypitacja, którą można obserwować w postaci jednej lub kilku linii (8). Przeciwciała wykrywane przez ten test skierowane są przeciwko białkom NP i M, wspólnym dla wszystkich wirusów grypy typu A.

Używane do badania odczynniki (antygeny i surowica kontrolna) są dostępne na rynku komercyjnym. Alternatywnie antygen można pozyskać w laboratorium z błon kosmówkowo-omocznionych 10-dniowych zarodków kurzych SPF, zakażonych odpowiednim szczepem wirusa grypy ptaków.

Test immunodyszufy w żelu agarowym charakteryzuje się wieloma zaletami: jest tani, łatwy w wykonaniu i nie wymaga specjalistycznej aparatury pomocniczej. Główną wadą tej metody jest dość niska czułość w porównaniu z testami ELISA i HI (9, 10), szczególnie w odniesieniu do surowic pochodzących od drobiu wodnego (kaczki, gęsi), co jest spowodowane niewielkim wytwarzaniem przeciwciał precypitujących u tych gatunków ptaków (9, 11, 12, 13). W związku z tym AGID stosuje się głównie do diagnostyki serologicznej u drobiu grzebiącego – kury, indyki (4, 6, 14). Ponadto wynik dodatni dowodzi jedynie zakażenia wirusem grypy typu A, nie wskazując na podtyp hemaglutyniny. Konieczne są więc w takim przypadku dodatkowe badania w celu wykluczenia najgroźniejszych podtypów H5 i H7 wirusa AI. Jako metoda jakościowa AGID nie znajduje zastosowania do ilościowego oznaczania przeciwciał.

### Test immunoenzymatyczny – ELISA

Test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jest obecnie jednym

z najczęściej stosowanych w diagnostyce serologicznej zakażeń wirusami u drobiu. Do oceny występowania zakażeń wirusami grypy ptaków zastosowanie znalazły głównie dwa różne warianty tej metody – test pośredni (indirect ELISA – iELISA) oraz test konkurencyjny (competitive ELISA – cELISA).

Test iELISA wykonuje się na płytkach polistyrenowych, które stanowią podłoże wiążące dla antygeny (tzw. faza stała). Badane rozcieńczone surowice nanosi się na opłaszczoną antygenem płytkę, które następnie inkubuje się w temperaturze pokojowej lub w 37°C. Na tym etapie, w przypadku badania próbek zawierających przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi grypy ptaków (tzw. pierwsze przeciwciała wychwytyjące), następuje ich połączenie z antygenem. Po inkubacji surowicy płytka jest płukana w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał. Następnie dodawany jest koniugat zawierający przeciwciała (tzw. drugie przeciwciała detekcyjne) znakowane enzymem – fosfatazą zasadową lub peroksydazą chrzanową, które swoiście rozpoznają fragment Fc pierwszego przeciwciała (15). Po kolejnym płukaniu płytka jest inkubowana z substratem, którego kontakt z enzymem manifestuje się reakcją barwną. Natężenie barwy zależy bezpośrednio od ilości oznaczanych przeciwciał i jest mierzone przy użyciu metod spektrofotometrycznych.

Metoda cELISA różni się od metody pośredniej rodzajem użytych przeciwciał detekcyjnych. Koniugat w iELISA zawiera gatunkowo swoiste przeciwciała, natomiast cELISA nie wymaga użycia takich przeciwciał i dzięki temu metoda ta może być stosowana w diagnostyce serologicznej grypy ptaków u różnych gatunków ptaków

(13, 15, 17). W metodzie konkurencyjnej na fazę stałą nanoszona jest jednocześnie surowica badana i koniugat zawierający przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi, który został użyty do opłaszczania płytki (zwykle jest to białko rekombinowane NP, uzyskiwane drogą ekspresji, np. w bakulowirusowym systemie ekspresyjnym). Dochodzi wówczas do współzawodniczenia o miejsca wiążące antygeny pomiędzy przeciwciałami z badanej surowicy i koniugatu. Ilość immunoglobulin detekcyjnych związanych przez antygen jest odwrotnie proporcjonalna do ilości zaadsorbowanych przeciwciał wychwytyjących. W związku z tym obecność przeciwciał swoistych dla wirusa grypy ptaków w badanej surowicy manifestuje się słabszą reakcją kolorymetryczną po dodaniu substratu, odwrotnie niż w przypadku iELISA.

Test ELISA charakteryzuje się dużą czułością i specyficznością oraz pozwala w krótkim czasie (2–3 godz.) przebadać dużą liczbę surowic. Główną wadą metody ELISA, podobnie jak AGID, jest brak możliwości określenia podtypu HA wirusa, który wywołał zakażenie. Jest to szczególnie ważne w przypadku infekcji potencjalnie najbardziej niebezpiecznymi podtypami H5 i H7. Co prawda, w ostatnich latach opracowano testy konkurencyjne do wykrywania przeciwciał swoistych dla podtypu H5 i H7 u różnych gatunków ptaków, jednak do chwili obecnej żaden z zestawów nie uzyskał rekomendacji OIE (6). Dlatego surowica wykazująca wynik dodatni w teście ELISA powinna być przebadana ponownie przy użyciu metody umożliwiającej wykrywanie przeciwciał dla podtypów hemaglutyniny, np. testem hamowania hemaglutynacji (HI).

### Test hamowania hemaglutynacji – HI

Test hamowania hemaglutynacji (hemagglutination-inhibition test) wykorzystuje właściwości aglutynacyjne wirusów grypy wobec krwinek czerwonych ptaków, za co odpowiada glikoproteina powierzchniowa – hemaglutynina (HA). Jeśli w badanej surowicy znajdują się przeciwciała dla danego podtypu HA, wówczas wiążą się z nią swoiście blokując jej zdolności hemaglutynacyjne, a dodanie zawiesiny krwinek kurzych do powstałego kompleksu antygen-przeciwciała powoduje ich opadanie na dno mikropłytki. Z kolei brak przeciwciał w surowicy sprawia, iż dodanie krwinek kurzych prowadzi do ich hemaglutynacji, co manifestuje się jednolitym zabarwieniem roztworu w dołku mikropłytki (ryc. 1). Podobnie jak ELISA, test HI jest metodą ilościową.

Test hamowania hemaglutynacji charakteryzuje się wysoką czułością. Ponadto dużym atutem tej metody jest możliwość

badania surowic różnych gatunków ptaków, z zastrzeżeniami przedstawionymi poniżej. Z praktycznego punktu widzenia test HI jest relatywnie kosztowny kiedy stosuje się go do badań mających na celu wykrycie przeciwciał dla wszystkich 16 podtypów HA, dlatego w praktyce jego użycie ogranicza się do wykrywania przeciwciał dla podtypów H5 i H7. Jest to metoda charakteryzująca się szybkością wykonania, gdyż wyniki uzyskuje się po około 2–3 godzinach (8).

Wadą metody hamowania hemaglutynacji jest jej niezbyt wysoka specyficzność, zależna od pokrewieństwa antygenowego pomiędzy wirusem użytym w teście a występującym w wirusie terenowym, który wywołał zakażenie. Wirus często ulega mutacji w obrębie genu kodującego hemaglutyninę, co w efekcie prowadzi do dużego stopnia zróżnicowania antygenowego. Ponadto surowice pochodzące od innych gatunków niż kury mogą wykazywać nieswoiste właściwości hemaglutynacyjne, prowadzące do uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Swoistość testu zależy również od podtypu neuraminidazy znajdującej się w wirusie. Dlatego w serologicznych badaniach przeglądowych w kierunku zakażeń wirusami grypy ptaków podtypów H5 i H7 u drobiu stosuje się po 2 antygeny zawierające ten sam podtyp hemaglutyniny, natomiast różne podtypy neuraminidazy, w celu eliminacji reakcji krzyżowych (18). Dodatkowo odczyt wyników odbywa się poprzez wizualną ocenę dokonywaną przez osobę wykonującą badanie, co wprowadza pewien element subiektywizmu.

### Test hamowania neuraminidazy (NI)

Neuraminidaza (NA), podobnie jak hemaglutynina, jest glikoproteiną występującą na otoczce wirusa grypy. Neuraminidaza jest enzymem o właściwościach glikohydrolazy, który odcina terminalne kwasy sialowe od receptorów powierzchniowych, co bezpośrednio umożliwia namnożonym wirionom uwolnienie się z zakażonej komórki (4). Test hamowania neuraminidazy

(neuraminidase inhibition – NI) polega na identyfikacji przeciwciał dla określonego podtypu neuraminidazy w badanej próbce surowicy przy użyciu znanych standardowych antygenów dla wszystkich 9 podtypów neuraminidazy. Może również służyć do identyfikacji podtypu neuraminidazy w nieznanym izolacie wirusowym – wówczas stosuje się zestaw 9 referencyjnych surowic. Test hamowania neuraminidazy jest dość skomplikowaną i drogą metodą, a wynik nie zawsze uzyskuje się w ciągu jednego dnia roboczego. Test NI nie jest jednak niezbędnym narzędziem diagnostycznym, gdyż obowiązujące przepisy zwalczania dotyczą tylko wirusów o określonym podtypie hemaglutyniny (H5 i H7), a podtyp neuraminidazy nie ma większego znaczenia (19).

### Zastosowanie metod serologicznych w programach nadzoru nad grypą ptaków

W latach 2003–2004 epidemia wywołana przez wysoce patogenny wirus grypy ptaków podtypu H5N1 objęła znaczny obszar Azji Południowo-Wschodniej, a w latach 2005–2006 wirus pojawił się w Afryce i Europie, powodując duże straty w chowie drobiu oraz liczne przypadki zakażeń ptaków dzikich (20). W konsekwencji tych wydarzeń bardzo ważne było usprawnienie programów monitorowania zakażeń wirusami grypy ptaków w celach prewencyjnych i kontrolnych. Diagnostyka serologiczna doskonale sprawdza się w programach nadzoru. Kraje członkowskie Unii Europejskiej, zgodnie z dyrektywą 2005/94/WE, prowadzą nadzór nad grypą ptaków u drobiu, a zasady określające sposób postępowania diagnostycznego określa załącznik nr 3 rozporządzenia Rady Ministrów z 23 marca 2011 r. (18). W wyznaczonych stadach drobiu pobiera się 5 (strusie), 10 (kury, indyki i ptaki łowne) oraz 40 (kaczki i gęsi) próbek krwi. W laboratorium surowice badane są testem hamowania hemaglutynacji przy użyciu antygenów H5N3 oraz H7N7.

W przypadku wyników dodatnich dla antygenu H5N3 przeprowadza się badanie potwierdzające, stosując antygen H5N1, a gdy surowice reagują pozytywnie z antygenem H7N7, bada się je ponownie używając antygeny H7N1. Dopiero wynik dodatni badania z obydwoma antygenami H5 lub H7 upoważnia do stwierdzenia, że próbka surowicy rzeczywiście zawiera przeciwciała dla danego podtypu hemaglutyniny. Należy podkreślić, iż, zgodnie z rozporządzeniem Rady Ministrów, głównym celem programu nadzoru nad grypą u drobiu jest wykrycie bezobjawowych zakażeń wirusami AI podtypów H5 i H7 o niskiej patogenności w kontekście potencjalnej możliwości ich mutacji w formę wysoce patogenną. Program nadzoru nie powinien być więc mylony z badaniem stad podejrzanych o zakażenie HPAI czy LPAI, w których występujące objawy chorobowe sugerują grype i gdzie diagnostyka serologiczna pełni tylko uzupełniającą rolę w stosunku do badań wirusologicznych.

### Podsumowanie

Wykrywanie przeciwciał przeciwko wirusowi grypy ptaków w programach nadzoru ma ogromne znaczenie w zwalczaniu choroby. Laboratoria serologiczne w zależności od celu przeprowadzonych badań mogą zastosować różne metody diagnostyczne. Na wybór metody ma wpływ specyfika poszczególnych testów i ich przydatność do zamierzonego zastosowania (tab. 1). Należy również brać pod uwagę znaczne różnice w odpowiedzi immunologicznej u różnych gatunków ptaków. Metody AGID i ELISA wykrywają przeciwciała skierowane przeciwko wszystkim podtypom wirusów grypy A i dlatego są stosowane jako wstępne narzędzie przesiewowe. Testy HI i NI są swoiste dla epitopów hemaglutyniny i neuraminidazy, dlatego używane są do identyfikacji podtypów AIV i/lub w celu potwierdzenia wyników pozytywnych uzyskanych w testach AGID i ELISA, w przypadku gdy znany jest podtyp patogenu.

Tabela 1. Porównanie różnych metod serologicznej diagnostyki grypy ptaków

Lp.	Rodzaj testu	AGID	ELISA		HI	NI
			IELISA	cELISA		
1	Zastosowanie	wykrywanie przeciwciał przeciwko wirusom typu A (antygeny M/NP)	wykrywanie przeciwciał przeciwko wirusom typu A (antygeny M/NP)	wykrywanie przeciwciał przeciwko wirusom typu A (antygeny NP)	wykrywanie przeciwciał przeciwko podtypom hemaglutyniny (w praktyce H5 i H7)	wykrywanie przeciwciał przeciwko podtypom neuraminidazy (N1-N9)
2	Swoistość gatunkowa	drób grzebiący (kury, indyki)	drób grzebiący (kury, indyki)	różne gatunki ptaków	różne gatunki ptaków	różne gatunki ptaków
3	Czas wykonania	24–48 h	2–3 h	2–3 h	co najmniej kilka godzin	co najmniej kilka godzin
4	Czułość	średnia	wysoka	wysoka	wysoka	średnia
5	Swoistość antygenowa	wysoka	wysoka	wysoka	średnia	średnia

Badania serologiczne stanowią ważny element diagnostyki zakażeń wirusami grypy ptaków, niemniej jednak podstawą rozpoznania grypy ptaków jest dodatni wynik badań wirusologicznych i molekularnych (metoda RT-PCR).

## Piśmiennictwo

1. Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D.: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 2005, **79**, 2814-2822.
2. Swayne D. E., Suarez D. L.: Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 2000, **19**, 463-482.
3. Webster R.G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992, **56**, 152-179.
4. Suarez D. L.: Influenza A virus. W: Swayne D. E. (edit.): *Avian Influenza 2008*, Blackwell Publishing, s. 3-22.
5. Suarez D. L., Schultz-Cherry S.: Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 2000, **24**, 269-283.
6. Anon: OIE: [http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf), 2009
7. Commission Decision of 4 August 2006 approving a Diagnostic Manual for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC. *Off. J. Eur. Union* **L 237**, 1-27.
8. Swayne D. E., Glisson J. R., Jackwood M. W., Pearson J. E., Reed W. M. (edit.): *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4<sup>th</sup> ed., American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, Kennett Square, PA, 1998.
9. Slemmons R. D., Easterday B. C.: Host response differences among five avian species to an influenza virus A/turkey/Ontario/7732/66 (Hav5N?). *Bull. WHO* 1972, **47**, 521-525.
10. Snyder D. B., Marquardt W. W., Yancey F. S., Savage P. K.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus. *Avian Dis.* 1985, **29**, 136-144.
11. Cattoli G., Capua I.: Diagnosing avian influenza in the framework of wildlife surveillance efforts and environmental samples. *J. Wildl. Dis.* 2007, **43** (supplement), 35-39.
12. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L., Swayne D. E. (edit.): *Diseases of Poultry*. 12<sup>th</sup> ed., Blackwell Publishing, Ames, IA 2008.
13. Starick E., Werner O., Schirmer H., Kollner B., Rieber R., Mundt E.: Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 2006, **53**, 370-375.
14. Brown J. D., Stallknecht D. E., Berghaus R. D., Luttrell M. D., Velek K., Kistler W., Costa T., Yabsley M. J., Swayne D.: Evaluation of a commercial blocking enzyme-linked immunosorbent assay to detect avian influenza virus antibodies in multiple experimentally infected avian species. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, **16**, 824-829.
15. Kątnik-Prastowska I. (red.): *Immunochemia w biologii medycznej. Metody laboratoryjne*. PWN, Warszawa, 2009.
16. Shafer A. L., Katz J. B., Eernisse K. A.: Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis.* 1998, **42**, 28-34.
17. Zhou E. M., Chan M., Heckert R.A., Riva J., Cantin M. F.: Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. *Avian Dis.* 1998, **42**, 517-522.
18. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 23 marca 2011 r. w sprawie wprowadzenia na 2011 r. programów zwalczania wścieklizny i gąbczastej encefalopatii bydła oraz programu mającego na celu wykrycie występowania zakażeń wirusami wywołującymi grypy ptaków oraz poszerzenie wiedzy na temat ryzyka wystąpienia tej choroby. Dz.U. 2011, nr 82, poz. 452.
19. Dyrektywa Rady 2005/94/WE z dnia 20 grudnia 2005 r. w sprawie wspólnotowych środków zwalczania grypy ptaków i uchylająca dyrektywę 92/40/EWG. Dz.U. L 10 z 14.1.2006, 1-64.
20. Sims L.D., Brown I.H.: Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996-2007). W: Swayne D.E. (edit.): *Avian Influenza 2008*. Blackwell Publishing, s. 251-286.