

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.5.09:57.083.3:616.988.73

**UPOREDNO ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI I SPECIFIČNOSTI
IMUNOENZIMSKE PROBE I TESTA INHIBICIJE
HEMAGLUTINACIJE U SEROLOŠKOJ DIJAGNOSTICI
NEWCASTLE BOLESTI ŽIVINE***

*COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY
OF IMMUNOENZYME PROBE AND INHIBITION HEMAGGLUTINATION
TEST IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF NEWCASTLE DISEASE IN
POULTRY*

**N. Milić, J. Nišavić, Marina Radojičić, M. Šekler, K. Matović,
D. Vidanović****

Uparedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti indirektno imunoenzimske probe - iELISA i testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) u serološkoj dijagnostici Newcastle bolesti živine vršeno je korišćenjem uzoraka krvnog seruma nevakcinisane i vakcinisane živine. Primenom imunoenzimske probe - iELISA ukupno je ispitano četrnaest uzoraka krvnog seruma nevakcinisane živine, od kojih je devet bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, dok su dva uzorka bila sumnjiva, a kod tri uzorka nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela. Ispitivanjem 82 uzorka krvnog seruma vakcinisane živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, utvrđeno je njihovo prisustvo kod 80 uzoraka seruma, dok je jedan uzorak bio sumnjiv, a jedan negativan. Vrednosti titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma vakcinisane i nevakcinisane živine ustanovljene primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa), kretale su se od 1:2 do 1:32.

Ključne reči: virus Newcastle bolesti, imunoenzimska proba - iELISA, test inhibicije hemaglutinacije (HI test)

* Rad primljen za štampu 23. 02. 2009. godine.

** Dr sci. med. vet. Nenad Milić, profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, asistent, dr sci. med. vet. Marina Radojičić, asistent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. vet. Milanko Šekler, mr sci. med. vet. Kazimir Matović, mr sci. med. vet. Dejan Vidanović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

Uvod / Introduction

Virus Newcastle bolesti pripada porodici Paramyxoviridae, podporodici Paramyxovirinae i rodu Rubulavirus. Posедуje jednolančani molekul RNK koji je smešten u nukleokapsidu ikosaedrične simetrije. Spoljašnji virusni omotač – peplos ima u svom sastavu dva glikoproteinska antigena, hemaglutininsko-neuraminidazni (HN) antigen i fuzioni. Hemaglutininsko – neuraminidazni antigen omogućava vezivanje virusa za receptore na površini ćelije domaćina, dok fuzioni antigen omogućava pokretanje procesa fuzije spoljašnjeg omotača virusne čestice i citoplazmatične membrane ćelije domaćina. Virus Newcastle bolesti se odlikuje znatnom varijabilnošću u pogledu virulencije na osnovu čega je izvršena klasifikacija sojeva virusa na velogene, mezogene i lentogene.

Virus Newcastle bolesti izaziva atipičnu kugu živine. Živina se inficira preko kontaminirane hrane, vode i opreme koja se koristi za njen uzgoj. Inkubacija traje prosečno oko pet dana. Virus Newcastle bolesti se veoma brzo širi kroz prijemčivu živinu. U zavisnosti od vrste živine, imunološkog statusa jedinki, virulencije i tropizma pojedinih sojeva virusa Newcastle bolesti, kod inficiranih životinja dolazi do razvoja različitih kliničkih simptoma (respiratornih, cirkulatornih, gastrointestinalnih i nervnih) atipične kuge živine. Bolest može da protiče u perakutnom, akutnom, subakutnom i hroničnom toku. U akutnom i subakutnom toku kod obolele živine javlja se povišena temperatura, apatičnost, nakostrešenost perja, kašalj, otežano disanje i proliv sivozelene boje da bi posle 2 do 4 dana došlo do uginuća obolelih jedinki. Kod hroničnog toka bolesti, koji se uglavnom javlja kod mladih ptica, javlja se apatičnost, otežano disanje i proliv sivozelene boje. Posle dve do tri nedelje se kod obolele živine ispoljavaju znaci oboljenja nervnog sistema u vidu manježnog kretanja, a neke obolele životinje leže postrance, što je često praćeno i povremenom pojavom konvulzija. U hroničnom toku bolesti smrtnost živine se kreće od 10% do 60%.

Patoanatomskim nalazom kod ptica uginulih u akutnom toku bolesti, utvrđeno je prisustvo naslaga fibrina na tonzilama, otok sluzokože žlezdanog dela želuca, petehijalna krvavljenja na prelazu žlezdanog u mišićni deo želuca i pojava difuznih difteroidnih naslaga na sluznici creva. Na srčanom mišiću i to na perikardu i epikardu uočavaju su petehijalna krvavljenja. Promene na plućima su u vidu plućnog edema i kataralne pneumonije, dok se na jetri i bubrezima uočavaju znaci degenerativnih promena. Kod ptica uginulih nakon hroničnog toka bolesti, patoanatomskim nalazom su na mozgu i kičmenoj moždini ustanovljene hipermične promene, a na moždanim ovojnicama petehijalna krvavljenja. Kod ljudi se bolest ispoljava u vidu konjunktivitisa.

U cilju otkrivanja prisustva virusa Newcastle bolesti u ispitivanom materijalu, u laboratorijskim uslovima, koriste se testovi hemaglutinacije, inhibicije hemaglutinacije i virus-neutralizacije, imunoenzimska proba - ELISA, test imuno fluorescencije i drugi. Imunopofilaksa infekcije živine virusom Newcastle bolesti

se sprovodi primenom živih vakcina pripremljenih od lentogenih ili mezogenih sojeva virusa i inaktivisanih vakcina.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Materijal / *Material*

Uzorci krvnog seruma živine / *Poultry blood serum samples*

Ukupno je ispitano 96 uzoraka krvnog seruma nevakcinisane i vakcinisane živine različitih starosnih i proizvodnih kategorija.

Dijagnostički komercijalni kit za izvođenje imunoenzimske probe – iELISA / *Diagnostic commercial kit for performing immunoenzyme probe – iELISA*

U ispitivanjima je za izvođenje imunoenzimske probe iELISA, korišćen komercijalni dijagnostički antigenski ELISA kit – Newcastle Disease Virus (NDV-Ab), Svanovir (Article number 10-1500-02), Svanova Biotech AB, Uppsala, Švedska.

Referentni La Sota soj virusa Newcastle bolesti /

Reference La Sota strain of Newcastle disease virus

Za izvođenje testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) korišćen je referentni soj virusa Newcastle bolesti – La Sota, razređen tako da sadrži 4HJ/0,1mL.

Metode / *Methods*

Imunoenzimska proba - iELISA / *Immunoenzyme probe – iELISA*

Ispitivanje uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti vršeno je primenom indirektno imunoenzimske probe – iELISA uz korišćenje dijagnostičkog komercijalnog antigenog kita – Newcastle Disease Virus (NDV-Ab), Svanovir (Article number 10-1500-02), Svanova Biotech AB, Uppsala, Švedska, po proceduri propisanoj od strane proizvođača.

Test inhibicije hemaglutinacije (HI test) / *Hemagglutination inhibition test (HI test)*

U sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano je po 25 μ L PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikroploče pojedinačno dodavano po 25 μ L ispitivanih uzoraka krvnog seruma živine koji su prvo izmešani sa rastvaračem PBS-om, a zatim su u količini od 25 μ L preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:512. U sva udubljenja je zatim dodato po 25 μ L referentnog La Sota soja virusa Newcastle bolesti. Poslednja tri bazenčića mikrotitracione ploče služila su kao kontrola virusa, kontrola eritrocita i kontrola seruma. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su za-

tim inkubisane u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi posle čega je u sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano po 50 µL 0,5% suspenzije eritrocita kokoši. Posle 45 minuta inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, očitavani su rezultati.

Rezultati / Results

Ispitivanjem uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti primenom imunoenzimske probe – iELISA (Tabela 1) i testa inhibicije hemaglutinacije (Tabela 2) dobijeni su sledeći rezultati:

Rezultati indirektno imunoenzimske probe – iELISA / Results of indirect immunoenzyme probe – iELISA

1. Uzorci krvnog seruma domaće nevakcinisane živine / Blood serum samples of domestic non-vaccinated poultry

Od ukupno 14 (od 1 do 14) uzoraka krvnog seruma živine – devet uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa NDV, dva uzorka su označena kao sumnjiva, dok su tri uzorka bila negativna (Tabela 1).

2. Uzorci krvnog seruma vakcinisanih brojlera / Blood serum samples of vaccinated broilers

Od ukupno 82 uzorka krvnog seruma živine (od 15 do 96), 80 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, jedan uzorak je bio sumnjiv, a jedan negativan (Tabela 1).

Tabela 1. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti dobijeni primenom imunoenzimske probe - iELISA /
Table 1. Results of examinations of blood serum samples for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus obtained using the immunoenzyme probe – iELISA

1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
+	+ -	+	+	+ -	-	+	+	+	+	+	+
2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
+ -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Rezultati testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) /

Results of hemagglutination inhibition test (HI test)

Tabela 2. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti dobijeni primenom testa inhibicije hemaglutinacije/

Table 2. Results of examinations of poultry blood serum samples for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus obtained using the hemagglutination inhibition test

1 1:4	9 1:2	17 1:32	25 1:2	33 1:8	41 1:2	49 1:2	57 1:2	65 1:16	73 1:2	81 1:4	89 1:8
2 1:8	10 1:2	18 1:8	25 1:16	34 1:8	42 1:2	50 1:2	58 1:4	66 1:8	74 1:8	82 1:2	90 1:16
3 1:4	11 1:2	19 1:8	27 1:8	35 1:2	43 1:2	51 1:2	59 1:32	67 1:8	75 1:2	83 1:4	91 1:16
4 1:2	12 1:2	20 1:2	28 1:2	36 1:4	44 1:2	52 1:4	60 1:16	68 1:4	76 1:2	84 1:2	92 1:8
5 1:2	13 1:2	21 1:4	29 1:2	37 1:2	45 1:2	53 1:2	61 1:32	69 1:8	77 1:2	85 1:2	93 1:4
6 1:2	14 1:4	22 1:2	30 1:2	38 1:2	46 1:4	54 1:4	62 1:2	70 1:16	78 1:2	86 1:4	94 1:2
7 1:4	15 1:2	23 1:2	31 1:8	39 1:2	47 1:2	55 1:2	63 1:32	71 1:16	79 1:2	87 1:8	95 1:2
8 1:2	16 1:2	24 1:4	32 1:4	40 1:2	48 1:2	56 1:2	64 1:4	72 1:16	81 1:2	88 1:2	96 1:8

Diskusija / Discussion

Sahle i sar. (2002) su potvrdili mogućnost korišćenja imunoenzimske probe – ELISA radi otkrivanja prisustva i titra specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti u ranim stadijumima infekcije živine veštački inficirane navedenim virusom, dok su Mohan i sar. (2006) pripremili antigenski kit za izvođenje indirektno imunoenzimske probe – iELISA u cilju određivanja visine titra specifičnih antitela u ispitivanim uzorcima krvnog seruma živine. Isti uzorci krvnog seruma su ispitivani na prisustvo specifičnih antitela i primenom testa inhibicije hemaglutinacije. Rezultati navedenih ispitivanja su potvrdili opravdanost šire primene imunoenzimske probe – iELISA za brzu detekciju specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti kao veoma osjetljive i specifične metode. Maas i sar. (2003) su primenom više metoda među kojima i imunoenzimske probe i testa inhibicije hemaglutinacije, ispitivali korelaciju između koncentracije antigena u inaktiviranoj uljanoj vakcini protiv virusa Newcastle bolesti i intenziteta imunološkog odgovora imunizovanih jedinki. Rezultati ispitivanja su pokazali da je intenzitet zaštitnog imunog odgovora živine vakcinisane inaktivisanom uljanom vakcinom bio u visokoj korelaciji sa koncentracijom vakcinalnih antigena korišćenih za imunizaciju. Raghul i sar. (2006) su primenom testa inhibicije hemaglutinacije ispitivali koje vrednosti titra specifičnih antitela postignuti u krvnom serumu živine pružaju efi-

kasnu zaštitu vakcinisanim životinjama od infekcije reproduktivnog trakta virusom Newcastle bolesti i ustanovili da visina titra specifičnih antitela treba da iznosi 1:128 i više, dok niže vrednosti vakcinalnog titra antitela od 1:32 i 1:64 imaju zaštitni karakter kod revakcinisanih jedinki.

Zaključak / Conclusion

Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost uporedne primene indirektno imunoenzimske probe – iELISA i testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) kao veoma brzih, osetljivih i specifičnih dijagnostičkih metoda za otkrivanje prisustva i visine titra specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti kako u uzorcima krvnog seruma živine vakcinisane protiv virusa atipične kuge živine, tako i u uzorcima poreklom od nevakcinisanih životinja.

Literatura / References

1. Bignaut A, Burger WP, Morley AJ, Bellstedt DU. Antibody responses to La Sota strain vaccines of Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) as detected by enzyme – linked immunosorbent assay. 2000., *Avian Dis.*, 44 (2): 390-8.
2. Horvath E, Czifra G, Nagy E, Engstrom B, Merza M. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA. *Vaccine*, 1999; 17(23-24): 2969-73.
3. Kite VG, Boyle DB, Heine Hg, Pritchard I, Garner MG, East IJ. A serological and virological survey for evidence of infection with Newcastle disease virus in Australian chicken farms. *Aust Vet J.*, 2007; 85(6): 236-42.
4. Maas RA, Komen M, van Diepen M, Oei HL, Claassen IJTM. Correlation of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines, *Vaccine* 2003; 21: 3137-42.
5. Manoharan S, Parthiban M, Prabhakar TG, Ravikumar G, Koteeswaran A, Chandran ND, Rajavelu G. Rapid serological profiling by an immunocomb – based dot-enzyme-linked immunosorbent test for three major poultry disease. *Vet Res Commun.*, 2004; 28(4): 339-46.
6. Mohan CM, Dey S, Rai A, Kataria JM. Recombination haemagglutinin neuraminidase antigen – based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling of Newcastle disease virus. *J Virol Methods* 2006; 138(1-2): 117-22.
7. Moro de Sousa RL, Montassier HJ, Pinto AA. Detection and quantification of antibodies to Newcastle disease virus in ostrich and rhea sera using a liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(6): 940-4.
8. Nišavić J, Milić N, Veljović Lj. E Examination of the activity of HN and F glycoprotein antigens of the outer envelope of Newcastle disease virus by using fusional, hemolytic, hemagglutination and hemadsorption tests, *in vitro*, *Acta veterinaria* (Beograd) 2007; 57(1): 3-10.

9. Raghul J, Raj GD, Manohar BM, Balachandran C. Protection of the reproductive tract of young chicks by Newcastle disease virus – induced haemagglutinininhibition antibodies. *Vet Res Commun.* 2006; 30(1): 95-102.
10. Sahle M, Burgess GW. Development of solid phase antigen for indirect ELISA for the detection of specific antibody responses to infection with Newcastle disease virus. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69(3): 237-42.
11. van Wyke Coelingh KL, Winter C, Murphy BR. Antigenic variation in the hemagglutinin-neuraminidase protein of human paraonfluenza type 3 virus. *Virology* 1985; 143(2): 569-82.
12. de Witt JJ, van de Sande HW, Counotte GH, Wallenberg GJ. Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathol* 2007; 36(2): 177-83.

ENGLISH

COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF IMMUNOENZYME PROBE AND INHIBITION HEMAGGLUTINATION TEST IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF NEWCASTLE DISEASE IN POULTRY

N. Milić, J. Nišavić, Marina Radojičić, M. Šekler, K. Matović, D. Vidanović

Comparative investigations of the sensitivity and specificity of the indirect immunoenzyme probe – iELISA and the hemagglutination inhibition test (HI test) in serological diagnostics of the Newcastle disease in poultry were carried out using samples of blood serum taken from non-vaccinated and vaccinated poultry. A total of 14 samples of blood serum from non-vaccinated poultry were examined using the immunoenzyme probe – iELISA, and nine of these were found to be positive to the presence of specific antigen against the Newcastle disease virus, while two samples were suspect, and no presence of specific antibodies was established in three samples. Examinations of 82 samples of blood serum from vaccinated poultry for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus established their presence in 80 serum samples, while one sample was suspect and one sample was negative. The values of the titer of specific antibodies in blood serum samples of vaccinated and non-vaccinated poultry established using the hemagglutination inhibition test (HI test) ranged from 1:2 to 1:32.

Key words: Newcastle disease virus, immunoenzyme probe – iELISA, hemagglutination inhibition test (HI test).

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОЭНЗИМНОЙ ПРОБЫ И ТЕСТА ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ НЬЮКАСЛА БОЛЕЗНИ ДОМАШНИХ ПТИЦ

**Н. Милич, Й. Нишавич, Марина Радоичич, М. Шеклер, К. Матович,
Д. Виданович**

Сравнительное испытание чувствительности и специфичности косвенной иммуноэнзимной пробы *iELISA* теста торможения гемагглютинации (ГТ теста) в серологической диагностике Ньюкасла болезни домашних птиц совершенно пользуетованием образчиков кровяного серума невакцинированных и вакцинированных домашних птиц. Применением иммуноэнзимной пробы - *iElisa* совокупно испытано четырнадцать образчиков кровяного серума невакцинированных домашних птиц, из которых девять были положительные на присутствие специфических антител против вируса Ньюкасла болезни, пока два образчика были сомневательны, а у трёх образчиков не установлено присутствие специфических антител. Испытанием 82 образчика кровяного серума вакцинированных домашних птиц на присутствие специфических антител против вируса Ньюкасла болезни, утверждено их присутствие у 80 образчиков серума, пока один образчик был сомневательным, а один отрицательным. Стоимости титра специфических антител в образчиках кровяного серума вакцинированных и невакцинированных домашних птиц установленные применением теста торможения гемагглютинации (ГТ теста) двигались от 1:2 до 1:32.

Ключевые слова: вирус Ньюкасла болезни, иммуноэнзимная проба - *iELISA*, тест торможения гемагглютинации (ГТ тест)