

PALYGINAMASIS DIAGNOSTINIŲ METODŲ ĮVERTINIMAS TIRIANT VIRUSINĘ DIARĖJĄ PERSIRGUSIŲ GALVIJŲ SPECIFINĘ IMUNOLOGINĘ BŪKLĘ

Violeta Mockeliūnienė¹, Algirdas Šalomska^{1,2}, Raimundas Mockeliūnas², Vida Liutkevičienė², Ilona Aleksėjūnienė¹, Loreta Šernienė³

¹*Virusologijos skyrius, Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115, Kaišiadorys; tel. +370 615 15 233; el. paštas: violetamoc@one.lt*

²*Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; el paštas: liutkevicienne@one.lt*

³*Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; el. paštas: loretaser@lva.lt*

Santrauka. Tinkama laboratorinė diagnostika yra pagrindinė sąlyga kontroliuoti ir užkirsti kelią galvijų diarėjos virusų (GVDV) plitimui. Norėdami nustatyti serologinio tyrimo duomenų patikimumą, atlikome palyginamąjį standartinės ir modifikuotos virusų neutralizacijos (VN) bei konkurentinės imunofermentinės analizės (Ak IFA) įvertinimą.

Palyginamasis įvertinimas atliktas kiekvienu metodu išaiškinant seroteigiamus GVDV atžvilgiu galvijus. Kraujo mėginiai surinkti iš 120 įvairaus amžiaus galvijų. Ankstesni mūsų tyrimai parodė, kad tinkamiausias VN reakcijai yra NADL padermė bei MDBK persėjamoji ląstelių kultūrų linija. Suvestiniai mūsų tyrimų duomenys rodo, kad antikūnai prieš GVDV VN reakcija buvo nustatyta 63 (52,5 proc.), modifikuota VN reakcija – 54 (45 proc.), o Ak IFA – 59 (49,2 proc.) galvijams. Tyrimo duomenų skirtumas buvo nedidelis (3,3–7,5 proc.; $p>0,05$). Atskirose galvijų grupėse palyginamieji duomenys buvo labai panašūs, nepriklausomai nuo to, koks tyrimo metodas taikytas. Skirtumas rastas tik tarp atskirų gyvulių grupių, pavyzdžiui, 8–12 mėn. prieauglio ir karvių, atitinkamai 20–30,3 proc. ir 68,4–78,9 proc. Siekiant išsiaiškinti, kodėl tyrimo duomenys kraujo serumą ištyrus standartinė VN, modifikuota VN ir Ak IFA pagal Tarptautinio epizootijų biuro rekomenduojamą metodiką yra skirtingi, buvo įvertintas Ak IFA jautrumas ir specifiškumas. Nustatyta, kad konkurentinė Ak IFA yra pakankamai jautrus (91,2 proc.) ir specifiškas (95,1 proc.) metodas. Lyginant Ak IFA su modifikuota VN, kai naudojama 1000 AKID₅₀ virusinių dalelių 0,1 ml, buvo nustatytas didesnis Ak IFA jautrumas (94,7 proc.), tačiau mažesnis specifiškumas (91,7 proc.).

Raktažodžiai: galvijų virusinė diarėja, neutralizacijos reakcija, imunofermentinė analizė, jautrumas, specifiškumas.

EVALUATION OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF VIRUS NEUTRALISATION TEST AND COMPETITION ELISA FOR ANTIBODIES TO BVDV DETECTION IN CATTLE

Violeta Mockeliūnienė¹, Algirdas Šalomska^{1,2}, Raimundas Mockeliūnas², Vida Liutkevičienė², Ilona Aleksėjūnienė¹, Loreta Šernienė³

¹*Department of Virology, Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto st. 2, LT-56115, Kaišiadorys, Lithuania; phone +370 615 15 233, e-mail: violetamoc@one.lt*

²*Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės st. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania*

³*Department of Food Safety and Animal Hygiene, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės st. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania*

Summary. An effective use of diagnostic technique is the main tool for successful control and prevention of the spread of BVDV infection. In order to estimate the reliability of serological investigation data a comparative assessment of standard virus neutralisation (VN) test (50 µl of a stock of cytopathogenic NADL strain of BVDV containing 100 TCID₅₀ tissue culture infective dose), modified VN test (50 µl of a stock of cytopathogenic NADL strain of BVDV containing 1000 TCID₅₀ tissue culture infective dose) and a competition antibody enzyme-linked immunosorbent assay (Ab ELISA) were performed. For the present study one hundred twenty different age cattle were randomly selected. The results from this study indicate that a standard VN reaction revealed 52.5%, a modified VN reaction 45% and Ab ELISA 49.2% of cattle positive to BVDV. The differences were not statistically significant (3.3–7.5%, $p>0.05$). Differences were determined in different age groups, for example, in 8-12 month-old calves (20.0-30.0 % of positive) and cows (68.4-78.9 % of positive), respectively. In order to determine the differences in the data of blood serum analysis obtained by standard VN and Ab ELISA, sensitivity and specificity of competition Ab ELISA was assessed according to OIE standards. It was determined that the competition Ab ELISA is a sensitive (91.2%) and specific (95.1%) method.

Keywords: BVDV, antibodies, cattle, ELISA, sensitivity, specificity.

Įvadas. Galvijų virusinės diarėjos (GVD) patogenezė yra sudėtinga, kai kurie jos aspektai iki galo neištirti ir pasireiškia įvairaus laipsnio patologijomis – nuo besimptomės iki letalinės (Baker, 1990). Dažniausiai klinikiniai požymiai yra neryškūs ir nepastebimi arba nepakankami etiologinei diagnozei, todėl tinkama laboratorinė diagnostika yra pagrindinė sąlyga kontroliuoti ir užkirsti kelią GVDV infekcijos plitimui (Collett, 1992; Paton, 1995; Meyers, Thiel, 1996).

Žinoma, jog pestivirusai gali būti laboratorinių ląstelių kultūrų, gyvų vakcinų, skirtų žmonėms, galvijams ir kiaulėms (Harasawa, Tomiyama, 1994; Harasawa, 1995; Harasawa, Mizusawa, 1995), galvijų vaisiaus serumo (Ridpath, *et al.*, 1994) ir persėjamų ląstelių kultūrų linijų (Harasawa, 1996) kontaminantai, dėl to laboratorinėje diagnostikoje ir povakcininio imuniteto tyrimuose galimos įvairios kryžminės imunologinės reakcijos, iškraipančios rezultatų patikimumą (Moennig, 1990; Nettleton, Entrican, 1995). Norint to išvengti, labai svarbu, kad laboratorinėje praktikoje būtų naudojami virusais nekontaminuoti ir neturintys neutralizuojančių antikūnų prieš GVDV fetaliniai serumai bei kokybiškos ląstelių kultūros, kurios būtų nuolat tikrinamos (Bolin *et al.*, 1994; Nettleton, Entrican, 1995).

Laboratorinėje praktikoje taikomi įvairūs antikūnų prieš galvijų virusinės diarėjos virusus (GVDV) nustatymo metodai bei jų modifikacijos. Iki šiol GVDV serologijoje virusų neutralizacijos (VN) reakcija naudojama kaip standartinė (Sandvik, 1999). Tai specifinis ir jautrus antikūnų prieš GVDV nustatymo metodas, paremtas specifinių antikūnų gebėjimu susijungti su virusinėmis dalelėmis, dėl to blokuojamos antigeninės determinantės, atsakingos už virusų susijungimą su ląstelių receptoriais. Taip neutralizuojamas sukėlėjo biologinis aktyvumas. Vertinant VN reakciją pastebėta, kad neutralizuojančių antikūnų titrai svyruoja priklausomai nuo GVDV izoliatų įvairovės (Bolin *et al.*, 1991). Kadangi VN pasižymi aukštu specifiskumu, būtina naudoti viruso padermę, antigeniškai panašią į cirkuliuojančią tiriamoje galvijų populiacijoje. Esant neaukštiesiems antikūnų prieš GVD II genotipo virusus titrams, jie gali būti neaptikti, jeigu reakcijoje naudojama GVDV I genotipo padermė, ir atvirkščiai (Fulton *et al.*, 1997). Laboratorinėje praktikoje ir moksliniams tyrimams dažniausiai naudojamos referentinės NADL, *Singer ir Oregon 24* citopatogeninių GVDV padermės, priklausančios I genotipui (Edwards, 1990; Fulton *et al.*, 1997).

VN naudojamos įvairios galvijų ląstelės ar ląstelių linijos, taip pat antrinės galvijų inkstų, sėklidžių ląstelės arba persėjamosios ląstelių linijos iš galvijų plaučių, trachėjos, MDBK ląstelės ir kitos (Edwards *et al.*, 1991). Dėl nuolatinės ląstelių kultūrų, terpių ir referentinių virusų padermių kontrolės VN reakcija netikslinga tirti pavienius ar kelis mėginius (Sandvik, 1999). Gausiems tyrimams dažniau taikomas imunofermentinės analizės (IFA) metodas imunologiškai reaguojančioms makro molekulėms nustatyti (Bitsch, Rønsholt, 1995; Sandvik, 1999). GVDV diagnostikoje šis metodas tapo populiarius, nes nėra priklausomas nuo ląstelių kultūrų, lengvai

taikomas, rezultatai gaunami per keletą valandų, dėl to praverčia greitai vertinant bandos būklę GVDV infekcijos atžvilgiu (Niskanen *et al.*, 1989; Niskanen, 1993). Dažniausiai taikomos IFA aktyvumą stiprinančios (AA) arba aktyvumą moduluojančios (AM) sistemos (Tijssen, 1985). Tarp dažniausiai taikomų AA sistemų yra netiesioginė IFA, kurios metu antigenas fiksuojamas ant kietos fazės ir panaudojamas specifiniams antikūnams akumuliuoti. Susidaręs antigeno-antikūno kompleksas išryškintas fermentu žymėtais ir rūšiai specifiniais antiglobuliniais ir fermentinio indikatoriaus substratu. AA sistemos specifiskumas priklauso nuo virusinio antigeno gamybos ir grynumo metodų pasirinkimo (Chu *et al.*, 1985; Moennig *et al.*, 1991; Kwang *et al.*, 1995).

Šiuo metu daugelyje Europos šalių IFA yra pagrindinis metodas, taikomas Ak prieš GVDV nustatyti (Juntti *et al.*, 1987; Bitsch, Rønsholt, 1995; Beaudeau *et al.*, 2001). Konkuruojanti ir blokuojanti IFA priklauso aktyvumą moduluojančiai (AM) sistemai, kur tiriamajame mėginyje esantys specifiniai antikūnai konkuruoja arba blokuoja su peroksidaze konjuguotų virusui specifinių Ak susijungimą su diagnostiniu antigenu (Paton *et al.*, 1991). Aprašyta daug IFA modifikacijų, sukurta daug komercinių diagnostinių rinkinių. Daugelis metodų paruošti sluoksniuotos IFA principu absorbuojant kietos fazės Ak ir juos nustatant konjugatais su peroksidaze. Tyrimams naudojami tiek monokloniniai, tiek ir polikloniniai Ak. Naudojant monokloninius Ak kaip antigeninius žymeklius, galima nustatyti, kokių GVDV biotipu yra infekuotos ląstelės (Peters *et al.*, 1986).

GVDV arba virusinėms dalelėms bei jų sukeltam imuniniam atsakui nustatyti tinka dauguma virusologijoje taikomų tyrimo metodų. Tačiau nėra metodo, kuris, be privalumų, neturėtų ir trūkumų, be to skiriasi atskirų metodų tikslumas. Tiriant tuos pačius mėginius IFA ir VN reakcijomis, ne visada gaunami identiški tyrimo rezultatai. Geriausiai tyrimų rezultatai sutampa taikant tik IFA modifikacijas nepriklausomai nuo to, ar IFA naudojamas komercinis, ar laboratorijoje paruoštas diagnostinis rinkinys (Edwards, 1990; Moennig *et al.*, 1991; Sandvik, 1999).

Norint įvertinti bandos būklę ir efektyviai kontroliuoti GVDV situaciją nustatant GVDV infekcijos ypatumus bei sukėlėjo savybes, labai svarbu pasirinkti tinkamus, vienas kitą papildančius tyrimo metodus. Tarptautiniu mastu pripažinta VN reakcija yra jautri ir specifiška, tačiau reikalauja didelių laiko ir darbo sąnaudų, o rezultatų tikslumas labai priklauso nuo ląstelių kultūros parinkimo, terpės sudėties, naudojamo serumo, taip pat nuo dirbančiojo įgūdžių. Ak IFA diagnostiniu metodu rezultatai gaunami per kelias valandas ir tinka gausiems tyrimams. Deja, praktikoje naudojamų įvairių komercinių diagnostikumų modifikacijų praktinis tinkamumas ne visada būna įvertintas.

Darbo tikslas – atlikti praktikoje naudojamų komercinių diagnostinių metodų palyginamąjį įvertinimą, norint įvertinti galvijų, turėjusių kontaktą su virusinės diarėjos virusu imunologinę būklę.

Medžiagos ir metodai. Buvo tiriami šalies ūkiuose laikomi ir atsitiktinai parinkti įvairaus amžiaus galvijai. Kraujas serologiniams (VN ir IFA Ak prieš GVDV atžvilgiu) tyrimams buvo steriliai imtas iš *vena jugularis* į 10 ml vakuuminius mėgintuvėlius be antikoagulianto. Serumui atskirti mėginiai 15 min. buvo centrifuguoti 1500 aps./min. Kraujo serumo mėginiai buvo sunumeruoti ir iki tyrimo laikyti – 20°C temperatūroje.

Virusai ir ląstelių kultūros. Virusams dauginti panaudotos persėjamosios MDBK – galvijų embriono inkstų ląstelių kultūrų linijos. Ląstelėms kultivuoti panaudotos MEM (minimum essential medium Eagle) su 10 proc. arklio kraujo serumu. Tyrimams naudota etaloninė GVDV biologinė padermė – citopatogeninis NADL (gautas iš prof. J. Zmudzinski, Lenkijos nacionalinis veterinarijos institutas, Pulawy). Virusai adaptuoti ir padauginti MDBK ląstelių kultūrose persėjant nuo dviejų iki šešių kartų. Susidaręs ląstelių monosluoksnis prieš apkrečiant buvo tris kartus plaunamas MEM terpe be serumo. Ant nuplauto monosluoksniu užpilta virusų suspensija, kad apkrėtimo dozė būtų 0,1–1 virusinių dalelių ląstelei (0,1–1 AKID₅₀). Apkrėtos ląstelės buvo inkubuojamos termostate 37–37,5°C temperatūroje.

Citopatogeniniu NADL užkrėstų ląstelių monosluoksnis buvo kultivuojamas 48–72 valandas iki 70–90 proc. citopatogeninio efekto nustatymo. Virusų suspensija buvo gaunama tris kartus užšaldant ir atšildant ląstelių kultūrą, vėliau 10 min. centrifuguojant 500 apsukimų per min. greičiu. Supakuota į kriomėgintuvėlius virusų suspensija buvo laikoma skystame azote –196°C temperatūroje. GVDV virusinių preparatų titrai AKID₅₀ buvo nustatomi užkrečiant atitinkamų ląstelių monosluoksnį 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje. Virusų suspensija buvo skiedžiama nuo 1:10 iki 1:10¹⁰, inkubuojama 48 val. 37°C temperatūroje su 5 proc. CO₂, ląstelių augimo terpėje su 2 proc. fetaliniu veršelių serumu (FVS) („Biochrom“, Vokietija). Mažiausias virusų kiekis, sukeliantis aiškų citopatogeninį poveikį ląstelėms buvo laikomas viruso titru ir išreiškiamas AKID₅₀, kuris apskaičiuojamas pagal L. J. Reed ir H. Muench statistinį metodą (Reed, Muench, 1938).

Virusų neutralizacijos reakcija. Prieš atliekant VN reakciją virusas buvo ištitruotas, ir NADL padermės titras MDBK ląstelių kultūroje siekė 10^{6,5} AKID₅₀/ml (50 proc. audinių kultūros infekcinės dozės). Reakcija buvo atlikta mikrometodu, naudojant nekontaminuotą pestivirusais MDBK ląstelių kultūrą su 100 AKID₅₀. Pagal Tarptautinio epizootijų biuro rekomendacijas lygiagrečiai buvo atliekama ir mūsų modifikuota VN su 1000 AKID₅₀ etaloninės GVDV padermės (2002; 2004). Ląstelių augimui, prisitvirtinimui prie stiklo, kultūros tankio reguliavimui ir kt. į terpes įpilta 10 proc. arklio serumo.

Kraujo serumai prieš tyrimą buvo inaktyvuojami – kaitinami 56°C temperatūros vandens vonioje 30 min. Mėginiai buvo titruojami 96 duobučių mikroplokštelėje, ląstelių kultūrų terpę panaudojant kaip skiediklį. Kiekvienas mėginys buvo skiedžiamas dviejose duobutėse, serumus titruojant nuo 1:5 iki 1:640 (jei

naudojama 100 AKID₅₀) arba nuo 1:2 iki 1:256 (jei naudojama 1000 AKID₅₀). Teigiamai serumo kontrolei buvo naudojami hiperimuninis triušio, imunizuoto cp NADL GVDV paderme, serumas. Neigiamai serumo kontrolei buvo naudojamas arklio kraujo serumas. Plokštelės su tiriamaisiais serumais inkubuojamos 4 paras 37°C temperatūroje 5 proc. CO₂ atmosferoje. Mikroskopu stebimos visos plokštelių duobutės, ieškant citopatogeninio poveikio (CPP). Reakcijoje tikrinama darbinė virusų koncentracija, kontroliniai serumai, kontrolinių ląstelių gyvybingumas ir dauginimasis. VN reakcijos titru buvo laikomas didžiausias praskiedimas, kuriame virusai neutralizuojami 50 proc. duobučių, t. y. kai visiškai sustabdomas CPP.

Imunofermeninės analizės metodas (IFA). Antikūnai prieš GVDV buvo nustatomi komerciniais diagnostiniais rinkiniais, pagamintais bei standartizuotais Švedijoje (IDEXX) ir Prancūzijoje (Institut Pourquier). IFA tyrimo metodas paremtas principu, kai virusui specifiniai antikūnai tiriamajame mėginyje konkuruoja su peroksidaze konjuguotus monokloninius virusui p80 specifinius antikūnus arba juos blokuoja. IFA atlikta nuosekliai pagal diagnostinių rinkinių gamintojų metodikas. Tyrimo rezultatai įvertinti tiriamo mėginio optinį tankį (OT) matuojant spektrofotometru „Multiscanex (Labsystems)“, kai bangos ilgis $\lambda = 450$ nm. Rezultatams patikslinti kiekvienam tirtu serumo mėginiui buvo apskaičiuotas blokavimo procentas (tiriant IDEXX diagnostiniu rinkiniu) arba konkurentinis procentas (tiriant „Institut Pourquier“ diagnostiniu rinkiniu).

Palyginamasis diagnostinių metodų įvertinimas. Tyrimų eigoje buvo atliktas palyginamasis standartinės VN, netiesioginės Ak IFA bei modifikuotos VN metodų, taikomų GVD diagnostikoje, įvertinimas. Surinkti kraujo mėginiai (120) suskirstyti į grupes pagal gyvulių amžių ir tirti minėtais metodais. VN reakcijoje buvo naudota GVDV cp NADL 100 AKID₅₀ virusinių dalelių 0,1 ml, o modifikuotoje VN – 1000 AKID₅₀ 0,1 ml. Duomenys, gauti skirtingais tyrimo metodais, buvo lyginami įvertinant reakcijų jautrumą ir specifiskumą pagal J. A. Kramps ir Tarptautinio epizootijų biuro rekomenduotus statistinius metodus (Kramps et al., 1999).

Ak IFA reakcijos specifiskumas ir jautrumas buvo nustatytas lyginant su VN reakcija, kuri pripažįstama standartinė („gold standard“). Reakcijos specifiskumas nusakomas kaip tikimybė, jog realiai neužsikrėtę gyvuliai (t. y. nustatyti standartinė VN reakcija) rodys neigiamą reakcijos rezultatą. Reakcijos jautrumas nusakomas kaip tikimybė, jog realiai užsikrėtę gyvuliai (nustatyti standartinė VN reakcija) rodys teigiamą rezultatą.

$$\text{Diagnostinio specifiskumo proc.} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100;$$

čia TN – tikrai neigiamų mėginių skaičius, standartinėje VN reakcijoje nereagavę. FP – netikrai teigiamų mėginių skaičius, t. y. teigiami tiriant lyginamąją reakciją, bet neigiami tiriant standartinę.

$$\text{Diagnostinio jautrumo proc.} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100;$$

čia TP – tikrai teigiamų mėginių skaičius, nustatytas standartinė reakcija. FN – netikrai neigiamų mėginių skaičius, nustatytas lyginamąja reakcija, bet teigiami tiriant standartinė.

Galvijų specifinės imunologinės būklės tyrimas. Norėdami įvertinti konkurentinės Ak IFA, dažniausiai taikomos laboratorinėje praktikoje, tyrimo duomenų patikimumą, atlikome palyginamąjį VN bei konkurentinės Ak IFA įvertinimą. Tam tikslui surinkti kraujo mėginiai (120 vnt.) buvo suskirstyti į grupes pagal gyvulių amžių ir tiriami standartinė VN, modifikuota VN ir netiesioginės konkurentinės Ak IFA metodais.

Moksliniai tyrimai atlikti laikantis 1997 11 06

1 lentelė. GVDV infekcijos tyrimų duomenų pasiskirstymas galvijų amžiaus grupėse priklausomai nuo diagnostinio metodo

Galvijų grupė	Tirta galvijų, vnt.	Teigiamų skaičius					
		VN 100 AKID ₅₀		VN 1000 AKID ₅₀		Ak IFA	
		vnt.	proc.	vnt.	proc.	vnt.	proc.
Prieauglis < 3 mėn.	30	20	66,7	17	56,7	19	63,3
Prieauglis 8–12 mėn.	40	12	30,3*	10	25,0	8	20,0*
Telyčios 24–30 mėn.	31	17	54,8	14	45,16	17	54,8
Karvės 3–6 m.	19	14	73,7*	13	68,4*	15	78,9*
Iš viso:	120	63	52,5	54	45,0	59	49,2

Pastaba * $p \leq 0,05$.

Lentelėje pateiktų suvestinių duomenų eilutė rodo, kad VN reakcija buvo nustatyti 63 (52,5 proc.), modifikuota VN reakcija – 54 (45 proc.), o Ak IFA – 59 (49,2 proc.) gyvuliai – antikūnų prieš GVDV nešiotojai. Gauti tyrimo duomenų skirtumai buvo nedideli (3,3–7,5 proc., $p > 0,05$). Atskiroms gyvulių grupėms taikytų tyrimo metodų palyginamieji duomenys buvo labai panašūs. Didžiausias skirtumas (iki 10,3 proc.) nustatytas 8–12 mėnesių prieauglių grupėje. Mažiausiai seroteigiamų gyvulių tiriant Ak IFA nustatyta 8–12 mėnesių prieauglių grupėje (20,0 proc.), o daugiausia buvo seroteigiamų karvių – net 78,9 proc. ($p \leq 0,05$). Panaši dinamika gyvulių grupėse nustatyta ir tiriant VN bei modifikuota VN reakcijomis.

Taigi, vertinant seroteigiamų GVDV atžvilgiu gyvulių Ak IFA, VN ir modifikuota VN reakcijų tyrimo duomenis, visi metodai rodė panašią GVDV infekcijos paplitimo tendenciją visose galvijų amžiaus grupėse, nepriklausomai nuo taikyto metodo. Skirtumai rasti tik tarp atskirų gyvulių grupių.

Norėdami išaiškinti kraujo serumo tyrimo rezultatų skirtumus, gautus standartinė VN, modifikuota VN ir Ak IFA, įvertinome Ak IFA jautrumą ir specifiskumą. Tuo tikslu standartinė VN reakcija, naudodami GVDV cp NADL padermės 100 AKID₅₀ virusinių dalelių 0,1 ml, bei modifikuota VN – 1000 AKID₅₀ 0,1 ml, tyrėme 120 galvijų kraujo serumą. Tie patys kraujo serumą mėginiai buvo iširti ir Ak IFA.

Ak IFA diagnostinio jautrumo ir specifiskumo apskaičiavimo schemas, rekomenduojamos Tarptautinio epizootijų biuro, pateiktos 2 ir 3 lentelėje.

Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo, naudojimo įstatymo Nr. 8–500 („Valstybės žinios“, 1997 11 28, Nr. 108) bei poįstatyminių aktų – LR valstybinės veterinarinės tarnybos įsakymų „Dėl laboratorinių gyvūnų veisimo, dauginimo, priežiūros ir transportavimo veterinarijų reikalavimų“ (1998 12 31, Nr. 4–361) ir „Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams“ (1999 01 18, Nr. 4–16).

Tyrimų rezultatai. Palyginamasis Ak IFA, VN ir modifikuoto VN metodų įvertinimas buvo atliekamas kiekvienu metodu išaiškinant seroteigiamus GVDV atžvilgiu gyvulius (1 lentelė).

2 lentelė. Ak IFA ir standartinės VN (100 AKID₅₀) reakcijų lyginamieji duomenys (120 vnt.)

62	TP VN	FP IFA	3
6	FN IFA	TN VN	58

Remdamiesi 2 lentelėje pateiktais duomenimis, apskaičiuojame Ak IFA diagnostinį jautrumą:

$$\frac{62}{62+6} \times 100 = 91,2 \text{ proc.}$$

Tuo tarpu Ak IFA specifiskumas buvo:

$$\frac{58}{58+3} \times 100 = 95,1 \text{ proc.}$$

Lyginant 3 lentelėje pateiktus modifikuotos VN duomenis su Ak IFA, pastarosios jautrumas buvo:

$$\frac{54}{54+3} \times 100 = 94,7 \text{ proc.}$$

Tuo tarpu Ak IFA specifiskumas buvo:

$$\frac{66}{66+6} \times 100 = 91,7 \text{ proc.}$$

Ak IFA diagnostinis jautrumas ir specifiskumas taip pat buvo apskaičiuotas vadovaujantis J. A. Kramps ir kitų mokslininkų metodika (1999). Netiesioginės Ak IFA ir etaloninės VN palyginamojo įvertinimo schema pateikta 4 lentelėje.

Atsižvelgus į Ak IFA gautą optinį tankį ir VN antikūnų titrą, buvo nustatytas Ak IFA diagnostinis jautrumas ir specifiskumas:

$$\text{diagnostinio jautrumo proc.} = \frac{56}{56+6} \times 100 = 90,3 \text{ proc.}$$

3 lentelė. Ak IFA ir modifikuotos VN (1000 AKID₅₀) reakcijų lyginamieji duomenys (120 vnt.)

54	TP VN	FP IFA	6
3	FN IFA	TN VN	66

4 lentelė. Netiesioginės AkIFA ir standartinės VN reakcijų palyginamasis įvertinimas, atsižvelgiant į optinį tankį bei neutralizuojančių antikūnų titrą (120 vnt.)

Ak IFA	VN 100 AKID ₅₀	
	Titras ≥1:10	Titras <1:10
Optinis tankis (OD) ≤40 proc. (+)	56	3
Optinis tankis (OD) ≥50 proc. (-)	6	55

Tuo tarpu diagnostinio specifiskumo proc. = $\frac{55}{55+3} \times 100 = 94,8 \text{ proc.}$

Analogiškai buvo apskaičiuotas Ak IFA jautrumas ir specifiskumas, lyginant ją su modifikuota VN (5 lentelė).

5 lentelė. Netiesioginės Ak IFA ir modifikuotos VN reakcijų palyginamasis įvertinimas, atsižvelgiant į optinį tankį bei neutralizuojančių antikūnų titrą (120 vnt.)

Ak IFA	VN 1000 AKID ₅₀	
	Titras ≥1:2	Titras <1:2
Optinis tankis (OD) ≤40 proc. (+)	51	6
Optinis tankis (OD) ≥50 proc. (-)	3	60

Šiuo atveju Ak IFA jautrumas ir specifiskumas buvo: diagnostinio jautrumo proc. = $\frac{51}{51+3} \times 100 = 94,4 \text{ proc.}$

Tuo tarpu diagnostinio

$$\text{specifiskumo proc.} = \frac{60}{60+6} \times 100 = 90,9 \text{ proc.}$$

Lygindami abu jautrumo ir specifiskumo nustatymo metodus galime pastebėti, kad pagal Tarptautinio epizootijų biuro apskaičiavimo rekomendacijas gaunamas kiek didesnis Ak IFA jautrumas ir specifiskumas, nors skirtumai buvo nežymūs ir siekė tik 0,3–0,9 proc.

Nors Ak IFA pasižymėjo dideliu diagnostiniu jautrumu ir specifiskumu, viršijančiu 90 proc., toliau analizavome VN ir Ak IFA rezultatų neatitikimo priežastis. Tam tikslui standartinės ir modifikuotos VN reakcijų duomenys suskirstyti pagal titrų grupes (6 ir 7 lentelė).

6 lentelėje pateikti duomenys rodo, kad dauguma (5 vnt.) Ak IFA netikrai neigiamų rezultatų buvo 1:10 VN antikūnų titrų grupėje.

7 lentelėje pateikti duomenys rodo, kad tik trys Ak IFA gauti netikrai neigiami tyrimo rezultatai buvo 1:2 ir 1:4 modifikuotos VN antikūnų titrų grupėje. Taigi, taikant modifikuotą VN ir darant kitokius nei standartinėje VN serumų skiedimus, Ak IFA reakcijoje netikrai neigiamų skaičius sumažėjo du kartus. Taip buvo išvengta dalies klaidų tiriant serumus, kuriuose antikūnų titras žemas. Tačiau šiuo atveju gaunamas mažesnis Ak IFA specifiskumas.

Apibendrinę gautus palyginamojo tyrimo duomenis galime teigti, kad tyrimui taikyta netiesioginė konkurentinė Ak IFA yra pakankamai jautri ir specifiška. Didžiausi Ak IFA ir abiejų VN modifikacijų rezultatų neatitikimai gauti iki 3 mėnesių amžiaus veršelių grupėje. Kadangi dauguma tokio amžiaus veršelių turi kolostrinius antikūnus prieš GVDV, šis neatitikimas didelės reikšmės GVDV infekcijos diagnostikai neturi.

Tyrimų rezultatų aptarimas. Tinkama laboratorinė diagnostika yra pagrindinė sąlyga kontroliuoti ir užkirsti kelią GVDV plitimui. Norėdami įvertinti serologinio tyrimo duomenų patikimumą, atlikome palyginamąjį VN bei konkurentinės Ak IFA įvertinimą. Mūsų ankstesni tyrimai parodė, kad geriausiomis reprodukciniomis savybėmis pasižymi NADL GVDV biologinė padermė ir MDBK persėjamoji ląstelių kultūrų linija (Mockeliūnienė ir kt., 2000). Šią GVDV padermę ir persėjamąją ląstelių kultūrų liniją serologiniams tyrimams dažniausiai naudoja ir kiti mokslininkai (Edwards et al., 1991; Fulton et al., 1997).

Palyginamasis Ak IFA, standartinės VN ir modifikuotos VN metodų įvertinimas buvo atliktas kiekvienu metodu išaiškinant seroteigiamus GVDV atžvilgiu galvijus (120 vnt.). Tačiau gana ryškūs skirtumai buvo nustatyti tik tarp atskirų gyvulių grupių, nepriklausomai nuo metodo, kuriuo buvo tirti kraujo mėginiai. Tyrimo duomenų skirtumas buvo nedidelis (3,3–7,5 proc.; $p > 0,05$). Norint nustatyti kraujo serumo tyrimo duomenų skirtumo priežastis pagal Tarptautinio epizootijų biuro rekomenduojamas metodikas (2004) tiriant skirtingais metodais, buvo įvertintas Ak IFA jautrumas ir specifiskumas. Nustatyta, kad konkurentinė Ak IFA yra pakankamai jautrus (91,2 proc.) ir specifiskas

(95,1 proc.) metodas. Įdomu tai, kad lyginant Ak IFA su modifikuota VN, kai naudojama 1000 AKID₅₀ virusinių dalelių 0,1 ml, buvo nustatytas didesnis Ak IFA jautrumas (94,7 proc.), bet mažesnis (91,7 proc.) specifiskumas.

Vadinasi, kad dauguma (5 iš 6) Ak IFA netikrai neigiamų rezultatų buvo 1:10 VN antikūnų titrų grupėje, dėl to ir sumažėjo Ak IFA jautrumas.

6 lentelė. Ak IFA ir standartinės VN palyginamasis tyrimas, atsižvelgiant į antikūnų titrų grupes

Antikūnų titrai	Standartinėje VN reakcijoje teigiamų skaičius, vnt.	Ak IFA reakcijoje teigiamų skaičius, vnt.	Ak IFA reakcijoje netikrai neigiamų skaičius, vnt.
1:10	15	10	5
1:20	24	23	1
1:40	18	18	0
1:80	5	5	0

7 lentelė. Ak IFA ir modifikuotos VN palyginamasis tyrimas, atsižvelgiant į antikūnų titrų grupes

Antikūnų titrai	Modifikuotoje VN reakcijoje teigiamų skaičius, vnt.	Ak IFA reakcijoje teigiamų skaičius, vnt.	Ak IFA reakcijoje netikrai neigiamų skaičius, vnt.
1:2	20	19	1
1:4	19	17	2
1:8	9	9	0
1:16	5	5	0
1:32	1	1	0

Tuo tarpu tik trys Ak IFA gauti netikrai neigiami tyrimo rezultatai buvo 1:2 ir 1:4 modifikuotos VN antikūnų titrų grupėje. Taigi, taikant modifikuotą VN ir serumą skiedžiant kitaip nei standartinėje VN, Ak IFA reakcijoje netikrai neigiamų skaičius sumažėjo du kartus; buvo išvengta dalies klaidų tiriant serumus, kurių antikūnų titras žemas. Tačiau šiuo atveju gaunamas mažesnis Ak IFA specifiskumas.

Lyginant Tarptautinio epizootijų biuro (2004) bei J. A. Kramps ir grupės tyrėjų (1999) reakcijų jautrumo bei specifiskumo nustatymo metodikas, pagrįstas optinio tankio ir neutralizuojančių antikūnų titro duomenimis, skirtumas buvo nežymus (0,3–0,9 proc.). Didžiausi Ak IFA ir abiejų VN modifikacijų duomenys neatitiko iki 3 mėnesių amžiaus prieauglio grupėje. Vadinasi, dauguma tokio amžiaus veršelių turi nedidelius kolostrinių antikūnų prieš GVDV titrus, kurie ir nebuvo užfiksuoti konkurentinėje Ak IFA. Kadangi dauguma mokslininkų nerekomenduoja tirti jaunesnių nei 3 mėnesiai galvijų, šis neatitikimas GVDV infekcijos diagnostikoje didelės reikšmės neturi (Bitsch, Rønsholt, 1995). Taip galima paaiškinti gautų duomenų neatitikimą, tuos pačius mėginius ištyrus Ak IFA ir VN modifikuotomis reakcijomis. Tą patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai, rodantys, kad labiausiai tyrimų duomenys sutampa lyginant įvairias IFA modifikacijas bei VN nepriklausomai nuo to, ar Ak IFA diagnostinis rinkinys buvo komercinis, ar paruoštas laboratorijoje (Edwards, 1990; Moennig, 1990; Sandvik, 1999).

Išvados:

1. Galvijus ištyrus Ak IFA, standartinė VN ir modifikuota VN reakcijomis, visais metodais tirtose įvairaus amžiaus galvijų grupėse nustatyta panaši GVDV infekcijos paplitimo tendencija bei antikūnų titrų dinamika.

2. Nustatyta, kad konkurentinė Ak IFA yra

pakankamai jautrus (91,2 proc.) ir specifiskas (95,1 proc.) metodas, tinkantis gausiems rutiniams tyrimams atlikti vertinant bandos imuninę būklę GVD atžvilgiu.

Literatūra

1. Baker J. C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 1990. Vol. 9. P. 25–41.
2. Beaudou F., Belloc C., Seegers H., Assie S., Sellal E., Joly, A. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Veterinary Microbiology*. 2001. Vol. 80 (4). P. 329–337.
3. Bitsch V., Rønsholt L. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without application of vaccines. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1995. Vol. 11. P. 627–640.
4. Bolin S. R., Matthews P. J., Ridpath J. F. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1991. Vol. 3. P. 199–203.
5. Bolin S. R., Ridpath J. F., Black J., Macy M., Roblin R. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*. 1994. Vol. 48. P. 211–221.
6. Chu H. J., Zee Y. C., Ardans A. A., Dai K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. *Veterinary Microbiology*. 1985. Vol. 10. P. 325–333.
7. Collett M. S. Molecular genetics of pestiviruses. *Comparative Immunology Microbiology of Infections Diseases*. 1992. Vol. 15. N. 3. P. 145–154.
8. Edwards S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 1990. Vol. 9. P. 115–130.
9. Edwards S., Wood L., Brockman S., Ibat G. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently – infected seropositive survivors. *Archives of Virology*. 1991. Suppl. 3. P. 125–132.
10. Fulton R. W., Saliki J. T., Burge L. J., Doffay J. M., Bolin S. R., Maes R. K., Baker J. C., Frey H. R. Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhoea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 1997. Vol. 4. P. 380–

- 383.
11. Harasawa R., Tomiyama T. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccine. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994. Vol. 32. P. 1604–1605.
12. Harasawa R. Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*. 1995. Vol. 13. P. 100–103.
13. Harasawa R., Mizusawa H. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiology and Immunology*. 1995. Vol. 39. P. 975–985.
14. Harasawa R. Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5' untranslated region. *Acta Virologica*. 1996. Vol. 40. P. 49–56.
15. Horner G. W., Orr D. M. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine pestivirus. *New Zealand Veterinary Journal*. 1993. Vol. 41. P. 123–125.
16. Juntti N., Larsson B., Fossum C. The use of monoclonal antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*. 1987. Vol. 34. P. 356–363.
17. Kramps J. A., Maanen C., Wetering G., Stienstra G., Quak S., Brinkhof J., Rønsholt L., Nylin B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Veterinary Microbiology*. 1999. Vol. 64. P. 135–144.
18. Kwang J., Bolin S., Littledike E.T. Bovine viral diarrhoea serologic diagnostic reagents prepared from bacterially expressed recombinant proteins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1995. Vol. 7. P. 143–145.
19. Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymas. Valstybės žinios. 1997. Nr.108.
20. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office international des epizooties. 5th edition. 2004. P. 11–14.
21. Meyers G., Thiel H. J. Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research*. 1996. Vol. 47. P. 53–118.
22. Mockeliūnienė V., Šalomska A., Stankevičius A., Pilinkienė A. Propagation of bovine viral diarrhoea viruses in cell culture. *Veterinarmedicinas Raksti. Jelgava, Latvia*. 2000. P. 116–119.
23. Moennig V. Pestiviruses: a review. *Veterinary Microbiology*. 1990. Vol. 23. P. 35–54.
24. Moennig V., Leder L., Greiser-Wilke I., Frey H. R., Liess B. Ein neuer Enzymimmuntest zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen. 1991. Vol.19. P. 35–38.
25. Nettleton P. F., Entrican G. Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal*. 1995. Vol. 151. P. 615–642.
26. Niskanen R., Alenius S., Larsson B., Juntti N. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*. 1989. B. 36. P. 113–118.
27. Niskanen R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Veterinary Record*. 1993. Vol. 133. P. 341–344.
28. Paton D. J., Sands J. J., Roehe P. M. BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. *Archives of Virology*. 1991. Suppl. N. 3. P. 47–54.
29. Paton D. J. Pestivirus diversity. *Journal of Comparative Pathology*. 1995. Vol. 112. P. 215–236.
30. Peters W., Greiser-Wilke I., Moennig V., Liess B. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*. 1986. Vol. 12. P. 195–200.
31. Reed L. J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 1938. Vol. 27. P. 493–497.
32. Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*. 1994. Vol. 205. P. 66–74.
33. Sandvik T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*. 1999. Vol. 64. P. 123–134.
34. Ståhl K., Rivera H., Vågsholm I., Moreno-Lopez J. Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV – 1 in a rural region of Peru. *Preventive Veterinary Medicine*. 2002. Vol. 56. P.193–202.
35. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam. 1985. P. 89–102.
36. Zimmer G., Schoustra W., Graat E. A. M. Predictive values of serum and bulk milk sampling for the presence of persistently infected BVDV carriers in dairy herds. *Research in Veterinary Science*. 2002. Vol. 72. P. 75–82.