

30. Kitamura M., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: J. Bact. 98, 1173, 1969.
31. Knorr J. N., Brown W. P., Spero L.: Biochem. biophys. Acta 214, 350, 1970.
32. Kozaki S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 11, 932, 1975.
33. Kozaki S., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 10, 750, 1974.
34. Kozaki S., Sugii S., Ohishi I., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 70, 1975.
35. Lamanna C., Lowenthal J. P.: J. Bact. 61, 751, 1951.
36. Lamanna C., Sakaguchi G.: Bact. Rev. 32, 242, 1971.
37. Miyazaki S., Iwasaki M., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 17, 395, 1977.
38. Nakane H., Iida H.: Appl. Environ. Microbiol. 34, 99, 1977.
39. Oguma K., Iida H., Shiozaki M.: Infect. Immun. 14, 597, 1976.
40. Oguma K., Iida H., Shiozaki M., Inoue K.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 301, 1975.
41. Ohishi I., Sakaguchi G.: Appl. Microbiol. 28, 923, 1974.
42. Ohishi I., Sakaguchi G.: Appl. Microbiol. 29, 444, 1975.
43. Ohishi I., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 17, 402, 1977.
44. Ohishi I., Sugii S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 16, 107, 1977.
45. Ross H. E., Warren M. E., Barnes J. M.: J. gen. Microbiol. 3, 148, 1949.
46. Sakaguchi G., Ohishi I., Kozaki S., Sakaguchi S., Kitamura M.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 95, 1974.
47. Sakaguchi G., Sakaguchi S.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 241, 1974.
48. Sakaguchi G., Sakaguchi S., Imai N.: J. Bact. 87, 401, 1964.
49. Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S., Ohishi I.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 181, 1974.
50. Schantz E. J., Gasper E.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 66, 1975.
51. Schantz E. J., Spero L.: cyt. według poz. 56.
52. Shimizu T., Kondo H.: Jap. J. med. Sci. Biol. 26, 269, 1973.
53. Smith L. D., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria CH. C. Thomas, Springfield, USA 1968.
54. Sugii S., Ohishi I., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 16, 910, 1977.
55. Sugii S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 12, 1262, 1975.
56. Sugii S., Sakaguchi G.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 320, 1975.
57. Sugiyama H., DasGupta B. R., Yang K. Ch.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 143, 589, 1973.
58. Sugiyama H., Moberg L. J., Messer S. L.: Appl. Environ. Microbiol. 33, 963, 1977.
59. Syuto B., Kubo S.: Appl. Environ. Microbiol. 32, 400, 1977.
60. Turner A. W., Rodwill A. W.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 21, 17, 1943.
61. Wagman J.: cyt. według poz. 50.
62. Wagman J., Bateman J. B.: Archs Biochem. Biophys. 45, 375, 1953.
63. Yang H., Sugiyama H.: Appl. Microbiol. 29, 592, 1975.
64. Yang H., Sugiyama H.: Appl. Microbiol. 29, 598, 1975.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2 m. 7, 20-336 Lublin.

MICHAŁ BARTOSZCZE, JACEK ROSZKOWSKI, STANISŁAW BRODZICKI
Puławy Kraków

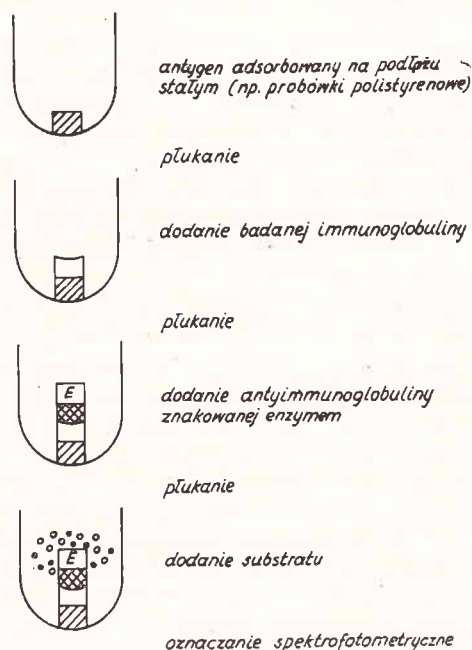
Zastosowanie immunoenzymatycznej metody ELISA w diagnostyce wirusologicznej

Zastosowanie w ostatnich latach enzymów do znakowania przeciwciał pozwoliło na wprowadzenie wysoce swoistych i czułych metod jakościowego wykrywania wirusów (2, 12). Metody te w coraz większym stopniu zaczynają zastępować stosowane do niedawna, ale obciążone szeregiem wad, immunofluorescencję i techniki radioimmunologiczne.

W 1971 r. Engvall i Perlmann (9, 10) oraz niezależnie Van Weemen i Schuurs (19) wprowadzili immunoenzymatyczną technikę, zwaną w skrócie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), pozwalającą na ilościowe oznaczanie przeciwciał i antygenów w materiale biologicznym. Technika ta oparta jest na zasadzie chromatografii powinowactwa, w której jeden z rozpuszczalnych składników (przeciwciało lub antygen) adsorbuje się trwale na stałym podłożu-nośniku. W dalszym etapie przyłącza się do niego obecny w badanym materiale antygen lub przeciwciało, a wytworzony kompleks łączy się z przeciwciałem znakowanym enzymem. Po dodaniu odpowiedniego dla enzymu substratu, oznacza się fotometrycznie stopień hydrolizy substratu przez enzym i na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się o zawartości przeciwciał lub antygeny w testowanym materiale.

Do najczęściej stosowanych w technice ELISA metod należą: pośrednia metoda znakowanych antyglobulin do oznaczania przeciwciał (ryc. 1) oraz tzw. metoda „podwojonych” przeciwciał do oznaczania antygeny (ryc. 2). W pierwszej z nich, do pokrytych antygenem nośników (np.

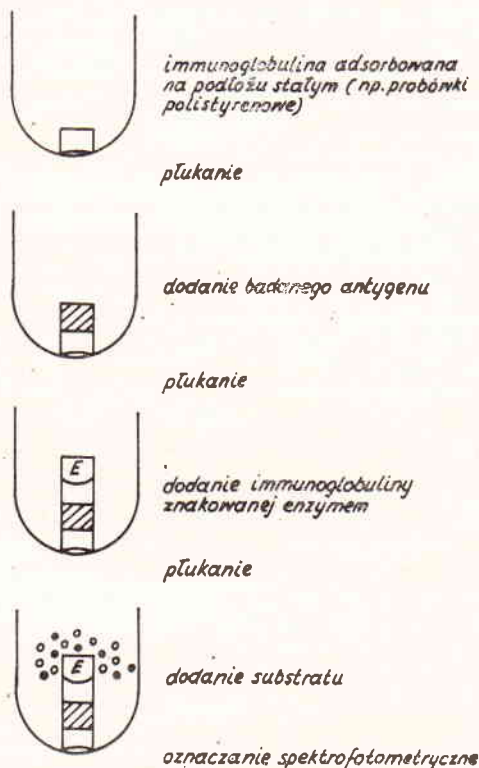
próbówek) dodaje się badaną surowicę, a po przepłukaniu — znakowaną enzymem antyglobulinę i odpowiedni substrat. Obecne w próbówce przeciwciała wiążą się z antygenem, a następnie z antyglobuliną znakowaną enzymem. W



Ryc. 1. Pośrednia metoda znakowanych antyglobulin do wykrywania przeciwciał

przypadku braku przeciwciał wszystkie składniki z wyjątkiem antygeny zostaną wypłukane.

W metodzie „podwojonych” przeciwciał do pokrytych przeciwciałem nośników dodaje się badany antygen, a po przepłukaniu — przeciwciała znakowane enzymem oraz substrat. Obecny w próbce antygen ulega w tym przypadku związaniu ze swoistym przeciwciałem oraz z przeciwciałem znakowanym enzymem. Przy braku swoistości między składnikami zarówno antygen, jaki i znakowane przeciwciała zostaną wypłukane.



Ryc. 2. Metoda „podwojonych” przeciwciał do oznaczania antygeny

Stosowane są ponadto bardziej złożone modyfikacje opisanych powyżej metod (15, 20, 23), dające duże możliwości badawcze.

Do wykonania odczynu stosuje się najczęściej polistyrenowe probówki lub płytki, a także inne nośniki (3, 17, 20, 23). Zwraca się uwagę na konieczność wstępnego przebadania nośników przeznaczonych do testu ELISA (3). Stwierdzono, że płytki lub probówki pokryte przeciwciałami lub antygenem mogą być przez dłuższy czas przechowywane w niskich temperaturach i użyte do badań (23, 27).

Do znakowania przeciwciał stosuje się najczęściej fosfatazę zasadową i peroksydazę chrzanową. Pierwszy enzym posiada wysoką aktywność, a używany dla niego substrat (fosforan p-nitrofenylu) jest tani i dostępny w handlu. W wyniku reakcji zachodzącej w obecności jonów magnezu, powstaje jasnożółty produkt, którego intensywność oceniać można spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm, a także

wzrokowo. Bardzo dobrym enzymem jest peroksydaza chrzanowa, także wysoce aktywna, a przy tym znacznie tańsza od fosfatazy zasadowej. Jako substratu używa się dla niej najczęściej kwasu 5-aminosalicylowego, przy rozkładzie którego w obecności H_2O_2 powstaje brązowy produkt reakcji (maksymalna absorpcja 440 nm). Preparaty znakowane tymi enzymami wykazują dużą trwałość, a przechowywane w niskich temperaturach nie tracą swej aktywności katalitycznej przez długi czas (12).

Ze względu na swoje walory ELISA znajduje coraz częstsze zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, a zwłaszcza w parazytologii, bakteriologii, endokrynologii i immunopatologii. Bliższe dane na ten temat zawarte są w szeregu opracowań przeglądowych (20, 23). Istnieją także doniesienia wskazujące na udane próby zastosowania tego testu w wirusologii, zarówno przy wykrywaniu antygenów wirusowych, jak i przeciwciał.

O pierwszych próbach zaadaptowania testu ELISA do wykrywania antygenów wirusowych donieśli Voller i wsp. (24). Autorzy ci posługując się płytkami polistyrenowymi do mikrohemaglutynacji wykrywali wirusy roślinne w stężeniu 10–80 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie uzyskanych wyników wyrażają przy tym pogląd, że test ten znajdzie duże zastosowanie w diagnostyce, zwłaszcza w badaniach epidemiologicznych z uwagi na szybkość, prostotę wykonania oraz dużą swoistość. Przydatność omawianej techniki do wykrywania wirusów roślinnych potwierdzili Clarke i Adams (5).

Zastosowano także test ELISA do wykrywania wirusów ludzkich i zwierzęcych obecnych w płynach zakażonych hodowli oraz w materiale pochodzącym od zakażonych wirusami ludzi i zwierząt (7, 8, 15, 23, 25, 26, 27). Wykorzystując serologiczne powinowactwo między wirusami NCD (rotawirus cieląt) i IGE (rotawirus biegunki dzieci) użyto testu ELISA do wykrywania zakażeń u dzieci, posługując się znakowanymi przeciwciałami dla wirusa NCD (8).

Przy porównaniu czułości metody ELISA z innymi testami stosowanymi do wykrywania antygenów wirusowych stwierdzono na ogół zbieżność otrzymanych rezultatów (8, 27), a w niektórych przypadkach, jak np. przy wykrywaniu rotawirusów cieląt uzyskano lepsze wyniki, niż przy użyciu mikroskopu elektronowego i immunoelektroosmoforezy (7). W odniesieniu do rotawirusów cieląt czułość metody wynosi od 1–30 ng/ml (7, 15).

Przydatność odczynu ELISA wykazano także przy badaniu surowic na obecność przeciwciał dla szeregu wirusów, jak np.: różyczki (3, 21, 22), odry (23), cytomegalii (16, 22, 23), grypy (4, 6), parainfluenzy (4), opryszczki zwykłej (11, 23), Coxsackie, adenowirusów (23), rzekomego pomoru drobiu (20), japońskiego zapalenia mózgu (23), wścieklizny (1, 18) i innych. Autorzy tych badań stwierdzili dużą zgodność wyników

uzyskanych tą metodą z innymi odczynami serologicznymi (1, 14, 16, 21, 23). W niektórych przypadkach np. w odniesieniu do przeciwciał dla wirusów grypy czułość odczynu ELISA okazała się 8-krotnie większa, niż odczynu OWD (4) i około 8–20-krotnie większa, niż odczynu HI (4, 6).

Przy użyciu testu ELISA wykazano możliwość różnicowania poszczególnych klas przeciwciał dla wirusów cytomegalii (16), wścieklizny (18), różyczki (22), co w niektórych przypadkach posiada dużą wartość diagnostyczną, gdyż pozwala na określenie fazy rozwoju choroby.

Jak wykazał Atanasiu (1) testem ELISA wcześniej wykrywa się przeciwciała u ludzi szczepionych p. wściekliznie, aniżeli innymi metodami.

Zgodnie podkreśla się wysoką swoistość metody ELISA zarówno przy wykrywaniu wirusów, jak i specyficznych dla nich przeciwciał (1, 3, 5, 6, 20, 24, 27).

Zwrócono uwagę, że pewne czynniki mogą wpływać ujemnie na swoistość metody i dawać reakcje fałszywie dodatnie. Należy do nich m. in. czynnik reumatoidalny u ludzi oraz zakażenia bakteryjne (16). Nie stanowi to jednak istotnej przeszkody, gdyż próbki można wstępnie poddać badaniom na obecność czynnika reumatoidalnego (test lateksowy), a zakażeniom bakteryjnym skutecznie zapobiega się przez dodanie do surowicy azydoku sodu (NaN_3), co nie ma ujemnego wpływu na przebieg odczynu. Na swoistość odczynu wpływa niekiedy także rodzaj użytego antygenu. Chociaż na ogół antygeny dostępne w handlu i stosowane do innych odczynów serologicznych okazały się przydatne także w teście ELISA (22, 23), to w niektórych przypadkach antygen winien być przystosowany we własnym zakresie, a jego przydatność do testu sprawdzona eksperymentalnie (3, 23, 16). Oddziaływanie innych czynników, takich jak czasu adsorpcji, stężenia konjugat itp. wpływających na wyniki odczynu ELISA omawiają szczegółowo w pracach przeglądowych Voller i wsp. (23) oraz Bidwell i wsp. (3).

Z licznych walorów odczynu ELISA na podkreślenie zasługuje małe zużycie odczynników do tego testu. Stwierdzono np., że dla oznaczenia przeciwciał dla wirusa cytomegalii zużywa się mniej antygenu, niż w rutynowym teście OWD (16).

Również małe jest zużycie surowic do testu (4), a w szczególnych sytuacjach wystarczająca jest nawet niewielka ilość surowicy otrzymana w mikrokapilarach (3).

Stosując test ELISA możliwe staje się ograniczenie stosowania w diagnostyce wirusologicznej hodowli tkankowych, których prowadzenie następcza czasem poważne trudności, nawet dla pracowni specjalistycznych. W tej sytuacji diagnostykę wirusologiczną prowadzić można w każdym średnio wyposażonym laboratorium nie dysponującym możliwościami prowadzenia hodowli komórkowej.

Wykorzystując możliwość wzrokowej oceny wyników testu ELISA, odczyn ten można stosować w szerokim zakresie w badaniach epizootologicznych i epidemiologicznych w warunkach terenowych. Obserwowana zgodność wyników oceny wzrokowej z analizą spektrofotometryczną potwierdza taką możliwość (16, 27).

Metoda ELISA stwarza duże możliwości prowadzenia badań „masowych”. Opracowano np. ilościową automatyczną metodę dla oznaczania przeciwciał dla wirusa grypy (13). W technice tej porównanie wartości między badaną surowicą a surowicą standardową dokonuje zaprogramowany kalkulator połączony ze spektrofotometrem. W niektórych krajach wprowadza się w pełni zautomatyzowane systemy o bardzo dużej wydajności.

Piśmiennictwo

1. Atanasiu P., Savy V., Perrin P.: Ann. Microbiol. 128 A, 489, 1977.
2. Bartoszcze M., Roszkowski J.: Medycyna Wet. 31, 635, 1975.
3. Bidwell D. E., Bartlett A., Voller A.: J. infect. Dis. 136 suppl. 274, 1977.
4. Bishai F. R., Galli R.: Lancet, 1, 697, 1977.
5. Clarke M. F., Adams A. N.: J. gen. Virol. 34, 475, 1977.
6. Delia S., Russo V., Vullov V., Aceti A., Ferone U.: Lancet, 1364, 1977.
7. Ellens D. J., Le Leeuw P. W.: J. clin. Microbiol. 6, 530, 1977.
8. Ellens D. J., De Leeuw P. W.: Lancet, 1, 1363, 1977.
9. Engvall E., Perlmann S.: J. Immunochem. 8, 871, 1971.
10. Engvall E., Perlmann S.: Immunol. 109, 129, 1972.
11. Grauballe P. C., Vestergaard B. P.: Lancet, 2, 1038, 1977.
12. Kurstak E.: Methods in Virology, 5, 433, 1971.
13. Leinikki P. O., Passila S.: J. infect. Dis. 136, 258, 1977.
14. Saunders G. C.: Amer. J. Vet. Res. 38, 21, 1977.
15. Scherrer R., Bernard S.: Ann. Microbiol. 128 A, 499, 1977.
16. Schmitz H., Doerr H. W., Kampa D., Vogt A.: J. clin. Microbiol. 5, 629, 1977.
17. Strefferkerk J. G., van der Ploeg M., van Duijn P.: J. Histochem. Cytochem. 23, 243, 1975.
18. Thraenhart O., Kuwert E. K.: Lancet, 2, 399, 1977.
19. Van Weemen B. K., Shuurs A. H. W. M.: FEBS Letters 15, 232, 1971.
20. Voller A.: Diagnostic Horizons, 2, 1, 1978.
21. Voller A., Bidwell D. E.: Brit. J. exp. Pathol. 56, 338, 1975.
22. Voller A., Bidwell D. E.: Brit. J. exp. Pathol. 57, 243, 1976.
23. Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A.: Bull. Wld Hlth Org. 53, 55, 1976.
24. Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E., Clarke M. F., Adams A. N.: J. gen. Virol. 33, 165, 1976.
25. Volters G., Kuipers L., Kacaki J., Schuurs A.: J. infect. Dis. 136, suppl. 311, 1977.
26. Yolken R., Wyatt R. G., Kapikian A. Z.: Lancet, 2, 819, 1977.
27. Yolken R., Kim H. W., Clem T., Wyatt R. G., Chanock R. M., Kalica A. R., Kapikian A. Z.: Lancet, 2, 263, 1977.

Adres autora: dr Michał Bartoszcze, ul. Krańcowa 1/19, 24-190 Puławy.

RIDGWAY R. L.: Zatrucie muchomore (Ammanita potherina. (Mashroom). Ammanita potherina (poisoning). J. Amer. vet. med. Ass. 172, 681–684, 1978 (6).

Objawy zatrucia Ammanita potherina są następstwem działania kwasu ibotenowego i muscimolu. U kotów objawy zatrucia występują po 15–30 minutach po zjedzeniu grzyba. Po okresie otępienia występuje podniecenie, któremu towarzyszą silne skurcze mięśniowe. Po 4 godzinnym okresie ekscytacji występuje senność. Leczenie zatrucia polega na stosowaniu środków wymiotnych, doustnym podawaniu węgla aktywowanego, wody oraz środków podtrzymujących akcję oddychania. Dobre efekty uzyskiwano po iniekcjach fizostygminy w dawce 0,25–0,5 mg, zaś w okresie podniecenia jest zalecana chlorpromazyna w dawce 0,5–1,0 mg/kg wagi ciała.

G.