

## NEPOUZDANOST KOMERCIJALNOG ELISA KOMPLETA ZA SEROLOŠKI MONITORING INFLUENCE PTICA

### UNRELIABILITY OF A COMMERCIAL ELISA KIT FOR SEROLOGIC MONITORING OF AVIAN INFLUENZA

Vladimir Savić\*, Mirta Balenović

Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb

#### Summary

Three-hundred-and-forty-two serum samples from backyard chickens as well as 184 serum samples from farm turkeys, taken in the period from December 27<sup>th</sup> 2004 to September 9<sup>th</sup> 2005, were tested using commercial ELISA kit for avian influenza antibodies. It was found 45.6% positive chicken sera and only 0.5% positive turkey sera. Sera that were suspicious or positive in the ELISA were subjected to AGP test for avian influenza antibodies. All samples gave negative result when used AGP test. Specificity assessment of the commercial ELISA kit gave positive results even with monovalent standard antisera for Newcastle disease and CELO virus, whereas antisera for PMV-2 and PMV-3 gave suspicious result. Therefore, the commercial kit should be considered as unreliable for serologic monitoring of avian influenza in poultry. In regards to prevalence of highly pathogenic avian influenza in the world as well as animal and human health hazard posed by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus, use of a commercial kit without confirmation with standard serological methods may lead to wrong conclusions with enormous consequences.

**Key words:** Avian influenza; Monitoring; ELISA

\* Adresa za dopisivanje: dr. sc. Vladimir Savić, Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Tel.: +385 1 2441 392, Fax: +385 1 2441 396, E-mail: savic@attglobal.net

## UVOD

Svi virusi influence ptica (IP), odnosno ptičje gripe, pripadaju rodu *Influenzavirus A* porodice *Orthomyxoviridae*. Virusi influence A razvrstani su u podtipove prema anti-genskim razlikama hemaglutinina (H1 do H16) i neuraminidaze (N1 do N9), a iz ptica su izdvojeni u gotovo svim mogućim kombinacijama [1,2]. Temeljem svoje patogenosti, virusi IP mogu se razvrstati u dvije skupine. Visokopatogeni virusi uzrokuju «kugu peradi» koju danas nazivamo visokopatogena influenza ptica (VPIP), a infekcija ovim virusima u jatima kokoši i purana izazove i do 100% uginuća. Visokopatogeni virusi pripadaju isključivo H5 i H7 podskupinama, no nisu svi virusi iz ove dvije podskupine nužno i visokopatogeni. Ostali virusi uzrokuju niskopatogenu influencu ptica (NPIP), tj. blažu bolest koja se očituje blagim dišnim simptomima, depresijom i problemima u proizvodnji jaja. U nepovoljnim uvjetima okoliša ili u slučaju sekundarnih infekcija, NPIP može rezultirati daleko ozbiljnijim simptomima [3]. Sojevi H5 i H7 podtipova koji na mjestu cijepanja hemaglutinina imaju višestruko zastupljene bazične aminokiseline, a uzrokuju niski mortalitet u pokusnim infekcijama, također su svrstani u visokopato-gene viruse jer im je za porast virulencije dovoljna jedna mutacija. Štoviše, čini se da svi niskopatogeni sojevi H5 i H7 podtipova mogu lako postati visokopatogeni nakon svega nekoliko mutacija koje će za posljedicu imati višestruko zastupljene bazične ami-nokiseline na mjestu cijepanja hemaglutinina [4]. Kruženje ovakvih virusa u jatima peradi stoga predstavlja veliku opasnost budući da isto za posljedicu može imati pojavu VPIP. Nekoliko je primjera u kojima je dokazano da su pojave VPIP nastale kao posljed-ica kruženja NPIP u domaće peradi u SAD-u, [5] Meksiku, [6] Italiji [7] i Čileu [8]. Izdva-janje i tipizacija virusa daje najbolji uvid u patogenost i antigena svojstva virusa, no serološkim monitoringom se može pretražiti veliki broj uzoraka u kratkom razdoblju te tako dobiti uvid u proširenost IP u domaće peradi. Serološkim monirotingom se nađu pozitivna jata domaće peradi unatoč odsutnosti ikakvih simptoma, [9] a nakon prošire-nog istraživanja iz seropozitivne peradi se izdvoje i niskopatogeni virusi IP. [10] Protu-tijela za virus influence moguće je dokazati imunodifuzijom u gelu (IDG), ELISA te-stom, inhibicijom hemaglutinacije i inhibicijom neuraminidaze, no potonje dvije me-tode se koriste prvenstveno za određivanje podtipa ili za ciljani monitoring prema određenom podtipu virusa IP. ELISA se pokazala kao praktična metoda u serološkom monitoringu IP te su je koristili brojni autori, a moguće ju je oblikovati i za razlikovanje cijepljenih od inficiranih životinja [11,12].

U Hrvatskoj nije zabilježena pojava IP niti je sustavno pretraživana domaća perad. S obzirom na pojavu ove bolesti u velikom broju zemalja i njezin zoonotski potencijal, ukazala se potreba za serološkim monitoringom peradi u našoj zemlji. U tom cilju komer-cijalnim ELISA testom su pretražene kokoši iz ekstenzivnih uzgoja i farmški držani purani, a pozitivni serumi su naknadno pretraženi i IDG testom.

## MATERIJALI I METODE

### Serumi

Pretraženo je 526 uzoraka seruma od kojih 342 uzorka iz ekstenzivnih uzgoja kokoši iz sjeverne Hrvatske (Krapinsko-Zagorska, Sisačko-Moslavačka, Karlovačka, Varaždinska, Koprivničko-Križevačka, Požeško-Slavonska i Osječko-Baranjska županija) i 184 uzorka iz intenzivnih uzgoja purana s područja Slavonsko-Brodske županije. Uzorci su uzeti u razdoblju od 27. prosinca 2004. do 9. rujna 2005. od odraslih kokoši različite dobi i purana u dobi od 15 i 30 tjedana.

### Serološke pretrage

Svi uzorci seruma su pretraženi ELISA testom za protutijela virusa IP. Korišten je komercijalni komplet renomiranog proizvođača predviđen za pretragu seruma kokoši i purana. Test je izveden prema priloženim uputama, a rezultati su obrađeni računalnim programom predviđenim za korištenje ELISA kompleta. Uzorci koji su dali pozitivni ili sumnjivi rezultat ELISA testom, pretraženi su standardnim postupkom imunodifuzije u 1%-tnom gelu agaroze. Za pretragu je korišten antigen za virus A influence (Centar za peradarstvo, Zagreb), a kao kontrolni pozitivni serum korišten je standardni antiserum za imunodifuziju u gelu s virusom A influence (Veterinary Laboratory Agencies, Weybridge, Velika Britanija). Imunodifuzija se odvijala pri 37 °C, a rezultati su očitavani nakon 24 i 48 sati.

Specifičnost komercijalnog ELISA kompleta provjerena je kokošjim SPF serumom te standardnim antiserumima za virus IP, virus newcastleske bolesti (VNB), PMV-2, PMV-3 i CELO virus. Svi antiseumi dobiveni su imunizacijom kokoši.

## REZULTATI

Rezultati ELISA testa na protutijela virusa influence peradi u uzorcima seruma iz ekstenzivnih uzgoja kokoši i intenzivnih uzgoja purana prikazani su na tablicama 1 i 2.

Rezultati provjere specifičnosti komercijalnog ELISA kompleta za protutijela virusa influence pomoću različitih standardnih seruma su prikazani tablici 3.

Imunodifuzijom u gelu (IDG) su pretražena 262 seruma kokoši od kojih je u ELISA testu 106 reagiralo sumnjivom reakcijom, a 156 pozitivnom reakcijom. Pretraženo je i 56 seruma purana od kojih je u ELISA testu 55 reagiralo sumnjivom i 1 pozitivnom reakcijom. Svih 318 seruma je imunodifuzijom u gelu dalo negativan rezultat.

Tablica 1. Rezultati ELISA testa na protutijela virusa influence peradi u serumima ekstenzivno držanih kokoši po županijama

Table 1. Results of the ELISA test for avian influenza antibodies in backyard chickens by counties

Županija County	Negativno Negative	Sumnjivo Suspect	Pozitivno Positive	Ukupno Total
Krapinsko-Zagorska	4	6	48	58
Sisačko-Moslavačka	14	9	5	28
Karlovačka	0	3	30	33
Varaždinska	27	18	7	52
Koprivničko-Križevačka	27	37	49	113
Požeško-Slavonska	4	9	10	23
Osječko-Baranjska	4	24	7	35
Ukupno/Total	80 (23,4%)	106 (31,0%)	156 (45,6%)	342

Tablica 2. Rezultati ELISA testa na protutijela virusa influence peradi u serumima purana različitih dobi iz intenzivnih uzgoja

Table 2. Results of the ELISA test for avian influenza antibodies in turkeys of various ages by counties

Dob purana Age of turkeys	Negativno Negative	Sumnjivo Suspect	Pozitivno Positive	Ukupno Total
15 tjedana/15 weeks	89	3	0	92
30 tjedana/30 weeks	39	52	1	92
Ukupno/Total	128 (69,6%)	55 (29,9%)	1 (0,5%)	184

## RAZMATRANJE

Pretragom 342 uzorka seruma kokoši ekstenzivnih uzgoja u sjevernoj Hrvatskoj ELISA testom je nađeno 45,6% pozitivnih uzoraka, dok ih je 31,0% reagiralo sumnjivom reakcijom, a svega 23,4% ih je bilo negativno. Nasuprot tome, od 184 seruma purana iz intenzivnih uzgoja svega je jedan uzorak (0,5%) reagirao pozitivno, dok ih je 29,9% bilo sumnjivih i 69,6% negativnih u ELISA testu. Na temelju tih rezultata i činjenice da se u Hrvatskoj ne provodi cijepljenje peradi protiv IP moglo se zaključiti kako je IP proširena u ekstenzivnim uzgojima kokoši u sjevernoj Hrvatskoj. Razlozi proširenosti IP bi vjerojatno bili nedostatna biosigurnost u ovakvim uzgojima te mogućnost dodira ove peradi s divljim pticama koji su nosioci virusa IP. Simptomi nisu zamijećeni u pretraženih kokoši što je moguće protumačiti nazočnošću niskopatogenog virusa IP. Vrlo niska zastupljenost pozitivnih nalaza u intenzivnim uzgojima purana se isto tako može tumačiti odsutnošću virusa IP u ovim uzgojima, a svega jedan pozitivan od 184 uzorka može se

Tablica 3. Rezultati provjere specifičnosti komercijalnog ELISA kompleta za protutijela virusa influence peradi s različitim standardnim serumima

Table 3. Results of specificity of the commercial ELISA kit for avian influenza antibodies in poultry using various standard antisera

Antiserum (proizvođač) <i>Antiserum (producer)</i>	Titar <i>Titre</i>	Rezultat <i>Result</i>
SPF serum (Centar za peradarstvo) <i>SPF serum (Poultry Centre)</i>	1,0	Negativan <i>Negative</i>
Serum virusa influence ptica I (VLA, Weybridge) <i>Avian influenza antiserum I (VLA, Weybridge)</i>	14517,2	Pozitivan <i>Positive</i>
Serum virusa influence ptica II (VLA, Weybridge) <i>Avian influenza antiserum II (VLA, Weybridge)</i>	14509,0	Pozitivan <i>Positive</i>
Serum virusa newcastleske bolesti (VLA, Weybridge) <i>Newcastleske disease antiserum (VLA, Weybridge)</i>	4539,5	Pozitivan <i>Positive</i>
Serum virusa newcastleske bolesti I (Centar za peradarstvo) <i>Newcastleske disease antiserum I (Poultry Centre)</i>	3128,6	Sumnjiv <i>Suspect</i>
Serum virusa newcastleske bolesti II (Centar za peradarstvo) <i>Newcastleske disease antiserum II (Poultry Centre)</i>	7091,0	Pozitivan <i>Positive</i>
Serum virusa PMV-2 (VLA, Weybridge) <i>PMV-2 antiserum (VLA, Weybridge)</i>	2899,4	Sumnjiv <i>Suspect</i>
Serum virusa PMV-3 (VLA, Weybridge) <i>PMV-3 antiserum (VLA, Weybridge)</i>	2265,0	Sumnjiv <i>Suspect</i>
Serum virusa CELO (VLA, Weybridge) <i>CELO virus antiserum (VLA, Weybridge)</i>	5810,4	Pozitivan <i>Positive</i>

protumačiti laboratorijskom pogreškom. Slične rezultate su dobili i Al-Natour i Abo-Shehadab [9] koji su našli 71% seropozitivnih jata roditeljskih hibrida teških pasmina kokoši u intenzivnim uzgojima unatoč odsutnosti kliničkih znakova u pretraženih ptica, a rabili su komercijalni ELISA komplet za IP proizvođača *Kirkegaard and Perry Laboratories (KLP)* (Maryland, SAD). Naeem i suradnici [10] su koristili komercijalni komplet proizvođača *IDEXX* (Maine, SAD) za pretrag serumima pet jata: dva jata roditeljskih hibrida teških pasmina kokoši, dva jata tovnih pilića i jato konzumnih nesilica, od kojih su u tri jata zapaženi klinički simptomi. Svih pet jata je bilo seropozitivno u rasponu od 88 do 100%. Virološkom pretragom je iz ovih jata izdvojen virus IP podtipa H9N2 te su inhibicijom hemaglutinacije dokazana protutijela za H9 podtip u istim jatima. Prije no što smo donijeli zaključak kako su ekstenzivno držana jata kokoši u sjevernoj Hrvatskoj zaražena virusom IP, serumi koji su dali sumnjivi ili pozitivan rezultat ELISA testom pretraženi su i IDG testom. Kako niti jedan uzorak u IDG testu nije dao pozitivan rezul-

tat, odlučili smo provjeriti specifičnost komercijalnog kompleta raspoloživim standardnim antiserumima. Negativan rezultat koji je dobiven sa SPF serumom ukazivao je da se ne radi o lažno pozitivnim rezultatima zbog tehničke pogreške u postupku izvođenja ELISA testa. Pozitivan rezultat s heterolognim monovalentnim serumima ukazivao je na značajne križne ili nespecifične (lažne) pozitivne reakcije. Postojala je vjerojatnost da je antigen koji je korišten za izradu komercijalnog kompleta kontaminiran virusom NB, koji poput virusa IP ima svojstvo hemaglutinacije, te tako može biti «maskiran» tijekom umnožavanja virusa IP u cilju dobivanja antigena. Sva perad u Hrvatskoj je sustavno cijepljena protiv NB te su cjepna protutijela za VNB u serumima pretraživanih kokoši mogla pozitivno reagirati u ELISA testu ukoliko je antigen bio kontaminiran virusom NB. U ovakvom slučaju je upitno zašto je samo jedan serum purana (0,5%) reagirao pozitivno u ELISA testu. Zbunjuje i činjenica da je s monovalentnim serumom za CELO virus također dobiven pozitivan rezultat. Značajna razlika u razini titara protutijela dobivenih s antiserumima virusa influence i titara dobivenih s heterolognim antiserumima ukazuje na vjerojatnost da je izračun za graničnu vrijednost pozitivnog titra krivo postavljen.

Iako se sa sigurnošću ne može zaključiti koji su razlozi dobivenih lažno-pozitivnih rezultata u ELISA testu, može se zaključiti da je korišten komercijalni komplet nepouzdan u serološkom monitoringu IP u kokoši na što smo upozorili proizvođača ELISA kompleta. S obzirom na proširenost VPIP u svijetu i opasnost koju predstavlja viskopatogeni virus podtipa H5N1 za perad, ali i ljude, korištenjem komercijalnog kita bez provjere pozitivnih rezultata standardnim serološkim metodama, mogu se donositi krivi zaključci s nesagledivim posljedicama.

#### Literatura

- [1] *Alexander DJ*. A review of avian influenza. Proceedings of the European Society for Veterinary Virology (ESVV) Symposium on influenza viruses of wild and domestic animals, Ghent, 16-18 May 1999. *Vet Microbiol* 2000;74:3-13.
- [2] *Fouchier RAM, Munster V, Wallenstein A i sur*. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 2005;79:2814-22.
- [3] *Capua I, Alexander DJ*. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 2004;33:393-404.
- [4] *Swayne DE, Halvorson DA*. Influenza. U: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE, ur. *Diseases of Poultry*, 11th edn. Ames: Iowa State University Press; 2003, str. 135-60.
- [5] *Bean WJ, Kawaoka Y, Wood JM, Pearson JE, Webster RG*. Characterisation of virulent and avirulent A/Chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in Nature. *J Virol* 1985;54:151-60.

- [6] *Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Riviera-Cruz E, Perdue ML.* Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol* 1996;77:1493-504.
- [7] *Capua I, Marangon S.* The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000. *Avian Pathol* 2000;29:289-94.
- [8] *Rojas H, Moreira R, Avalos P, Capua I, Marangon S.* Avian Influenza in poultry in Chile. *Vet Rec* 2002;151:88.
- [9] *Al-Natour MQ, Abo-Shehadab MN.* Sero-prevalence of avian influenza among broiler-breeder flocks in Jordan. *Prev Vet Med* 2005;70:45-50.
- [10] *Naeem K, Naurin M, Rashid S, Bano S.* Seroprevalence of avian influenza virus and its relationship with increased mortality and decreased egg production. *Avian Pathol* 2003;32:285-89.
- [11] *Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF.* Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 2002;32:47-55.
- [12] *Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL.* Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the non-structural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 2005;43:676-83.

### Sažetak

Pretražena su 342 uzorka seruma iz ekstenzivnih uzgoja kokoši i 184 seruma iz intenzivnih uzgoja purana uzeta u razdoblju od 27. prosinca 2004. do 9. rujna 2005. komercijalnim ELISA kompletom za protutijela virusa influence ptica. Nađeno je 45,6% pozitivnih seruma kokoši i svega 0,5% pozitivnih seruma purana. Serumi koji su dali pozitivnu ili sumnjivu reakciju ELISA testom pretraženi su i imunodifuzijom u gelu na nazočnost protutijela za virus influence ptica. Svi uzorci pretraženi ovim postupkom dali su negativan rezultat. Provjerom specifičnosti komercijalnog ELISA kompleta dobivene su pozitivne reakcije i s monovalentim standardnim antiserumima za viruse newcastleske bolesti i CELO, dok su serumi za PMV-2 i PMV-3 dali sumnjivu reakciju. Stoga se može zaključiti da je korišten komercijalni komplet nepouzdan u serološkom monitoringu influence u peradi. S obzirom na proširenost visokopatogene influence ptica u svijetu i opasnost koju predstavlja visokopatogeni virus podtipa H5N1 za perad, ali i ljude, korištenjem komercijalnog kita bez provjere pozitivnih rezultata standardnim serološkim metodama mogu se donositi krivi zaključci s nesagledivim posljedicama.

**Ključne riječi:** Influenca ptica; Monitoring; ELISA

