

**KONJSKA KUGA***DIAGNOSTIKA*

Reagente za spodaj opisane encimskoimunske teste (ELISA) je mogoče dobiti v referenčnem laboratoriju Evropske unije ali Referenčnih laboratorijev OIE za konjsko kugo.

**1. KOMPETITIVNI TEST ELISA ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)**

Kompetitivni test ELISA se uporablja za odkrivanje specifičnih protiteles proti VKK v serumu katere koli vrste kopitarjev. Polispecifičen, poliklonski imunski anti-VKK serum buder (v nadaljevanju 'budrin antiserum') je specifičen za serološko skupino in je z njim možno prepoznati vse znane serotipe virusa konjske kuge.

Princip testa je prekinitev reakcije med antigeni VKK in budrinim antiserumom z vzorcem preiskovanega seruma. Protitelesa proti VKK v preiskovanem serumu bodo tekmovala s tistimi iz budrinega antiseruma, kar bo posledično povzročilo manj intenzivno obarvanost od pričakovane (po dodatku z encimom označenih protiteles proti budrinim protitelesom in substrata). Serumi se lahko testirajo bodisi pri redčenju 1 : 5 (metoda točkovnega testa) ali pa se titirajo (metoda titracije seruma) kjer se določijo končne točke razredčin. Vrednosti inhibicije, ki so večje kot 50 %, se lahko obravnavajo kot pozitivne.

Spodaj opisani testni protokol se uporablja v Regionalnem referenčnem laboratoriju za konjsko kugo v Pirbrightu, Združeno kraljestvo.

**1.1. Postopek testa***1.1.1. Priprava plošč*

1.1.1.1. V ELISA plošče naneseemo antigen VKK, ekstrahiran iz okuženih celičnih kultur in razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem puftru, pH 9,6. ELISA plošče inkubiramo čez noč na 4 °C.

1.1.1.2. Plošče trikrat speremo s polnjenjem in praznjenjem vdolbinic s fosfatnim pufrom (PBS), pH 7,2 do 7,4, in osušimo s pivnanjem na vpojnem papirju.

*1.1.2. Kontrolne vdolbinice*

1.1.2.1. Pozitivne kontrolne serume titriramo v serijah dvakratnih redčenj, od 1 : 5 do 1 : 640, v stolpcu 1 v puftru za blokiranje (PBS z 0,05 % (volumski delež) Tween-20, 5,0 % (utežni delež) posnetega mleka v prahu (Cadbury's Marvel™) in 1 % (volumski delež) govejega seruma), tako da dobimo končni volumen 50 µl/vdolbinico.

1.1.2.2. V vdolbinici A in B stolpca 2 dodamo 50 µl negativnega kontrolnega seruma v razredčini 1 : 5 (10 µl seruma + 40 µl puftra za blokiranje).

1.1.2.3. V vdolbinici C in D stolpca 2 (slepa kontrola) dodamo po 100  $\mu$ l pufru za blokiranje.

1.1.2.4. V vdolbinice E, F, G in H stolpca 2 (budrina kontrola) dodamo po 50  $\mu$ l pufru za blokiranje.

#### 1.1.3 *Metoda točkovnega testa*

1.1.3.1. V po dve vdolbinici stolpcev 3 do 12 dodamo redčenje vsakega preiskovanega seruma v razmerju 1 : 5 v pufru za blokiranje (10  $\mu$ l seruma + 40  $\mu$ l pufru za blokiranje).

ali

#### 1.1.4. *Metoda titracije seruma*

1.1.4.1. Pripravimo serije dvakratnih razredčin vsakega preiskovanega vzorca (1 : 5 do 1 : 640) v pufru za blokiranje preko osmih vdolbinic posameznega stolpca (3 do 12).

Potem

1.1.5. V vse vdolbinice razen v vdolbinice slepe kontrole ELISA plošče dodamo 50  $\mu$ l budrinega antiseruma, razredčenega v pufru za blokiranje, (vse vdolbinice sedaj vsebujejo končni volumen 100  $\mu$ l).

1.1.5.1. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na rotacijskem tresalniku.

1.1.5.2. Plošče trikrat speremo in osušimo kot prej.

1.1.5.3. V vsako vdolbinico dodamo po 50  $\mu$ l kunčjega anti-budrinega konjugata, označenega s hrenovo peroksidazo (HRP), redčenega v pufru za blokiranje.

1.1.5.4. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na rotacijskem tresalniku.

1.1.5.5. Plošče trikrat speremo in osušimo kot prej.

#### 1.1.6. *Kromogen*

Pripravimo raztopino OPD (OPD = orto-fenildiamin) kromogena po navodilih proizvajalca (0,4 mg/ml v sterilni destilirani vodi) neposredno pred uporabo. Dodamo substrat (vodikov peroksid =  $H_2O_2$ ), da dobimo končno koncentracijo 0,05% (volumski delež) (redčenje 1 : 2000 30 % raztopine  $H_2O_2$ ). Dodamo po 50  $\mu$ l OPD raztopine v vsako vdolbinico in plošče za 10 minut pustimo na pultu pri temperaturi okolja. Reakcijo prekinemo z dodatkom 50  $\mu$ l 1 M žveplene kisline ( $H_2SO_4$ ) / vdolbinico.

#### 1.1.7. *Odčitavanje*

Spektrofotometrično odčitavamo pri valovni dolžini 492 nm.

## 1.2. Prikaz rezultatov

1.2.1. S pomočjo programskega paketa izpišemo vrednosti absorbance (A) in procent inhibicije (PI) za preiskovane in kontrolne serume na podlagi povprečne vrednosti budrinih kontrol, zabeleženih v štirih vdolbinicah. Podatki, prikazani kot A in PI vrednosti, se uporabijo za ugotavljanje, ali je uspešnost testa v dovoljenih mejah. Zgornje kontrolne meje (ZKM) in spodnje kontrolne meje (SKM) za budrino kontrolo so med vrednostmi  $A = 1,4$  oziroma  $A = 0,4$ . Končni titer pozitivne kontrole na temelju 50 % PI bi moral biti pri redčenju 1 : 240 (v razponu od 1 : 120 do 1 : 480). Katera koli plošča, ki ne ustreza zgoraj navedenim kriterijem, mora biti zavržena. Vendar pa se lahko negativni vzorci sprejmejo, če je titer pozitivne kontrole večji kot 1 : 480 in so preiskovani vzorci še vedno negativni.

Dvojniki vdolbinic z negativno kontrolo seruma in dvojniki vdolbinic slepe kontrole bi morali doseči vrednost PI med + 25 % in – 25 % oziroma med + 95 % in + 105 %.

Če vrednosti niso znotraj predpisanih mej, plošča ni neveljavna, da pa slutiti, da se razvija barva ozadja.

1.2.2 Diagnostični prag (mejna vrednost) preiskovanih serumov je 50 % (PI 50 %). Vzorci, ki imajo vrednosti PI večje od 50 %, se vrednotijo kot pozitivni. Vzorci, ki imajo vrednosti PI manjše od 50 %, se vrednotijo kot negativni.

Vzorci z vrednostmi PI nad in pod pragom v dvojnikih vdolbinic se obravnavajo za dvomljive. Takšne vzorce bi bilo treba ponovno testirati s točkovnim testom in s titracijo. Pozitivne vzorce se lahko tudi titrira, da se dobi stopnjo pozitivnosti.

Načrt točkovnega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Preiskovani serumi									
A	1:5	– kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	1:10	– kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	1:20	Slepa kont.										
D	1:40	Slepa kont.										
E	1:80	GP kont.										
F	1:160	GP kont.										
G	1:320	GP kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
H	1:640	GP kont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

– kont. = negativna kontrola

+ kont. = pozitivna kontrola

GP kont = budrina kontrola

### Načrt titracijskega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Preiskovani serumi									
A	1:5	– kont.	1:5									1:5
B	1:10	– kont.	1:10									1:10
C	1:20	Slepa kont.	1:20									1:20
D	1:40	Slepa kont.	1:40									1:40
E	1:80	GP kont.	1:80									1:80
F	1:160	GP kont.	1:160									1:160
G	1:320	GP kont.	1:320									1:320
H	1:640	GP kont.	1:640									1:640

– kont. = negativna kontrola  
 + kont. = pozitivna kontrola  
 GP kont = budrina kontrola

## 2. INDIRECTNI TEST ELISA ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)

Spodaj opisani test je v skladu z opisom testa iz Poglavja 2.1.11 OIE Priročnika standardov za diagnostične teste in cepiva, četrta izdaja, 2000.

Rekombinantni VP7 protein se je uporabljal kot antigen za določanje protiteles proti VKK z visokim indeksom občutljivosti in specifičnosti. Drugi prednosti sta, da je stabilen in da ni kužen.

### 2.1. Postopek testa

#### 2.1.1. Trdna faza

2.1.1.1. V ELISA plošče nanese rekombinantni VKK-4 VP7, razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem pufru, pH 9,6. Plošče inkubiramo čez noč na 4 °C.

2.1.1.2. Plošče petkrat speremo z destilirano vodo, ki vsebuje 0,01 % (volumski delež) Tween 20 (spiralna raztopina). S ploščo nežno potolčemo po vpojenem materialu, da odstranimo ostanke spiralne tekočine.

2.1.1.3. Plošče blokiramo s fosfatnim pufram (PBS) + 5 % (utežni delež) posnetega mleka v prahu (Nestle Dry Skim Milk™), 200 µl/vdolbinico, za 1 uro na 37 °C.

2.1.1.4. Odstranimo pufer za blokiranje in nežno potolčemo s ploščo po vpojenem materialu.

### 2.1.2. *Preiskovani vzorci*

2.1.2.1. Serumski vzorci, pozitivni in negativni kontrolni serum se redčijo 1 : 25 v PBS + 5 % (utežni delež) posnetega mleka + 0,05 % (volumski delež) Tween 20, 100  $\mu$ l na vdolbinico. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

Za titracijo pripravimo serije dvakratnih razredčin od 1 : 25 (100  $\mu$ l/vdolbinico), en vzorec seruma na stolpec plošče, isto naredimo s pozitivnim in negativnim kontrolnim serumom. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

2.1.2.2. Plošče speremo, kot je opisano v koraku 2.1.1.2.

### 2.1.3. *Konjugat*

2.1.3.1. V vdolbinice dodamo po 100  $\mu$ l anti-konjskih gama globulinov, označenih s hrenovo peroksidazo (HRP), razredčenih v PBS + 5 % mleka + 5 % Tween 20, pH 7,2. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

2.1.3.2. Plošče speremo, kot je opisano v koraku 2.1.1.2.

### 2.1.4. *Kromogen/substrat*

2.1.4.1. V vdolbinice dodamo po 200  $\mu$ l raztopine kromogena/substrata (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetil aminobezaldehid) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metil-2-benzo-tiazolin hidrazon hidroklorid) + 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Razvijanje barve se ustavi z dodatkom 50  $\mu$ l 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po približno 5 do 10 minutah (preden se začne barvati negativna kontrola).

Lahko se uporabijo tudi drugi kromogeni, kot so ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina]), TMB (tetra-metil benzidin) ali OPD (orto-fenildiamin).

2.1.4.2. Plošče odčitamo pri 600 nm (ali 620 nm).

## 2.2. **Interpretacija rezultatov**

2.2.1. Izračunamo mejno vrednost, tako da vrednosti negativne kontrole dodamo 0,6 (0,6 je standardna deviacija, dobljena s skupino 30 negativnih serumov).

2.2.2. Preiskovani vzorci, ki dajo vrednosti absorbance nižje od mejne vrednosti, se smatrajo kot negativni.

2.2.3. Preiskovani vzorci, ki dajo vrednosti absorbance višje od mejne vrednosti + 0,15, se obravnavajo kot pozitivni.

2.2.4. Preiskovani vzorci, ki dajo vmesne vrednosti absorbance, so dvomljivi, tako da je potrebno za potrditev rezultata uporabiti drugo metodo.

### 3. BLOKING ELISA TEST ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)

Bloking test ELISA je namenjen odkrivanju specifičnih protiteles proti VKK v serumih katere koli dovzetne vrste. VP7 je glavni, antigeni, virusni protein VKK, in je ohranjen v devetih serotipih. Ker je monoklonsko protitelo (Mpt) prav tako usmerjeno proti VP7, ima test visoko občutljivost in specifičnost. Ob tem je rekombinantni VP7 antigen popolnoma neškodljiv in zato zagotavlja visoko stopnjo varnosti.

Princip testa je prekinitev reakcije med rekombinantnim VP7, antigenom, vezanim na ELISA ploščo, in markiranim Mpt, specifičnim za VP7. Protitelesa v preiskovanem serumu bodo preprečila reakcijo med antigenom in Mpt, kar bo povzročilo manjšo intenziteto obarvanja.

Spodaj opisani test se opravlja v Referenčnem laboratoriju Evropske Skupnosti za konjsko kugo v Algetu v Španiji.

#### 3.1. Postopek testa

##### 3.1.1. *ELISA plošče*

3.1.1.1. V ELISA plošče naneseemo rekombinantni VKK-4 VP7, razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem pufru, pH 9,6. Inkubiramo čez noč na 4 °C.

3.1.1.2. Plošče petkrat speremo s fosfatnim pufrom (PBS), ki vsebuje 0,05 % (volumski delež) Tween 20 (PBST).

3.1.1.3. Ploščo stabiliziramo z obdelavo v stabilizacijski raztopini (da omogočimo daljše shranjevanje pri 4 °C brez izgube aktivnosti) in osušimo na vpojnem materialu.

##### 3.1.2. *Preiskovani vzorci in kontrole*

3.1.2.1. Za pregled preiskovani serum in kontrole razredčimo 1 : 10 neposredno na plošči v PBST, da dobimo končni volumen 100 µl/vdolbinico. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C.

3.1.2.2. Za titracijo: pripravimo serijo dvakratnih razredčin preiskovanih serumov in pozitivne kontrole (100 µl/vdolbinico) od 1 : 10 do 1 : 1280 preko osmih vdolbinic. Negativna kontrola se testira pri redčenju 1 : 10.

##### 3.1.3. *Konjugat*

V vsako vdolbinico dodamo po 50 µl razredčenih Mpt (monoklonska protitelesa, specifična za VP7), označenih s hrenovo peroksidazo (HRP) in nežno pomešamo, da zagotovimo homogenost. Inkubiramo 30 minut pri 37 °C.

3.1.4. Plošče petkrat speremo s PBST in osušimo s pivnanjem, kot je opisano zgoraj.

### 3.1.5. Kromogen/substrat

V vdolbinice dodamo po 100  $\mu$ l raztopine kromogena/substrata (1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina]) 5 mg/ml + 9 ml substratnega pufra (0,1 M fosfatno-citratni pufer s pH 4, ki vsebuje 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi. Razvoj barve se ustavi z dodatkom 100  $\mu$ l 2 % (utežni delež) SDS (natrijev dodecil sulfat) v vdolbinico.

### 3.1.6. Odčitavanje

V ELISA čitalcu odčitamo pri 405 nm.

## 3.2. Interpretacija rezultatov

### 3.2.1. Validacija testa

Test je veljaven, ko je absorbanca (A) negativne kontrole (NK) večja od 1,0 in A pozitivne kontrole (PK) manjša od 0,2.

### 3.2.2. Izračun mejne vrednosti

Pozitivna mejna vrednost =  $NK - ((NK - PK) \times 0,3)$

Negativna mejna vrednost =  $NK - ((NK - PK) \times 0,2)$

Kjer je NK absorbanca negativne kontrole in PK absorbanca pozitivne kontrole.

### 3.2.3. Interpretacija rezultatov

Vzorci, ki imajo A manjšo od pozitivne mejne vrednosti, bi se morali obravnavati kot pozitivni na protitelesa proti VKK. Vzorci, ki imajo A večjo od negativne mejne vrednosti, bi se morali obravnavati kot negativni na protitelesa proti VKK. Vzorci z A med tema dvema vrednostima bi se morali obravnavati kot dvomljivi in pri teh živalih bi se moralo po dveh do treh tednih opraviti ponovno vzorčenje.