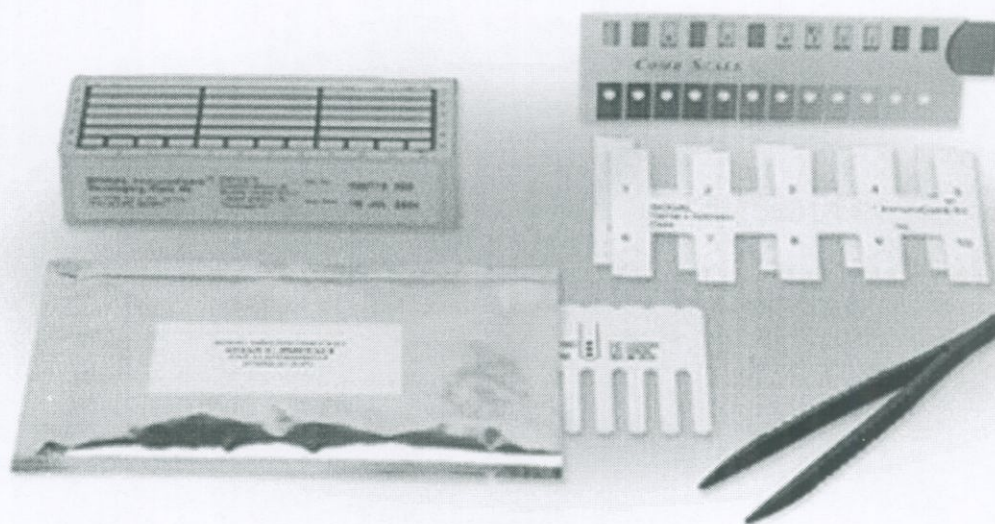


MÅLING AF ANTISTOFFER MOD HUNDESYGE OG PARVOVIRUS MED ELISA TEST KIT I KLINIKKEN



Fagdyrlægekursus vedr. sygdomme hos hund og kat
Hovedopgave
Oktober 2005

Lars Hougaard

Resume

En ny hurtigttest "Immunocomb" ELISA-test til bestemmelse af hundes antistofniveau mod hundesyge- og parvovirus beskrives. Ved validering i forhold til virusneutralisationstest fandtes overensstemmelse meget afhængig af valgt niveau for beskyttende titer. Ved afprøvning på en stikprøve bestående af 109 hunde fandtes henholdsvis 97.3% og 86.2% af hundene med beskyttende titer. Der fandtes ikke statistisk sammenhæng med køn eller race. Hunde i aldersgruppen 5-14 år præsterede signifikant dårligere antistofrespons efter vaccination end yngre hunde. Ved gentestning af 4 udvalgte serumprøver fandtes høj grad af reproducerbarhed af testens resultater.

Indledning

I mange år har regelmæssige, årlige vaccinationer af hunde mod de alvorligste virussygdomme været en fast procedure hos smådyrspraktiserende dyrlæger verden over. Disse har tjent som basis for klientkontakt og årlige sundhedseftersyn og resulteret i en dramatisk reduktion i antallet af sygdomstilfælde relateret til livstruende sygdomme som hundesyge (CDV), parvovirus (CPV) og smitsom leverbetændelse (CAV) (1).

Samtidig har teknologien indenfor vaccineproduktion resulteret i stadig mere effektive vacciner og, samtidig med en øget bevågenhed overfor bivirkninger ved medicinsk behandling, har dette medført et ønske om mere nuancerede vaccinationsstrategier.

For øjeblikket opererer flere producenter af levende attenuerede vacciner med toårige intervaller for kernevacciner mod hundesyge, parvovirus og hepatitis, i efteråret 2005 indføres, som allerede anbefalet i USA (2), treårige intervaller (3) og snart forventes fireårige vaccinationsintervaller for kernevacciner indført (4).

Da mange faktorer er afgørende for, om et vaccineret dyr er effektivt beskyttet mod sygdom, er der opstået et behov for metoder, der hurtigt og pålideligt kan vurdere hundes immunstatus, før der tages stilling til evt. vaccination(1).

En række serologiske tests har været anvendt i en del år. Det drejer sig om virusneutralisationstests i forskellige udgaver, hæmagglutinationsinhibitionstest, fluorescenstest og andre. Fælles for dem er, at de er temmelig kostbare, tidskrævende og vanskelige at udføre.

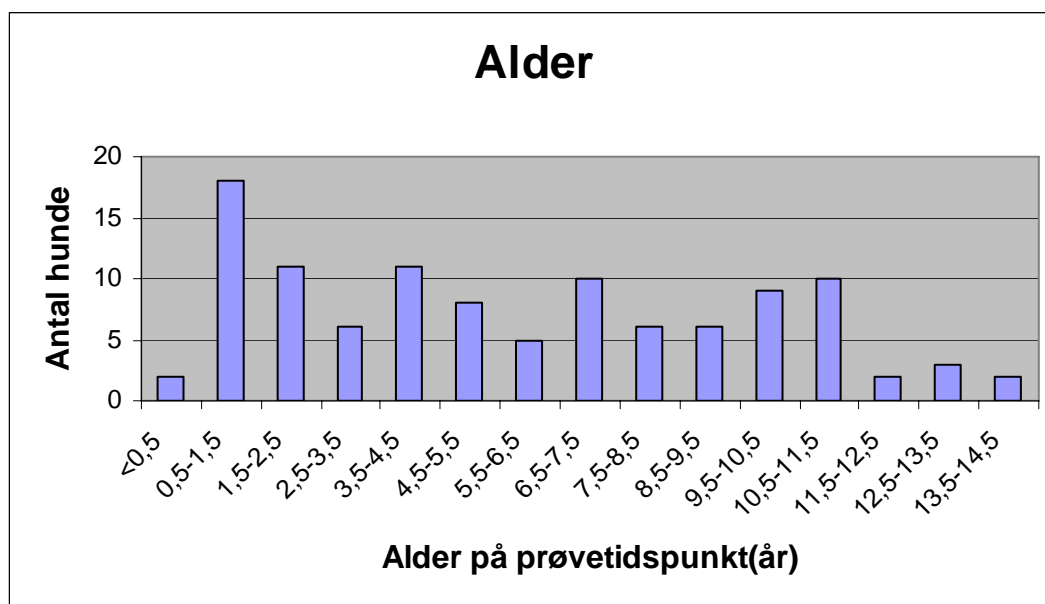
På en række områder har praksis fået adgang til hurtige diagnostiske ”in clinic” tests, ofte baseret på ELISA-teknikken, og en sådan er nu også til rådighed til bestemmelse af hundes antistofniveau overfor de to mest betydningsfulde virussygdomme i hundepopulationen: hundesyge og parvovirus. I det følgende beskrives denne test, den valideres i forhold til virusneutralisationstesten for hundesyge, og den anvendes i en undersøgelse af immunstatus overfor CPV og CDV hos 109 østjyske hunde.

Materialer og metoder

I perioden juni –04 til marts –05 blev blodprøver udtaget fra 109 østjyske hunde. 94 stammende fra egen praksis og 15 fra nabopraksis.

Blodprøverne stammede fra klinisk sunde hunde, enten indkaldt til årligt sundhedseftersyn (de fleste) eller i forbindelse med anden ikke decideret sygdomsmæssig behandling (ex. neutralisation, rutinemæssig tandrensning, HD-fotografering).

Der deltog 58 hun- og 51 hanhunde i undersøgelsen.



Aldersfordelingen på hunde var fra 4 mdr. til 13.5 år og gennemsnitsalderen var 5.8 år.

Race	Antal,abs
Beagle	1
Blanding	21
Border terrier	2
Boxer	3
Breton	1
Cairn Terrier	3
Cocker	3
Dansk-Svensk G.	4
Dværg Schnauz	1
Foxterrier	1
Gl. Dansk Høns.	1
Golden Retriever	4
Gravhund	5
Islandsk Fårehund	1
King Charles Sp.	2
Kleiner Münst.	1
Labrador	16
Pekingeser	2
Puddel	4
Rotweiler	3
Ruh. Hønsehund	2
Samojede	1
Schaefer	8
Skotte	1
Springer sp.	3
Yorkshire ter.	1

Tabel 1.

I alt 40 racer samt blandinger var repræsenteret i materialet.

Tabel 1 angiver antallet af hunde indenfor 27 racer, som også figurerer i Dansk Hunderegisters seneste opgørelse (5).

De 7 mest velrepræsenterede racer (markeret med mørk baggrund) blev undersøgt for statistisk signifikante forhold med chi square test.

I forbindelse med blodprøveudtagning blev hundenes race, køn, fødselsdato og dato for sidste vaccination, samt for årligt regelmæssigt vaccinerede hunde, også dato for næstsidste vaccination, registreret, og sammen med dato for blodprøveudtagning blev data lagt ind i excell regneark til beregning af alder på prøvetidspunkt samt interval fra sidste vaccination.

Den anvendte vaccine har til samtlige hunde været en levende, svækket vaccine: Nobivac fra Intervet; de seneste 2 år oftest som NobivacDHPlive, tidligere og for de sidste 15 hunde fra nabopraksis vedkommende som NobivacDHPPiL. Vaccinestammerne er identiske (CPV152, CDV Onderstepoort), og der skelnes i undersøgelsen ikke mellem de to vaccinekombinationer.

Der er i øvrigt ikke ændret på vaccinsens egenskaber siden den blev lanceret (3). Vaccinen blev opbevaret efter forskrifterne og vaccination blev foretaget subcutant dorsalt på halsen.

Blodprøver blev udtaget fra vena cephalica i ustabiliserede vacuumglas, efterladt til koagulering og centrifugeret, hvorefter serum blev afpippet. Ofte blev serum målt for antistofindhold samme dag, lejlighedsvis opbevaret i køleskab ved +5 gr.C i op til 3 dage før måling. Dette i

overensstemmelse med vejledningen til testkittet. Efter måling blev serumprøverne opbevaret på frost ved -18 gr.C før videreforsendelse til undersøgelse for hundesygevirusneutraliserende antistoffer ved virusneutralisationstest gennem Institut for Virologi og Immunologi, KVL. Til denne supplerende undersøgelse blev udvalgt 27 tilfældige serumprøver samt yderligere 5, der ved den anvendte ELISA-test (se senere) var faldet ud med lave titre for enten distemper, parvovirus eller begge.

Teknisk udførelse

Egen undersøgelse for antistofniveau (IgG) for distemper og parvovirus blev udført med "Immunocomb" ELISA-test (Biogal Galed Labs, Israel).

Det drejer sig om en klinikbaseret hurtigtest baseret på fastfase immunoassay teknologi.

Testen udføres med en plastik"kam", der på hvert ben er udstyret med 3 testfelter: Et indeholdende overfladebundet oprenset hundesygeantigen, et indeholdende parvovirusantigen samt et pretitreret kontrolfelt.

Første trin i testen er afsættelse af 5 mikroliter af den aktuelle serumprøve i 1. brønd i den medfølgende brøndplade (fuldblod / plasma kan også anvendes). Herved fortyndes denne. Kammen placeres nu i 1. brønd og evt. tilstedeværende hundesyge- og parvovirusantistoffer bindes til respektive kontrolfelter. I brønd 2 vaskes overskud af antistoffer væk. Brønd 3 indeholder enzymkonjugeret IgG, der bindes til antigen-antistofkomplekserne. I brønd 4 og 5 vaskes ikkebundet IgG bort, hvorefter en enzymatisk farvereaktion proportional med indholdet af hundesyge- og parvovirusIgG kan finde sted i den sidste brønd. Til sidst standses farveudvikling, og resultatet fikseres. Efter lufttørring kan resultatet aflæses og sammenholdes med farveomslaget på kontrolfeltet. Dette svarer til en "beskyttende" titer, der i denne test er sat svarende til en hæmagglutinationstiter (HI) for parvovirusantistoffer på 1:80 og en immunofluorescens titer (IF) for hundesygeantistoffer også på 1:80.

Ved aflæsningen tolkes et farveomslag mindst svarende til kontrolfeltets at svare til beskyttende titer. I manualen pointeres vigtigheden af, at samtlige reagenser afprøves ved stuetemperatur.

Producenten angiver for hundesygevirus en sensitivitet: 92.9% og en specificitet: 96.3% og for parvovirus en sensitivitet: 100% og specificitet: 88.9%. Værdierne er fremkommet ved test af henholdsvis 97(CDV) og 100(CPV) hunde med indirekte immunofluorescens test (IFA) som sand metode.

Den fundne +/- værdi indførtes i excell regneark sammen med data om de deltagende hundes race, køn, fødselsdato, dato for sidste vaccination samt dato for blodprøveudtagning.

Kontrol af CDV-resultater med virusneutralisationstest

Som nævnt blev i alt 32 serumprøver sendt til supplerende undersøgelse for CDV antistof-titer på KVL. Transporten foregik med ”ilpost” fra egen dybfrost (-18 gr.C). Ved modtagelse var serumprøverne stadig frosne.

Den anvendte antistofbestemmelse udført på KVL blev foretaget som en virusneutralisationstest (VN) efter mikroneutralisationsmetoden (6). Princippet er en bestemmelse af højeste titerfortynding af den aktuelle serumprøve inkuberet med hundesygevirus med beskyttelse mod cytopatogen effekt på en tilsat suspension af modtagelige celler. Testen blev udført som en dobbeltbestemmelse.

De fundne titerværdier blev oversat til +/- for sammenligning med ELISA-resultater med en mindste beskyttende titer sat til 1:80 og indført i regnearket med øvrige data.

Der blev ikke foretaget supplerende undersøgelser af ELISA-resultater på CPV-titer.

De fundne resultater blev bearbejdet og fremstillet grafisk i excell.

Statistiske sammenhænge i materialet søgtes påvist med chi square test.

Sammenhæng mellem ELISA- og VN-resultater belystes ved beregninger af kappa, sensitivitet og specificitet.

ELISA-testens validitet og praktiske anvendelse blev vurderet i forhold til litteratur på området, herunder en vurdering af betydningen for reviderede vaccinationsstrategier.

Gentestning af udvalgte serumprøver

For at belyse forhold omkring ELISA-testens reproducerbarhed blev 4 udvalgte serumprøver gentestet 13-16 mdr. efter den oprindelige prøvedato. Prøverne havde i den mellemliggende periode været opbevaret på dybfrost ved -18 gr.C.

Hver af de 4 serumprøver blev testet 3 gange i samme prøverunde .

Resultater

Med hensyn til materialet fandtes fordelingen på racer (Tabel 1) i store træk at være i overensstemmelse med Dansk Hunderegisters seneste opgørelse (5).

Hundesyge

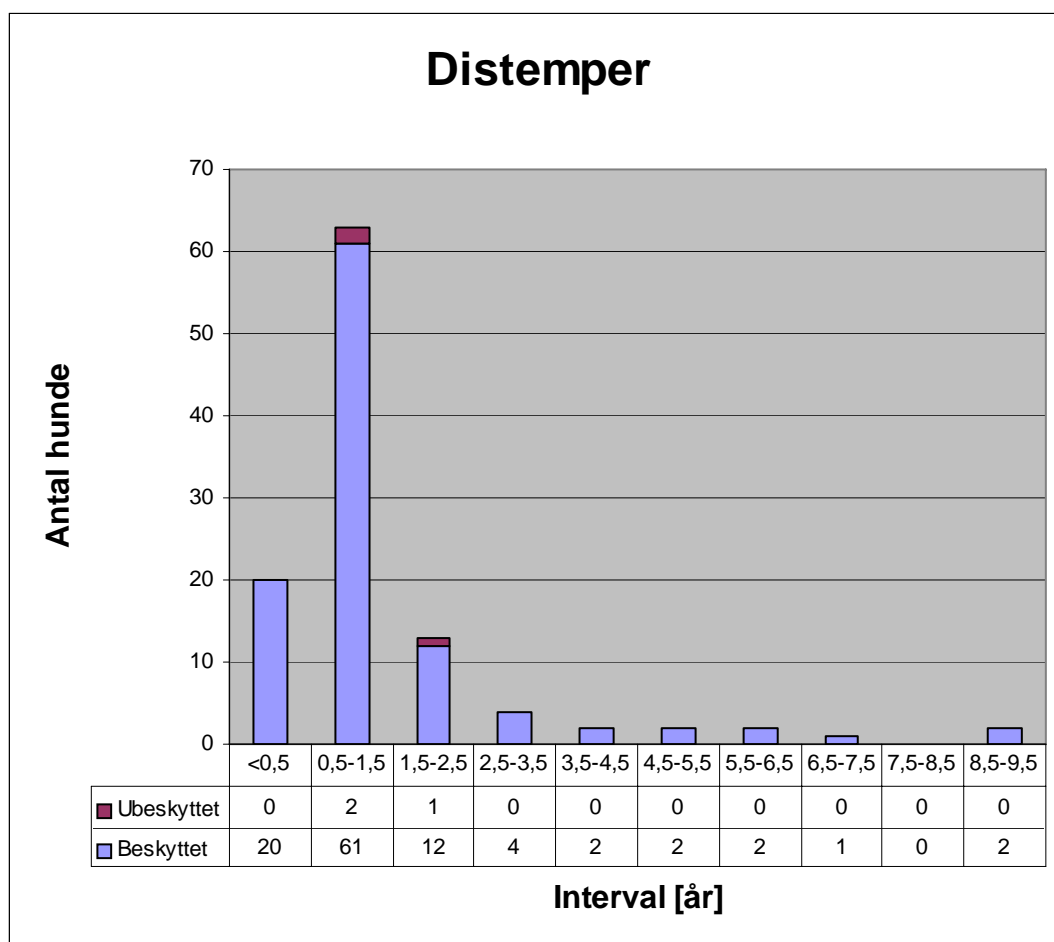


Fig. 2

Figur 2 viser fordelingen af hunde med og uden beskyttende hundesygetitre.

Intervallet angiver afstanden opgivet i år fra sidste vaccination, ”post vaccination” (PV), og selvom de fleste hunde ligger omkring det normale revaccinationstidspunkt ses 9 hunde (8.3%) med mere end 3.5 års interval stadig at have beskyttende titre.

Kun enkelte hunde (2.7%) fandtes ikke at have beskyttende antistoftitre, nemlig 3 stk., alle blandt ældre hunde 7,10 og 13 år gamle med et gennemsnit på 9.6 år. Alle 3 fandtes ligeledes ubeskyttede ved VN-test.

Intervalleret fra sidste vaccination for ubeskyttede hunde var kort, gennemsnitligt 10.7 mdr., og gruppen bestod af 1 han- og 2 tævehunde. På grund af det lille antal ubeskyttede hunde var beregninger over sammenhæng med race og køn ikke mulige.

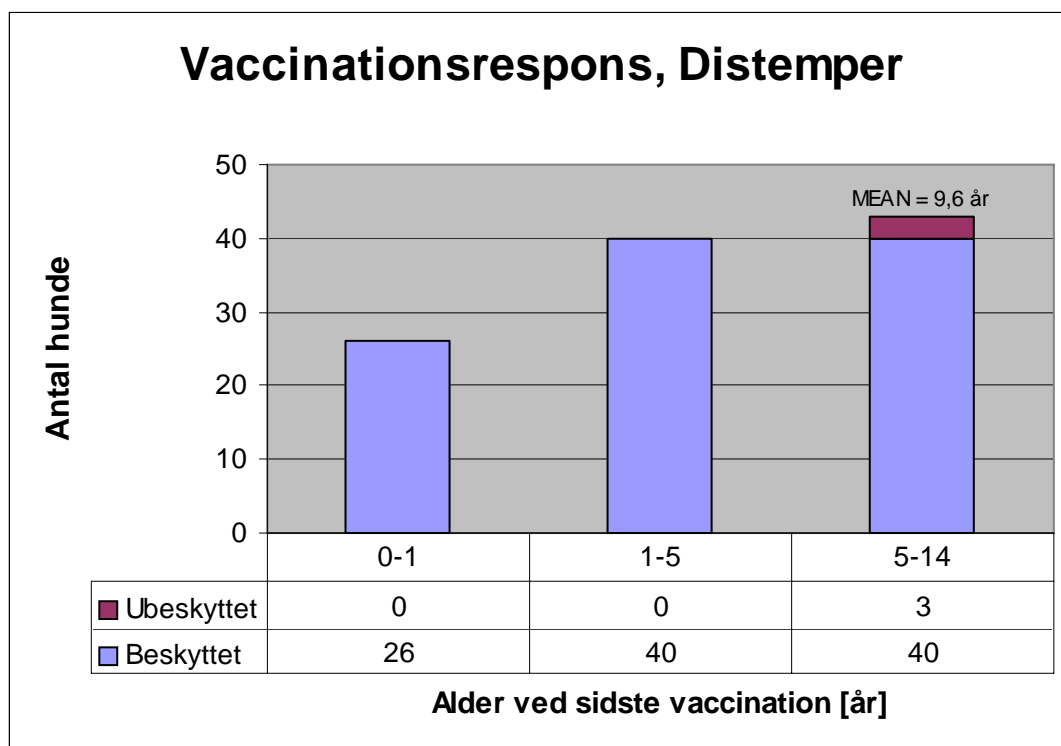


Fig. 3

Figur 3 deler materialet op i 3 aldersgrupper (0-1, 1-5 og 5-14 år) og viser sammenhængen mellem aldersgruppe på vaccinationstidspunkt og evnen til at opnå beskyttende titrer.

Samtlige ubeskyttede hunde var placeret i gruppen af ældre hunde, men materialet var for lille til at påvise signifikante forhold.

ELISA-test contra VN-test.

Som omtalt blev cut-of-værdien for beskyttende titer sat til 1:80 ved VN-testen og dette resulterede i en fordeling som følger:

	VN-positiv	VN-negativ	Total
ELISA-positiv	23	6	29
ELISA-negativ	0	3	3
Total	23	9	32

Til statistisk undersøgelse af overensstemmelsen mellem 2 tests kan værdien kappa beregnes. I dette tilfælde blev den beregnet til 0.46, hvor intervallet 0.4-0.6 angiver moderat overensstemmelse (7).

Divergensen drejer sig om 6 hunde, som VN-testen finder ubeskyttede modsat ELISA-testen. Det drejer sig fortrinsvis om ældre hunde med gennemsnitsalder på 8 år og med et gennemsnitligt interval til sidste vaccination på 1.6 år.

Med VN-testen ophøjet til ”golden standard” og en beskyttende titer sat til 1:80 giver dette følgende værdier for ELISA-testen:

Sensitivitet: 100%

Specificitet: 33%

Pos. prædiktiv værdi: 0.79

Neg. prædiktiv værdi: 1.0

Parvovirus

Ved undersøgelsen fandtes totalt 15 hunde (13.8%) med titre under beskyttende niveau.

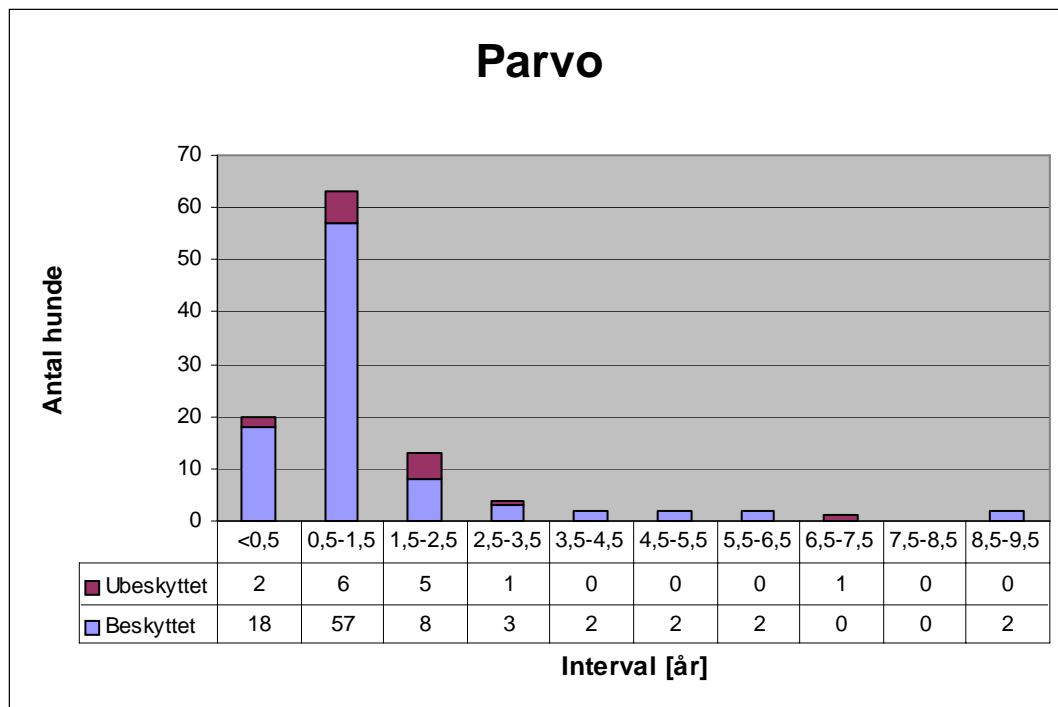


Fig. 4

Figur 4 viser fordelingen af hunde med og uden beskyttende parvovirustitre i forhold til afstand fra sidste vaccination (PV) angivet i år.

Intervallet angiver afstanden fra sidste vaccination. Der er signifikant flere ubeskyttede hunde i gruppen 1.5-2.5 år PV (Yates korr.P: 0.02) sammenlignet med resten af gruppen.

Som ved hundesyge ses et antal hunde over 3.5 år PV, 8 stk., 7.3% stadig med beskyttende titer.

Der fandtes ingen statistisk signifikant sammenhæng mellem køn, race og titerstatus.

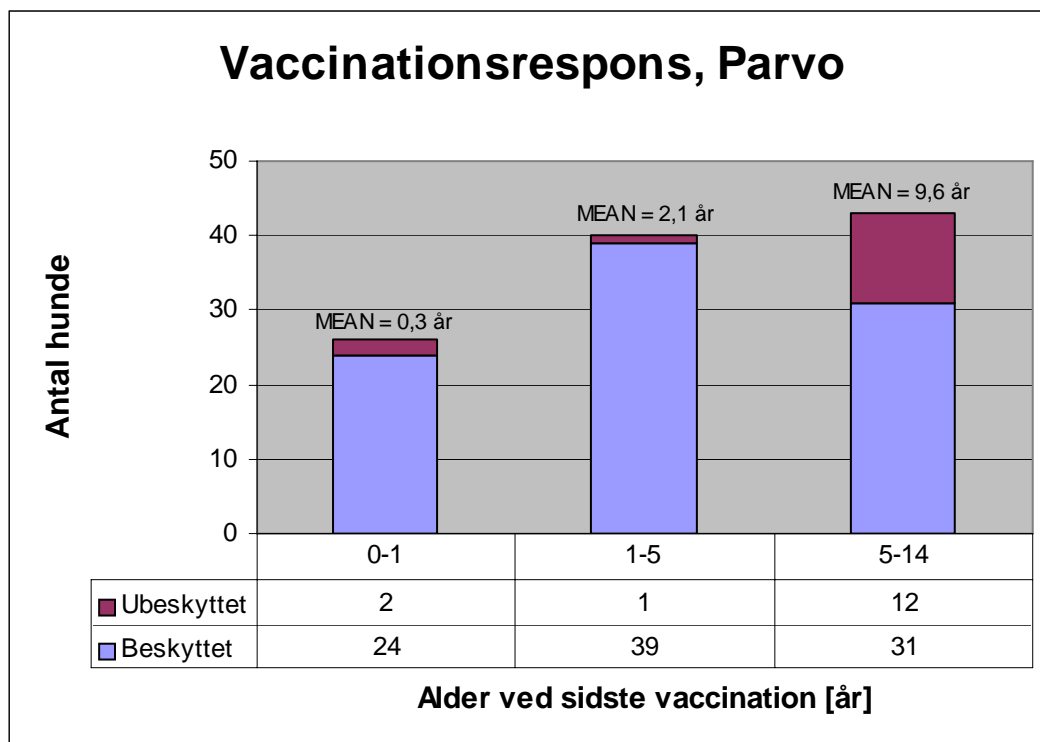


Fig. 5

Figur 5 deler materialet op i 3 aldersgrupper (0-1, 1-5 og 5-14 år) og viser fordelingen af beskyttede/ubeskyttede hunde i forhold til alder ved sidste vaccination.

12 ud af 15 (80%) af ubeskyttede hunde befandt sig i gruppen 5-14 år.

Der var hermed signifikant flere ældre hunde, der responderede dårligt på vaccination i forhold til resten af gruppen (Yates korr. P: 0.001).

Gentestning af udvalgte serumprøver

De 4 udvalgte serumprøver var følgende:

Nr. 44. Ved 1. test fundet under grænseværdi for parvo, over grænseværdi for hundesyge

Nr. 52. Ved 1. test fundet over grænseværdi for parvo, over grænseværdi for hundesyge

Nr. 78. Ved 1. test fundet over grænseværdi for parvo, under grænseværdi for hundesyge

Nr. 105. Ved 1. test fundet under grænseværdi for parvo, under grænseværdi for hundesyge

Ved gentestning 13-16 mdr. senere fandtes følgende:

Nr. 44. Over grænseværdi for parvo, over grænseværdi for hundesyge

Nr. 52. Over grænseværdi for parvo, over grænseværdi for hundesyge

Nr. 78. Over grænseværdi for parvo, under grænseværdi for hundesyge

Nr. 105. Under grænseværdi for parvo, under grænseværdi for hundesyge

Ved gentestningen af de 4 udvalgte serumprøver fandtes fuldstændig overensstemmelse mellem de 3 afprøvninger af samme serumprøve.

Diskussion

Den benyttede ELISA-test er fra producentens side angivet med acceptable værdier for sensitivitet og specificitet.

Testen er hurtig og nem at udføre og kan bidrage til mulighederne for en vurdering af sygdomsbeskyttelse, især ved god korrelation med allerede anvendte, mere vanskelige og tidskrævende tests (8).

Desværre har denne undersøgelses resultater for hundesyges vedkommende med en cut-off værdi på 1:80 umiddelbart ikke vist overbevisende overensstemmelse med en anerkendt målemetode som virusneutralisationstesten. Sidstnævnte er et direkte mål for tilstedeværende antistoffers biologiske aktivitet, og betragtes ofte som "golden standard".

Den relativt høje cut-off værdi på 1:80 er sat i forhold til stor divergens i opfattelsen af, hvor niveauet for beskyttende titer skal ligge (9,10,11).

Her er spørgsmålet imidlertid om VN-testens cut-off værdi i virkeligheden skulle have været sat væsentligt lavere; om hundene ikke er fuldt beskyttede og i stand til at rejse et adækvat immunsvær allerede ved 1:40 eller lavere endnu. I en undersøgelse af varigheden af det serologiske respons fandt Mouzin et al. en meget stor procentdel af hundene (CDV: 98.4%) beskyttede 4 år eller længere efter sidste vaccination. Kriteriet var en VN-titer på mindst 1:32 eller mindst en 4-fold stigning af titer i forbindelse med vaccination (12).

Vurderet efter disse principper er der god overensstemmelse mellem ELISA- og VN-testen, idet de 3 hunde, der blev fundet ubeskyttede med ELISA-testen også repræsenterede VN-testens 2 laveste testværdier (mindre end 1:10 og 1:20) og en værdi på 1:40, der med en oplyst testusikkerhed på et fortyndingstrin (4) kunne have været lavere.

I forbindelse med CPV anvender Mouzin et al. cut-off værdien 1:80 i HI eller, som ved CDV, en 4-fold stigning i titerrespons ved vaccination og opnår 98.1% hunde beskyttet i 4 år eller mere.

Dette er væsentligt højere end de fundne 86.3 ved undersøgelsen af danske hunde med ELISA.

Divergensen opstår ved de ikke mindre end 12 hunde, der optræder i gruppen 5-14 år. Disse vil højst sandsynligt ikke være modtagelige for smitte med CPV, der næsten udelukkende rammer hvalpe og unghunde, og forklaringen på deres manglende antistofrespons kan ligge i biologiske

individuelle forskelle, hvor den enkelte hund har et toppunkt uden mulighed for yderligere påviselig titerstigning (13,1). Hvis man derfor ser bort fra den sidste gruppe af ældre hunde, kan andelen af ubeskyttede hunde udregnes til 4.5%, hvilket svarer til hvad andre lignende undersøgelser når frem til (12,11).

Hovedparten af de ældre hunde med lav CPV-titer er i øvrigt relativt nyvaccinerede, de fleste i gruppen 1.5-2.5 år PV, og er derfor også ansvarlige for den signifikante overrepræsentation af ubeskyttede hunde i denne gruppe (Fig. 4).

Endvidere skal det huskes, at titerværdien kun udtrykker B-celleresponsen på infektion, og at hunde med lave titre udmærket kan være godt beskyttede af deres cellemedierede, T-cellebetingede immunrespons, der måske netop i relation til intracellulære infektioner, som CPV og CDV har stor betydning (12,14).

I den forbindelse kan der argumenteres for en kritisk vurdering af den enkelte hund, også i forbindelse med det fundne antistofniveau: En lav titer hos den yngre hund må anses for mere belastende end hos den ældre hund, og derfor i højere grad udløse en ekstra vaccination.

Ligeledes bør hundens daglige miljø, og dermed smitterisiko, indgå i vurderingen (12).

Forvirringen omkring serologien og cut-off værdier slår naturligt nok igennem i debatten om vaccinationsanbefalinger blandt andet i "the American Animal Hospital Association's" vaccinations guidelines, der efterlyser standardiseringer mellem forskellige laboratorier og en afklaring af forholdet mellem titer og graden af beskyttelse mod sygdom (2).

ELISA-testen har i andre sammenhænge været afprøvet og fundet stor anvendelse; specielt flere israelske undersøgelser har benyttet den: En undersøgelse benyttede samtidig Hæmagglutinationstest (HI) og Immunocomb ELISA til kortlægning af CPV-antistofniveau på 124 tilfældige serumprøver fra hunde og fandt god korrelation ($r:0.89$). Samme undersøgelse bestemte IgG mod CPV hos parvosmittede ikke-vaccinerede hvalpe med ELISA-testen (15).

En anden undersøgelse beskæftiger sig med antistofmåling med ELISA test kit hos CPV-smittede hunde med god korrelation til detektion af virus i fæces (16).

Flere undersøgelser beskæftiger sig med forholdet materielle antistoffers hæmmende effekt ved tidlig vaccination af hvalpe og måling af serumIgG til afklaring af mulig/manglende tidlig immunisering af hvalpe (17,18,19). Antistofniveau måles for CPV mod HI-test, for CDV mod VN-test og der findes i alle tilfælde god overensstemmelse med ELISA-testen.

En undersøgelse fandt god overensstemmelse (CDV IgG $r:0.89$, CPV IgG $r:0.90$) mellem ELISA-test og immunofluorescens-test ved målinger af IgM og IgG på 100 hundesera (20).

Ovenstående undersøgelser understøtter ELISA-testens validitet, og den er derfor benyttet i den aktuelle undersøgelse af danske hunde uden andre betænkeligheder, end der altid knytter sig til forhold omkring diagnostiske tests sensitivitet, specificitet og prævalens af den undersøgte tilstand. Et væsentligt statistisk forhold spiller nemlig her ind, idet der er tale om en tilstand med en meget høj prævalens, nemlig antistofpositive hunde, der for både CPV og CDVs vedkommende kan antages at ligge omkring 95% (12).

Ved stigende prævalens af en undersøgt tilstand falder den prædiktive værdi af et negativt testresultat, mens værdien stiger for et positivt resultat (21). Da vi på enkeltdyrniveau jo netop er interesseret i at finde ”ubeskyttede” hunde med lav titer betyder dette i praksis, at mange af disse vil være falsk negative, og derfor vil blive vaccinerede uden grund. Dette er dog at foretrække frem for en situation med mange falsk positive, der ville resultere i, at ubeskyttede individer ikke ville blive fundet og vaccinerede (12).

En mangel ved den aktuelle undersøgelse er udeladelse af en negativ kontrolgruppe af ikke-vaccinerede hunde i forskellige aldersgrupper. Herved mangler information om evt. uspecifikke reaktioner/immunisering fra gadevirus. Årsagen er mangel på kontakt til et aldersmæssigt bredt sortiment af uvaccinerede hunde på klinikken.

Ved aflæsning af Immunocomb ELISA-testen fandtes ingen testfelter totalt uden farveomslag, og dette kunne tolkes som tilstedeværelse af lave mængder antistof og dermed en vis grad af immunitet også hos ”ubeskyttede” hunde. Denne slutning kunne dog ikke drages uden negativ kontrolgruppe. 2 uvaccinerede hunde blev dog testet i forbindelse med projektet: En 8 mdr. gammel labradorhvalp indbragt til kastration og en 12 år gammel blandingshund. Ingen af dem kunne præstere noget farveomslag på kontrolfelter for hverken CPV- eller CPD-antistoffer. Førstnævnte hvalp blev vaccineret i forbindelse med kastrationen og blev testet igen 10 dage senere og fundet fuldt beskyttet.

Resultaterne af gentestningen efter 13-16 mdr. viser overensstemmelse med tidligere fundne resultater undtagen for en hunds vedkommende, nemlig hund nr. 44, hvor en tidligere for lav titer for parvo ved gentestning findes over grænseværdien. De 4 prøver er udvalgt blandt resultater akkurat over eller under kontrolfeltets indikation af beskyttende titer, og små forskelle i testens fysiske udførelse, herunder reagensernes temperatur og omhu med blanding af reagenser i de forskellige brønde under nedsænkning af Immunocomb-kammens ben, kan forklare den lille divergens mellem 1. test og gentestningen. Ved gentestningen fandtes fuldstændig

overensstemmelse mellem farveomslag blandt de 3 afprøvninger af samme serumprøve som udtryk for stor homogenitet af ELISA-testen ved afprøvning under samme fysiske forhold.

Konklusion

Immunocomb Elisatesten er fremstillet som et hurtigt og praktisk hjælpemiddel i forbindelse med vurderingen af vaccinationsbeskyttelse mod to af de alvorligste virulente patogener rettet mod hundepopulationen. Nærværende undersøgelse har, for hundesyges vedkommende, fundet god overensstemmelse med en anerkendt testmetode, virusneutralisationstesten. I forbindelse med parvovirusinfektion er de fundne resultater i overensstemmelse med lignende udenlandske undersøgelser. Graden af overensstemmelse varierer dog med valget af antistofniveau for beskyttelse i den enkelte testopstilling.

Testresultater er fundet i høj grad reproducerbare ved gentagne testninger; dog bør testprotokollen følges nøje for at undgå fejlagtige fund af for lave serumtitre.

Der er ved undersøgelse af serumprøver fra 109 danske hunde fundet langvarig beskyttende immunitet mod både hundesyge og parvovirus hos hunde op til 9 år efter sidste vaccination.

97.3% fandtes beskyttede mod hundesyge og 86.2% fandtes beskyttede mod parvovirus.

Størstedelen (80%) af hunde med lave titre under grænsen for beskyttelse mod parvovirus fandtes blandt hunde i aldersgruppen 5-14 år.

I forbindelse med ændrede vaccinationsstrategier kan testen tjene som en forsikring for dyrlæger og ikke mindst hundeejere om, at hunde har en acceptabel grad af beskyttelse, også i forbindelse med øgede vaccinationsintervaller.

Testen har også sin berettigelse i forbindelse med vurderingen af vaccinationsbehov hos hunde med erkendt/mistanke om bivirkninger ved vaccination.

Tak til:

Jørgen Kruuse for sponsorering af testkits.

Merete Blixenkroner-Møller og Trine Hammer, Institut for Virologi og Immunologi, KVL for udførelse af VN-tests og hjælp undervejs.

Jacob Daasbjerg, Bjerringbro Dyrehospital, for bidrag til prøvematerialet.

Bilag A: Excell regneark med resultater af Immunocomb ELISA test af 109 serumprøver.

Litteraturliste

1. **Tizard, I., Ni, Y.:** Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. Journal of the American Veterinary Medical Association 1998, Vol 213, 54-60
2. **Paul, M.A., Appel, M., Barret, R., et al. Report of the American Animal Hospital Association. Canine Vaccine Task Force:** Executive Summary and 2003 Canine Vaccine Guidelines and Recommendations. Journal of the American Animal Hospital Association 2003 39(2), 119-131
3. **Skelborg, H.** Intervet: Personlig meddelelse. 2005, September.
4. **Blixenkrone-Møller, M.** Institut for Virologi og Immunologi, KVL.: Personlig meddelelse. 2005, September
5. **Dansk Hunderegister:** Racestatistik. Skriftelig meddelelse. 2005, Aug.
6. **Appel, M., Robson, D.S.:** Microneutralization Test for Canine Distemper Virus. American Journal of Veterinary Research 1973, 34, 1459-63
7. **Pfeiffer, D.U.:** Interpretation of Diagnostic tests. Veterinary Epidemiology – An Introduction. University of London, London 2002, pp 38-9
8. **Blixenkrone-Møller, M., Østerbye, J.:** Vendepunkt i retningslinjer for vaccination af Hund. Dansk Veterinær Tidsskrift 2004, 24, 6-11
9. **McCaw, D.L., Thompson, M., Tate, D., Bonderer, A., Chen, Y.:** Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. Journal of the American Veterinary Medical Association 1998, 213, 72-5
10. **Coyne, M.J., Burr, J.H.H., Yule, T.D., Harding, J., Tresnan, D.B., McGavin, D.:** Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. Veterinary Record. London British Veterinary Association 2001, 147(17), 509-15
11. **Twark, L., Dodds, W.J.:** Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 2000, 217(7), 1021-24
12. **Mouzin, D.E., Lorenzen, M.J., Haworth, J.D., King, V.L.:** Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 2004, 224(1), 55-60
13. **Gorham, J.R.:** Duration of Vaccination Immunity and the Influence on Subsequent Prophylaxis. Journal of the American Veterinary Medical Association 1966, 149(5), 699-704

14. **Waner, T.:** A review of current international vaccination trends for dogs and cats. Israel Journal of Veterinary Medicine 2004, 59(3), 33-38
15. **Naveh, A., Waner, T., Wodowski, I., Zekaria, D., Harrus, S., Freeman, E., Fuchs, P., Olshevsky, U.:** A rapid self-contained immunoblot ELISA test kit for the evaluation of antibody to canine parvovirus in dogs. Proc. 3rd Congree Europ. Soc. Vet. Virol. 1995, 218-221
16. **Waner, T., Keren-Kornblatt, E., Shemesh, O., Mazar, S.:** Diagnosis of acute canine parvovirus infection in naturally infected dogs using serum IgM and IgG rapid dot ELISA. Israel Journal of Veterinary Medicine 2004, 59, 12-15
17. **Waner, T., Naveh, A., Schwartz Ben Meir, N., Babichev, Z., Carmichael, L.E.:** Assesment of Immunization Response to Canine Distemper Virus Vaccination in Puppies Using a Clinic-based Enzyme-linked Immunosorbant Assay. The Veterinary Journal. 1998, 155, 171-75
18. **Waner, T., Naveh, A., Wudovsky, I., Carmichael, L.E.:** Assesment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1996, vol 8, 427-32
19. **Waner, T. Noam, J., Mazar, S.:** Post-vaccination evaluation of the immunization status of puppies for canine parvo- and distemper viruses using an in-clinic ELISA test. Israel Journal of Veterinary Medicine 2003, 58(4), http://www.isrvma.org/article/58_4_3.htm
20. **Waner, T., Mazar, S., Nachmias, E., Keren.Kornblatt, E., Harrus, S.:** Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. Veterinary Record 2003, vol 10, 588-591
21. **Moore, G.E., Glickman, L.T.:** A perspective on vaccine guidelines and titer tests for dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 2004, 224(2), 200-203