



Enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny (ELISA) jako metoda detekcji specyficznych przeciwciał w surowicach zwierząt

Monika Gut-Winiarska, Bogusław Szewczyk

Zakład Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a method for detection of specific antibodies in animal sera

Summary

This paper aims to evaluate different forms of the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of virus-specific antibodies and focuses on factors which may influence the diagnostic reliability of such tests. The differences between competitive and non-competitive ELISAs are described, with reference to the influence of the antigen, the conjugated antibody, and the test sample on the test results. Attention is drawn to interference, which may result in false positive or false negative test results. The use of monoclonal antibodies and discriminatory tests is briefly discussed. Diagnostic reliability is described for tests that are used in monitoring or eradication programmes, emphasising the consequences of false negative or false positive results.

Key words:

antibodies, diagnostic techniques, enzyme-linked immunosorbent assays, standardisation, viruses.

Adres do korespondencji

Monika Gut-Winiarska,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański
i Akademia Medyczna,
ul. Kładki 24,
80-822, Gdańsk.

1. Wprowadzenie

Diagnostyka chorób zakaźnych w medycynie weterynaryjnej opiera się na technikach serologicznych, które wykrywają obecność przeciwciał przeciwko danemu patogenowi. Wśród najczęs-

ciej stosowanych metod wielką popularnością cieszy się enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny – ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Dzięki temu, że jest on metodą szybką i łatwą w wykonaniu, test ELISA ma przewagę nad takimi klasycznymi technikami, jak odczyn precipitacji lub odczyn neutralizacji. Test ELISA został opisany po raz pierwszy w 1971 r. (1,2). Od tego czasu powstało wiele jego odmian, które znalazły zastosowanie zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i w badaniach podstawowych.

Podstawowe cechy charakteryzujące test ELISA są następujące:

1) antygen lub przeciwciało jest związane w fazie stałej przez bierną adsorpcję do plastikowej powierzchni. Jako fazy stałej używa się najczęściej 96-studzienkowej płytki (3). Można dzięki temu przeprowadzić jednocześnie 96 testów. Przystosowane do tego formatu, dostępne na rynku wielokanałowe pipety, płuczki oraz spektrofotometry, umożliwiają szybkie i zautomatyzowane wykonanie testu;

2) podczas gdy jeden z reagentów jest związany w fazie stałej, kolejne odczynniki są dodawane i wspólnie inkubowane, a ich nadmiar jest usuwany w prosty sposób – przez płukanie. Ten sposób jest charakterystyczny dla testów heterogennych. W testach homogennych wszystkie reagenty są dodawane jednocześnie (4);

3) jeden z reagentów, używanych w teście, jest związany kowalencyjnie z enzymem. Dodanie odpowiedniego dla enzymu substratu powoduje powstanie barwnego, rozpuszczalnego produktu, który może być oznaczony ilościowo za pomocą pomiaru gęstości optycznej (OD).

Możliwość adsorpcji białka na płycie pozwala na tworzenie wielu odmian testu ELISA, w zależności od tego, który reagent jest związany z fazą stałą i w jakiej kolejności są dodawane następne reagenty. Można jednak wyróżnić pewne etapy wspólne dla każdego testu ELISA. Są to:

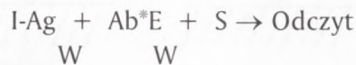
- bierna adsorpcja białka na plastikowej powierzchni płytki,
- odpłukanie nadmiaru białka, które nie związało się z powierzchnią płytki,
- użycie innych immunologicznie obojętnych białek w celu zapobiegania niespecyficznemu wiązaniu się reagentów do plastiku,
- etapy inkubacji, pozwalające na zajście reakcji immunologicznej,
- następne płukania, mające na celu oddzielenie cząsteczek, które reagują ze sobą (związanych) od tych, które nie biorą udziału w reakcji (wolnych),
- dodanie przeciwciał specyficznych dla antygeny, sprzęgniętych z enzymem, lub wtórnych przeciwciał gatunkowo specyficznych sprzęgniętych z enzymem, w zależności od rodzaju testu,
- dodanie specyficznego substratu, który zmienia kolor pod wpływem reakcji katalizowanej enzymatycznie,
- zatrzymanie reakcji enzymatycznej,
- odczyt spektrofotometryczny i analiza danych.

2. Klasyfikacja testów ELISA

Przy klasyfikacji testów ELISA brane są pod uwagę następujące czynniki:

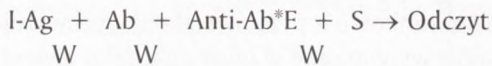
- liczba etapów specyficznej detekcji (test bezpośredni i pośredni),
- metoda związania reagenta do płytki (test sandwiczowy),
- sposób dodawania reagentów i wyrażenia ilościowego wyników (test niekompetycyjny, kompetycyjny i inhibicyjny).

2.1. Test ELISA bezpośredni*



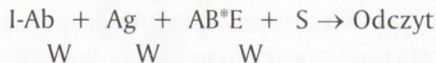
Antygen związany w fazie stałej reaguje bezpośrednio z przeciwciałami sprzęgniętymi z enzymem (rys. 1a). Testy tego typu są wykorzystywane do określenia optymalnego rozcieńczenia roboczego znakowanych enzymem przeciwciał.

2.2. Test ELISA pośredni



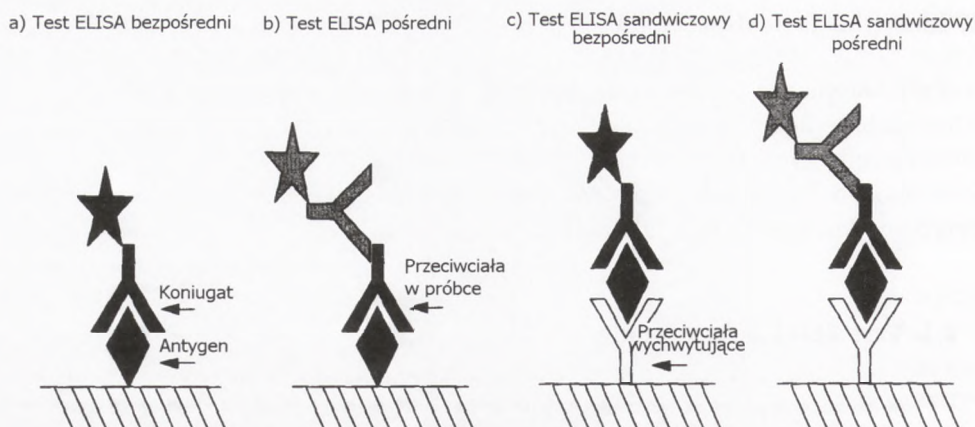
Ten rodzaj testu jest przydatny przy detekcji lub miareczkowaniu specyficznych przeciwciał w surowicy. Jego zaletą w porównaniu z testem bezpośrednim jest to, że jeden gatunkowo specyficzny koniugat przeciwciał z enzymem może zostać użyty do detekcji lub miareczkowania wielu surowic, pochodzących od zwierząt tego samego gatunku (rys. 1b).

2.3. Test ELISA sandwiczowy bezpośredni



* Etapy poszczególnych testów są przedstawione przy użyciu następujących symboli:

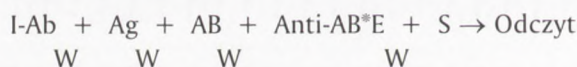
Ag – antygen, **Ab** – przeciwciało skierowane przeciwko antygenowi, **AB** – przeciwciało uzyskane w innym gatunku zwierzęcia niż Ab, **Anti-Ab** – przeciwciała gatunkowo specyficzne, np. skierowane przeciwko IgG mysim, ***E** – enzymem związany do przeciwciała (**Anti-Ab*E** – gatunkowo specyficzne przeciwciała sprzęgnięte z enzymem), **I** – faza stała, do której reagent jest związany, **S** – dodanie substratu i reakcja barwna, **+** – dodanie reagenta i inkubacja, **odczyt** – pomiar spektrofotometryczny, **W** – oddzielenie wolnych i związanych reagentów przez płukanie.



Rys. 1. Podstawowe rodzaje testów ELISA.

W teście sandwiczowym bezpośrednim przeciwiła adsorbowane w fazie stałej grają rolę czynnika wychwytyjącego antygen, który jest dodawany w następnym etapie (rys. 1c). Związany antygen jest następnie wykrywany przez dodanie specyficznych przeciwiła sprzęgniętych z enzymem. Przeciwiła używane do wykrywania mogą być identyczne gatunkowo z przeciwiłami wychwytyjącymi (ta sama surowica). Mogą być one także wytwarzane w innym gatunku zwierzęcia, które było immunizowane tym samym antygenem.

2. 4. Test ELISA sandwiczowy pośredni

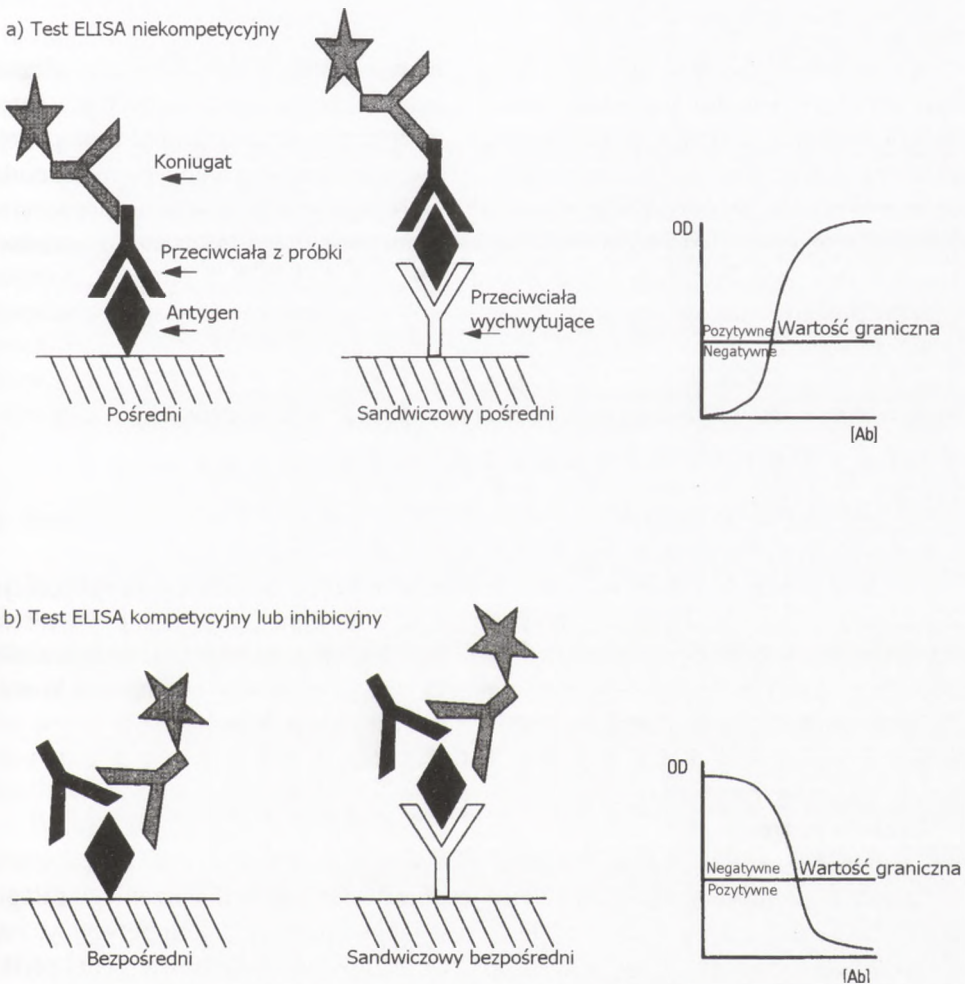


Pierwszorzędowe przeciwiła reagujące z antygenem musi być produkowane w innym gatunku zwierzęcia, niż związane do płytki przeciwiła wychwytyjące. Ważne jest, aby dodawane w następnym etapie drugorzędowe gatunkowo specyficzne przeciwiła związane z enzymem mogły wykryć tylko obecność przeciwiła pierwszorzędowych i nie reagowały niespecyficznym z przeciwiłami w fazie stałej. Zaletą testu sandwiczowego pośredniego w porównaniu z pośrednim jest możliwość przebadania wielu próbek surowic przy użyciu tego samego koniugatu (rys. 1d).

2.5. Test ELISA niekompetycyjny

W testach niekompetycyjnych przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi są wykrywane przez dodanie specyficznego gatunkowo koniugatu przeciwciał z enzymem. Liczba przeciwciał związanych do antygeny jest wprost proporcjonalna do natężenia reakcji barwnej, katalizowanej przez enzym związany z drugim przeciwciałem (rys. 2a). Otrzymane dane są wyrażane jako procent pozytywności (PP) testowanej próbki w stosunku do kontroli pozytywnej:

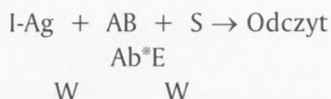
$$PP = OD \text{ testowanej próbki} \times 100\% / OD \text{ kontroli pozytywnej} \quad (22)$$



Rys. 2. Schemat testów ELISA niekompetycyjnego i kompetycyjnego oraz zależności między stężeniem przeciwciał w próbce (Ab) a gęstością optyczną (OD) w obu typach testu.

2.6. Test ELISA kompetycyjny

Cechą charakterystyczną testów kompetycyjnych jest współzawodnictwo dwóch reagentów o miejsca wiążące trzeciego. Klasyczny test kompetycyjny zakłada równoczesne dodanie do płytki obu substancji współzawodniczących (rys. 2b). Testy kompetycyjne mogą być przeprowadzone we wszystkich opisanych kombinacjach (test bezpośredni, pośredni, sandwiczowy). Przedstawiamy schematycznie bezpośredni test kompetycyjny:



Wartością mierzoną w teście kompetycyjnym jest stopień, w jakim specyficzne przeciwciała obecne w testowanej próbce hamują wiązanie specyficznych dla antygeny przeciwciał sprzęgniętych z enzymem. Kiedy przeciwciała z próbki zajmą miejsca wiążące na antygenie, wiązanie się przeciwciał znakowanych enzymem zostanie zablokowane. Liczba przeciwciał obecnych w próbce będzie odwrotnie proporcjonalna do natężenia reakcji barwnej, katalizowanej przez enzym, związany z przeciwciałem kompetycyjnym. Dane wyrażane są jako procent inhibicji (PI), czyli stopień, w jakim przeciwciała obecne w próbce są zdolne zahamować wiązanie substancji współzawodniczącej:

$$\text{PI} = 100\% - \text{OD testowanej próbki} \times 100 / \text{OD kontroli negatywnej}$$

2.7. Test ELISA inhibycyjny

Test inhibycyjny jest odmianą testu kompetycyjnego, z tą różnicą, że substancje współzawodniczące o związanie antygeny nie są dodawane jednocześnie. W teście inhibycyjnym najpierw dodawana jest testowana surowica. Po inkubacji i odpłukaniu niezwiązanej surowicy (niekiedy etap płukania zostaje pominięty) dodaje się koniugat przeciwciała-enzym. Uzyskane wyniki są również wyrażane jako PI.

3. Wybór antygeny

Sposób prezentacji antygeny na płytce jest niezwykle ważny dla przebiegu całego testu, niezależnie od tego, czy będzie to test niekompetycyjny, kompetycyjny, czy inhibycyjny. Antygen może być zaadsorbowany bezpośrednio do powierzchni płytki lub wychwycony za pośrednictwem przeciwciał w teście sandwiczowym. Testy sandwiczowe są używane w przypadku pracy z antygenem o niskim stężeniu i gdy mała

masa cząsteczkowa lub budowa antygeny uniemożliwia efektywne wykrywanie i konieczne jest dodatkowe wyeksponowanie białka. Konieczne jest, aby wychwytywany w ten sposób antygen posiadał co najmniej dwa miejsca wiążące dla przeciwciał (5). Ten warunek może wykluczać użycie jako wychwytyjących i wykrywających tych samych przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko jednemu epitopowi. Nie jest to jednak regułą i niekiedy budowa antygeny pozwala na wykorzystanie tylko jednego rodzaju przeciwciał monoklonalnych (6).

W testach sandwiczowych można także z powodzeniem użyć jako antygeny preparatu zanieczyszczonego innymi białkami, np. pożywki zebranej z nad zakażonej wirusem hodowli komórkowej. Przeciwciała wychwytyjące są również popularne w niekompetycyjnych testach, identyfikujących obecność poszczególnych klas przeciwciał i podklas IgG w surowicach zakażonych zwierząt (4,7,8). Specyficzne IgM i IgA pojawiają się w surowicy po zakażeniu wcześniej niż IgG (5). Tak zatem stwierdzenie obecności tych klas przeciwciał w surowicach znaczącej liczby zwierząt w danym stadzie może pomóc zapobiec rozprzestrzenieniu się infekcji i w określeniu momentu wprowadzenia wirusa do stada. Ma to szczególne znaczenie w przypadku np. szczepów wirusa klasycznego pomoru świńskiego (CSFV – *classical swine fever virus*) o niskiej wirulencji. Szczepy takie mogą rozprzestrzeniać się w stadzie, wywołując niedostrzegalne objawy kliniczne i zakażenie wirusem może pozostać nierozpoznane. W takich przypadkach testy ELISA wykrywające klasy przeciwciał są przydatne do określenia, które stado są źródłem wirusa i jaką drogą się on rozprzestrzeni na stada sąsiadujące. Testy ELISA specyficzne dla klas przeciwciał zostały opracowane m.in. dla bydłowego herpeswirusa typu 1 (BHV1 – *bovine herpesvirus 1*) i syncytialnego wirusa oddechowego bydła (BRSV – *bovine respiratory syncytial virus*).

4. Koniugat przeciwciała-enzym

Wybór rodzaju testu jest w dużym stopniu zdeterminowany dostępnością przeciwciał. Posiadanie specyficznych dla danego antygeny przeciwciał monoklonalnych (MAbs) umożliwia przeprowadzenie testu kompetycyjnego. Zaletą koniugatu MAbs-enzym w teście kompetycyjnym jest możliwość użycia tego samego testu do wykrywania przeciwciał antywirusowych w surowicach zwierząt różnych gatunków. Przykładem takiego testu jest test kompetycyjny do wykrywania przeciwciał przeciwko pestiwirusom w surowicach świń, bydła i owiec (10).

W testach niekompetycyjnych używane są zwykle koniugaty przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim IgG określonego gatunku zwierzęcia, tak zatem mogą one być użyte w wielu rodzajach testów niekompetycyjnych, ale przeznaczonych tylko dla tego gatunku zwierzęcia. Na rynku dostępnych jest wiele koniugatów specyficznych gatunkowo.

5. Testowana próbka

W testach kompetycyjnych możliwe jest testowanie próbek w niskich rozcieńczeniach lub nierozcieńczonych w ogóle, gdyż oddziaływania niespecyficzne są tu niewielkie i nie mają znaczącego wpływu na wynik (11). Rozcieńczanie testowanych prób jest konieczne w przypadku testów niekompetycyjnych, ze względu na zbyt wysokie oddziaływania niespecyficzne. W przypadku testu niekompetycyjnego, opracowanego do diagnostyki BRSV, oprócz konieczności użycia indywidualnej kontroli negatywnej dla każdej testowanej próbki, zalecane jest 80-krotne rozcieńczenie badanego materiału (12).

Pochodzenie testowanej próbki ma wpływ na wartość diagnostyczną testu ELISA. W programach kontroli i eradykacji wirusów coraz częściej są używane próbki mleka zamiast surowic, ze względu na szybszy i tańszy sposób ich pozyskiwania (13-16). Pomimo że ilość immunoglobulin w mleku krowim jest 10-30 razy mniejsza niż w surowicy (45), udało się opracować wysoce czułe testy ELISA kompetycyjny i niekompetycyjny do diagnostyki wirusa BHV1 w próbkach mleka (17). Zwykle mleko zwierząt zakażonych i niezakażonych jest mieszane ze sobą, tak zatem testy tego typu muszą charakteryzować się wysoką czułością i zdolnością do wykrycia infekcji na wczesnym etapie jej przenoszenia w obrębie stada. Wykazano, że badana próba mleka daje odpowiedź pozytywną, gdy co najmniej 10-15% zwierząt w stadzie jest zakażonych (14,18).

6. Oddziaływania niespecyficzne

Oddziaływania niespecyficzne są rozumiane jako niepożądana aktywność któregoś z reagentów, prowadząca do powstania fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników (19,20). Przedstawiamy kilka znanych źródeł oddziaływań niespecyficznych.

6.1. Niespecyficzne wiązanie przeciwciał pochodzących z badanej próbki

Jest to podstawowa niedogodność testów niekompetycyjnych. Wszystkie przeciwciała, zarówno te, które wiążą się specyficznie z antygenem, jak i te, które wiążą się niespecyficznie do płytki, zostaną wykryte przez wtórny koniugat. Aby uniknąć niespecyficznych wiązań, stosuje się rozcieńczanie testowanych próbek, co jednak obniża znacznie poziom detekcji przeciwciał przez dany test, a przez to jego czułość. Poza tym, w wielu testach niekompetycyjnych do każdej testowanej próbki wykonywana jest indywidualna kontrola negatywna. Jest to studzienka nieopłaszczona antygenem, która służy tylko określeniu poziomu tła, które należy uwzględnić przy interpretowaniu wyników. Ogólnie uważa się, że testy niekompetycyjne mają lepszą

zdolność wykrywania niskich stężeń specyficznych przeciwciał, niż testy kompetycyjne (tab. 1). Jednakże w niektórych opracowaniach pokazuje się, że niektóre testy kompetycyjne mają większą czułość niż niekompetycyjne (21,17).

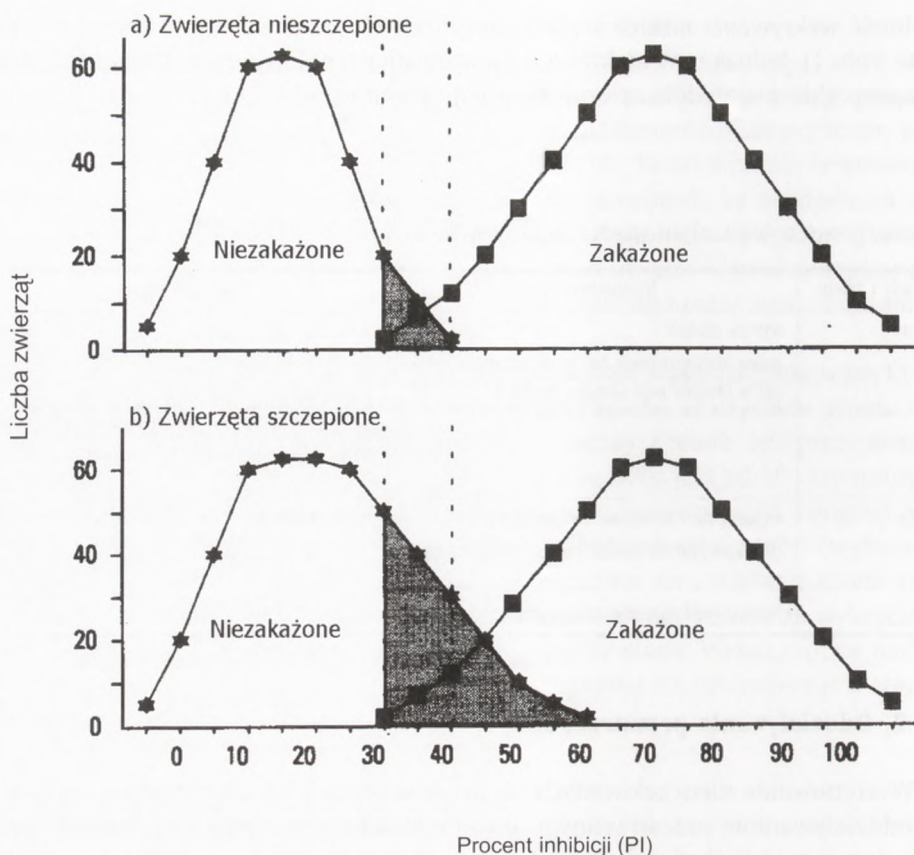
Tabela 1

Porównanie cech testów kompetycyjnych i niekompetycyjnych

Wady i zalety	Niekompetycyjne	Kompetycyjne
zalety	wyższa czułość jeden koniugat może być użyty do wielu testów, ale w obrębie tego samego gatunku	specyficzność wiązania – nie wymaga kontroli tła dla każdej próbki jeden test może być użyty do analizy próbek od wielu gatunków pod kątem tego samego wirusa możliwość testowania surowic nierozcieńczonych
wady	wysokie tło i mniejsza specyficzność dla każdej próbki konieczna jest studzienka kontrolna konieczność rozcieńczania testowanych surowic	niższa czułość

6.2. Oddziaływania przestrzenne

Występowanie nieoczekiwanych wyników w testach kompetycyjnych przypisuje się oddziaływaniom przestrzennym. Jako przykład służyć może test użyty do przebadania surowic świń niezakażonych wirusem pseudowścieklizny (PRV, *pseudorabies virus*), a szczepionych szczepionką delecyjną PRV-gE⁻ (szczepionka zawiera atenuowany szczep wirusa PRV, pozbawiony genu gE, który koduje glikoproteinę gE – jeden z głównych antygenów powierzchniowych PRV). Do przebadania surowic użyto testu ELISA inhibicyjnego, gE-specyficznego, opartego na użyciu jednego przeciwciała monoklonalnego. Pomimo braku przeciwciał anti-gE w surowicy zwierząt szczepionych, procent inhibicji (PI) próbek był wyższy niż PI próbek pobranych od zwierząt niezakażonych PRV i nieszczepionych (22). To zjawisko można wytłumaczyć wysokim poziomem innych przeciwciał anti-PRV w surowicach zwierząt po szczepieniu. Antygenem wykorzystanym w teście był cały wirus PRV i to było źródłem dodatkowych oddziaływań pomiędzy białkami wirusa a przeciwciałami wytworzonymi po szczepieniu. W konsekwencji, rozkład statystyczny wartości PI populacji niezakażonej przesunął się w stronę wartości, które uznawano dotychczas za pozytywne, a to wywołało wzrost liczby wyników wątpliwych i fałszywie pozytywnych (rys. 3). Testy kompetycyjne w których wykorzystuje się dwa różne MAbs lub zrekombinowaną glikoproteinę gE, nie prowadzą do takiej liczby fałszywie pozytywnych wyników w przypadku zwierząt szczepionych (23,24).



Rys. 3. Przesunięcie wartości PI surowic zwierząt szczepionych, wykryte inhibycyjnym testem ELISA gE-specyficznym dla PRV. Na wykresach przedstawiono rozkład wartości PI populacji negatywnej i pozytywnej przed szczepieniem (a) i po intensywnym szczepieniu szczepionką PRV-gE⁻ (b). Po szczepieniu znacznie wzrosła liczba fałszywie pozytywnych wyników (wg 22).

6.3. Agregacja wywołana przez przeciwciała heterofilne

Przeciwciała heterofilne zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w surowicy ludzkiej (26). Należą do nich różnorodne przeciwciała polispecyficzne i czynnik reumatoidalny (RF) (25,46). Są to przeciwciała klasy IgM, które wiążą się do fragmentów Fc IgG, co powoduje występowanie fałszywych reakcji (5). W przypadku testu sandwiczowego, przeciwciała heterofilne mogą agregować przeciwciała wychwytyjące i przeciwciała wykrywające. Stwarza to niebezpieczeństwo wystąpienia wyników fałszywie pozytywnych w testach niekompetycyjnych albo fałszywie negatywnych w testach kompetycyjnych. Jednym ze sposobów uniknięcia tego problemu może być zastosowanie fragmentów Fab lub F(ab')₂ przeciwciał wychwytyjących

i wtórnego koniugatu zamiast całych cząsteczek IgG. Innym sposobem jest zneutralizowanie przeciwciał heterofilnych przez dodanie do badanej próbki IgG lub surowicy pochodzącej od tego samego gatunku zwierzęcia.

6.4. Antygen jako źródło niespecyficznych oddziaływań

Antygen wirusowy zanieczyszczony białkami komórkowymi może powodować występowanie dużego tła lub fałszywie pozytywne wyniki w testach niekompetycyjnych. Innym przykładem mogą być terenowe szczepy wirusowe, spokrewnione ze sobą i reagujące krzyżowo, co powoduje obniżenie specyficzności testu. Przykładem takich wirusów są pestiwirusy, które mogą zakażać więcej niż jeden gatunek zwierzęcia (27) i wykazują reaktywność krzyżową (28,29).

6.5. Używane przeciwciała jako źródło niespecyficznych oddziaływań

Zastosowanie MAbs do opłaszczania płytek lub MAbs sprzęgniętych z enzymem jako koniugatu zmniejsza oddziaływania niespecyficzne, dzięki wysokiej specyficzności MAbs. Natomiast użycie koniugatu przeciwciał poliklonalnych może prowadzić do występowania reakcji niespecyficznych z innymi składnikami preparatu antygeny. Przeciwciała mogą także wiązać się do wolnej powierzchni na płytce. Aby tego uniknąć, stosuje się do zablokowania powierzchni na płytce białka obojętne immunogennie, takie jak np. płodowa surowica bydlęca i BSA, a także detergenty (Tween 20, Tween 80, Triton X-100, SDS). Tego samego czynnika blokującego dodaje się też do używanych buforów reakcyjnych (5).

6.6. Problem krytycznych rozcieńczeń

Właściwe rozcieńczenie badanych próbek ma wpływ na wiarygodność wyników. Niekiedy można zaobserwować wynik fałszywie pozytywny dla tylko jednego rozcieńczenia surowicy, podczas gdy niższe lub wyższe rozcieńczenia wskazują na wynik negatywny, jak w przypadku testu inhibycyjnego gB-specyficznego dla wirusa BHV1. Rezultat fałszywie pozytywny pojawiał się tylko, gdy używano do rozcieńczenia surowicy buforu; gdy rozcieńczano próbki w negatywnej płodowej surowicy bydlęcej, wszystkie wyniki były negatywne (22). Nie wyjaśniono, jak dotąd, przyczyn tego problemu, lecz jego obecność należy brać pod uwagę przy opracowywaniu warunków testu.

7. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (MAbs) w testach ELISA

Przeciwciała monoklonalne podnoszą znacznie specyficzność testu, ale ich wykorzystanie ma też pewne wady. Część testów jest oparta na użyciu tylko jednego rodzaju MAbs. W tych przypadkach ważne jest upewnienie się, że te przeciwciała są skierowane przeciwko epitopowi, który jest silnie konserwowany we wszystkich szczepach terenowych wirusa (30). Testy spełniające to wymaganie to np. opracowany dla wirusa BHV1 test inhibicyjny gB-specyficzny (31), test kompetycyjny dla wirusa ospy owiec i kóz (PRRV, *peste des petits ruminants virus*) z użyciem antygeny rekombinowanego w systemie bakulowirusowym (47), a także testy wykrywające przeciwciała przeciwko białkom stabilnym w szczepach terenowych wirusa PRV: test inhibicyjny gB-specyficzny (48), test kompetycyjny gE-specyficzny (49) oraz test kompetycyjny, wykorzystujący uzyskany w systemie bakulowirusowym białkowy kompleks funkcjonalny gE/gI (24).

W przypadku wariacji antygenowych szczepów terenowych, przeciwciała w surowicach zwierząt zakażonych nie będą w stanie rozpoznać oryginalnego epitopu, a tym samym współzawodniczyć z MAbs o jego związanie. Spowoduje to pojawienie się fałszywie negatywnych wyników. Problem ten likwiduje użycie dwóch MAbs, skierowanym przeciwko różnym epitopom antygeny, jak np. w teście inhibicyjnym, wykrywającym przeciwciała przeciwko wirusowi CSFV (32). W teście tym przeciwciała przeciwko jednemu z epitopów blokują antygen przed związaniem się do MAbs wychwytyjących na płytce. Przeciwciała przeciwko drugiemu z epitopów blokują wiązanie antygeny do koniugatu wtórnych MAbs-enzym. W przypadku, gdy w próbce obecne będą przeciwciała przeciwko tylko jednemu z epitopów, wynik nadal będzie pozytywny. Wiarygodne testy są ważnym narzędziem w programach eradykacji chorób wirusowych, jak np. choroba Aujeszky'ego, gdzie każdy nie wykryty mutant wirusowy, rozprzestrzeniając się dalej w stadzie może hamować postępy programu zapobiegania (23,33).

8. Testy różnicujące

Test różnicujący musi wyodrębnić zwierzę zakażone w populacji zwierząt niezakażonych i szczepionych przeciwko danemu schorzeniu. Musi on spełniać dwa podstawowe warunki:

- 1) powinien wykrywać przeciwciała powstałe w wyniku infekcji każdym z terenowych szczepów danego wirusa, również wcześniej po infekcji;
- 2) nie powinien reagować z przeciwciałami powstałymi w wyniku szczepienia.

W intensywnie prowadzonych badaniach cyklu rozwojowego herpeswirusów wykazano, że usunięcie genu gE z genomu wirusowego nie miało wpływu na przeżywalność wirusa *in vitro*, ale powodowało spadek jego wirulencji (34). Nie stwierdzono braku genu gE w żadnym ze szczepów terenowych, co dało podstawy do skon-

struowania markerowej szczepionki delecyjnej gE⁻. Czynnikiem różnicującym zwierzęta zakażone i szczepione w testach ELISA stało się białko gE. Delecja genu, który nie jest konieczny do przeżycia wirusa może stać się zatem podstawą opracowania testu różnicującego.

W przypadku wielu wirusów nie zidentyfikowano do tej pory genów, które można z powodzeniem usunąć dla potrzeb konstrukcji szczepionek markerowych. W takich sytuacjach stosuje się szczepionki inaktywowane w połączeniu z testami wykrywającymi obecność przeciwciał przeciwko białkom niestrukturalnym wirusa, jak np. w testach dla wirusów pryszczycy (FMDV, *Foot and mouth disease virus*) (35,36), grypy końskiej (37) i wirusa niebieskiego języka (*Bluetongue virus*) (50).

Odrębnym podejściem jest konstruowanie szczepionek podjednostkowych, opartych na wybranych i specjalnie wyizolowanych białkach wirusowych, i stosowaniu ich z odpowiednim testem różnicującym. Przykładami są:

- szczepionka podjednostkowa przeciwko BHV1, oparta na białku gD, w połączeniu z testem opartym na białku gB (38);
- szczepionka podjednostkowa przeciwko CSFV, oparta na białku strukturalnym E2, w połączeniu z testem opartym na białku strukturalnym E^{rns} (39).

9. Wartość diagnostyczna, walidacja i standaryzacja testu diagnostycznego

9.1. Czulość i specyficzność testu

Wartość diagnostyczną testu określa przede wszystkim jego czulość i specyficzność (40). Czulość testu to jego zdolność do wykrycia poszukiwanych przeciwciał w próbce, a zatem rozpoznania zwierzęcia zakażonego. Zdolność ta jest mierzona liczbą pozytywnych wyników w stosunku do całkowitej liczby zwierząt zakażonych. Można to wyrazić zależnością $A/(A+B)$, gdzie A to liczba zwierząt w populacji zakażonej, które zostały rozpoznane jako pozytywne, a B to liczba zwierząt w tej samej populacji zakażonej, które zostały rozpoznane w teście jako fałszywie negatywne (40). Specyficzność testu to zdolność do odróżnienia zwierzęcia zdrowego od chorego, czyli zidentyfikowania zwierzęcia jako niezakażonego. Specyficzność jest mierzona liczbą negatywnych wyników w stosunku do całkowitej liczby zwierząt zdrowych w populacji, co wyraża zależność $D/(C+D)$, gdzie C to liczba wyników fałszywie pozytywnych, a D to liczba wyników negatywnych w populacji zwierząt niezakażonych.

9.2. Wartość progowa testu

Przy opracowywaniu warunków testu, konieczne jest ustalenie wartości progowej COV (*cut-off value*). Jest to taka wartość OD danej próbki (bądź też jej wartość PP

lub PI), która stanowi granicę przy określaniu, czy dane zwierzę jest zakażone, czy nie (rys. 2a i 2b). W przypadkach wielu testów część wyników populacji zakażonej i niezakażonej nakłada się na siebie. Kiedy wybierze się wyższą wartość COV, liczba fałszywie negatywnych wyników rośnie (spada specyficzność) i obniża się liczba wyników fałszywie pozytywnych (rośnie czułość). Przy niższej wartości COV dzieje się odwrotnie (40).

Problemem utrudniającym jednoznaczne ustalenie wartości COV danego testu jest to, że w różnych regionach kraju rozkład statystyczny wartości próbek pozytywnych i negatywnych jest odmienny (41). Poza tym, jak już wspomniano, intensywne szczepienie może zmienić rozkład statystyczny wartości pozytywnych i negatywnych (rys. 3). Dlatego też wartość diagnostyczna danego testu może być różna w zależności od badanej populacji zwierząt. W związku z tym czułość i specyficzność testu powinny być ustalone za pomocą surowic zdefiniowanych wcześniej jako pozytywne i negatywne, standardów międzynarodowych i tzw. „złotych standardów” – jest to tzw. walidacja. Liczba klas i podklas przeciwciał zmienia się wcześniej po infekcji, dlatego próbki zebrane w tym okresie powinny być także użyte do walidacji testu. W tabeli 2 przedstawiono zestaw surowic i standardów użytych do walidacji sandwichowego, inhibicyjnego testu ELISA gB-specyficznego dla wirusa PRV (24). Niestety, takie standardy nie zawsze są dostępne i wartość diagnostyczna niektórych testów pozostaje nieokreślona, lub też jest określona tylko w przybliżeniu. Wartość diagnostyczną testu można wtedy określić metodą ROC (*receiving operating characteristics*), badając losowo wybrane negatywne i pozytywne próbki z danej populacji. Po wykonaniu wykresu zależności między czułością i specyficznością przy różnych wartościach COV ustala się optymalną wartość COV dla danej populacji.

Wybór COV będzie zależał także od przeznaczenia testu. Wymagania stawiane testom stosowanym w programie eradykacji zmieniają się w zależności od zaawansowania programu. W trakcie programu i w jego końcowym etapie ważne jest wykrycie każdego zakażonego zwierzęcia, potrzebny będzie zatem czuły test, nawet kosztem zmniejszonej specyficzności. Fałszywie negatywne wyniki zapobiegają usuwaniu zwierząt chorych ze stada i wstrzymają sukces programu. Kiedy eradykacja jest już zakończona, test ELISA musi mieć wysoką specyficzność, aby zapobiec pojawianiu się fałszywie pozytywnych wyników. Każdy fałszywie pozytywny wynik może mieć niepotrzebne konsekwencje, np. w przypadku CSFV lub FMDV, pozytywne wyniki oznaczają likwidację całego stada (22). W celu zrekompensowania spadku czułości przy pomiarze wysoce specyficznym testem, należy zwiększyć liczbę próbek badanych w obrębie stada, by wtedy zwiększyć prawdopodobieństwo zidentyfikowania stada jako zainfekowanego (tzw. czułość całego stada, 42). Kiedy wysoce specyficzny test jest niedostępny, wszystkie uzyskane pozytywne wyniki powinny być potwierdzone przez niezależny test diagnostyczny o wysokiej czułości (22).

Tabela 2

Przykładowy zestaw surowic, przydatnych przy określaniu wartości diagnostycznej testu ELISA

Rodzaj surowic	Pochodzenie
surowice negatywne	zwierzęta hodowane laboratoryjnie, wolne od patogenów (SPF, <i>Specific pathogen free</i>) zwierzęta ze stad niezakażonych, z krajów gdzie dany wirus został zwalczony zwierzęta szczepione szczepionką markerową przeciwko danej chorobie międzynarodowe standardy negatywne
surowice pozytywne	surowice pozytywne zwierząt zakażonych danym wirusem zwierzęta niezakażone, ale z odpornością matczyną zwierzęta szczepione szczepionką opartą na całym wirusie międzynarodowe standardy: pozytywny, słabo pozytywny oraz definiujący poziom minimalnej czułości testu
surowice po eksperymentalnej infekcji wirusem i po eksperymentalnych infekcjach kontaktowych	3, 7, 10, 14, 21 dni po infekcji eksperymentalnej 1, 2 i 3 tygodnie po pierwszej infekcji kontaktowej 1, 2 i 3 tygodnie po drugiej infekcji kontaktowej
inne surowice pozytywne	zwierzęta tego samego gatunku, zakażone innym wirusem, o wysokiej homologii i pochodzącym z tej samej rodziny (w celu stwierdzenia wystąpienia reakcji krzyżowej) zwierzęta innego gatunku i zakażone innym wirusem o wysokiej homologii i pochodzącym z tej samej rodziny

9.3. Wartość prognostyczna testu

Wartość prognostyczna danego testu (PV, *predictive value*) jest interesująca z klinicznego punktu widzenia. Jest to prawdopodobieństwo, że wynik pozytywny testu oznacza chorobę, a wynik negatywny jej brak. PV dla wyniku pozytywnego opisuje zależność $A/(A+C)$, gdzie A to liczba wyników pozytywnych, a C to liczba wyników fałszywie pozytywnych w danej populacji zwierząt. PV dla wyniku negatywnego określa zależność $D/(B+D)$, gdzie D to liczba wyników negatywnych, a B to liczba wyników fałszywie negatywnych w danej populacji. Wartość PV opiera się przede wszystkim na czułości i specyficzności testu, ale także na poziomie rozpowszechnienia choroby w danej populacji (*prevalence*). Przy użyciu testu o specyficzności $<100\%$, liczba fałszywie pozytywnych wyników wzrośnie, gdy rozpowszechnienie choroby spadnie. Inaczej mówiąc, kiedy rozpowszechnienie choroby spada, wartość prognostyczna wyników pozytywnych jest mniejsza (40).

9.4. Standaryzacja testu

Kiedy już zdefiniowano format testu i jego przeznaczenie, następnym etapem powinno być takie dopracowanie warunków testu, aby był on powtarzalny oraz łatwy i szybki do przeprowadzenia. Liczba chorób zwalczanych w programach kontroli i eradykacji rośnie, a tym samym zwiększa się potrzeba opracowywania gotowych do użycia testów. W 1997 r. w Holandii, gdy wybuchła epidemia pomoru świńskiego, liczba próbek przebadanych pod kątem tej choroby przekroczyła 2 miliony (22).

Ważne jest też, żeby reagenty stosowane w teście były stabilne podczas przechowywania. Pod tym względem syntetyczne antygeny i MAbs mają przewagę nad przeciwciałami poliklonalnymi i naturalnymi antygenami. Przykładami mogą być czułe testy, oparte na wykorzystaniu małych peptydów, pochodzących z konserwowanych hydrofobowych regionów białka G wirusa BRSV i ludzkiego syncytialnego wirusa oddechowego (HRSV, *human respiratory syncytial virus*) (43).

Ważną cechą testu diagnostycznego jest jego odporność na zmiany w wykonywaniu testu (*robustness*), jak np. różny sprzęt, jakość wody, różnice w czasie i temperaturze inkubacji, a także różnice w wykonaniu przez eksperymentatorów. Jest to bardzo ważne, gdy niektóre testy lub ich składniki (reagenty, surowice referencyjne) są używane w więcej niż jednym laboratorium – testy wymagają staranniejszej standaryzacji. Wprowadza się programy kontroli jakości, w których te same próbki są testowane w odstępach czasu w tym samym laboratorium (wewnętrzna kontrola jakości i powtarzalności testu) lub te same testy są wykonywane w różnych laboratoriach (zewnętrzna kontrola jakości i odtwarzalności testu) (40,44). Opracowanie prostej procedury z minimalną liczbą etapów pomaga osiągnąć lepszą jakość testu, a w konsekwencji ma lepszy wpływ na jego powtarzalność i odtwarzalność (22).

10. Podsumowanie

Rodzaj testu, wybór reagentów i liczba etapów reakcji mają duży wpływ na jakość testu. Nie istnieją reguły, jaki typ testu powinien być użyty w konkretnym programie sanitarnym. Przy wyborze powinny być brane pod uwagę takie czynniki, jak: przeznaczenie testu, dostępność reagentów (cały wirus, białka rekombinowane, peptydy, MAbs) oraz skala, na jaką test będzie używany. Walidacja musi być przeprowadzona przed zaaprobowaniem testu do użycia w programie sanitarnym, z użyciem próbek z populacji docelowej. Jakość testu powinna być poddawana ciągłej kontroli, aby mieć pewność, że takie czynniki, jak zmiana w rozprzestrzenianiu się choroby czy intensywne szczepienie, nie mają wpływu na wartość diagnostyczną testu.

Praca została wykonana w ramach projektu Z-KBN 004/PO4/98.

Literatura:

1. Engvall E., Perlmann P., (1971), *Immunochem.*, 8, 871-873.
2. van Veeman B. K., Schuurs A. H. M. W., (1971), *FEBS Letters*, 15, 232-236.
3. Voller A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., (1979), in: *The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, Dynatech Europe, England.
4. Desphande S. S., (1996), in: *Enzyme Immunoassays. From Concept to Product Development*, Chapman and Hall, New York, 240-258.
5. Crowther J. C., (1995), in: *ELISA: Theory and Practice*, Humana Press, Totowa, NJ.
6. Gut-Winiarska M., Jacobs L., Kerstens H., Bieńkowska-Szewczyk K., (2000), *J. Virol. Meth.*, 88, 63-71.
7. Madić J., Magdalena J., Quak J., van Oirschot J. T., (1995), *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46, 267-283.
8. van Zaane D., Ijzerman J., (1984), *J. Immunol. Meth.*, 72, 427-441.
9. Westenbrink F., Kimman T. G., (1987), *Am. J. Vet. Res.*, 48, 1132-1137.
10. Kramps J. A., Perrin B., Edwards S., van Oirschot J. T., (1996), *Vet. Microbiol.*, 53, 153-161.
11. Lecomte C., Pin J. J., de Moerloze L., Vandenberg D., Lambert A. F., Pastoret P. P., Chappuis G., (1990), *Vet. Microbiol.*, 23, 193-201.
12. Westenbrink F., Brinkhof J. M. A., Straver P. J., Quak J., de Leeuw P. W., (1985), *Res. Vet. Sci.*, 38, 334-340.
13. Frankena K., Franken P., Vandehoek J., Koskamp G., Kramps J. A., (1997), *Vet. Rec.*, 140, 90-92.
14. Hartman A., van Wuijckhuise L., Frankena K., Franken P., Wever P., de Wit J., Kramps J. A., (1997), *Vet. Rec.*, 140, 484-485.
15. Keen J., Kwang J., Travis Littledike E., Hungerford L. L., (1996), *Vet. Immun. Immunopathol.*, 51, 153-157.
16. Reynaud A., Dugout L., Perrin B., Bertin Y., Giroux J. P., Serre R., (1995), *Rev. Med. Vet.*, 171, 451-456.
17. Wellenberg G., Verstraten E. R., Mars H. M., van Oirschot J. T., (1998), *J. Clin. Microbiol.*, 36, 409-413.
18. Wellenberg G., Verstraten E. R., Mars H. M., van Oirschot J. T., (1998), *Vet. Rec.*, 142, 219-220.
19. Kohnse K. P., Wiser H., (1990), *J. Clin. Chem.*, 28, 881-892.
20. Miller J. J., Levinson S. S., (1996), in: *Immunoassay*, Diamandis & Christopoulos, Academic Press, New York, 265-190.
21. Perrin B., Bitsch V., Cordioli P., Edwards S., Eloit M., Guerin B., Lenihan P., Perrin M., Ronsholt L., van Oirschot J. T., Vanopdenbosch E., Wellemans G., Wizigmann G., Thibier M., (1993), *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12, 969-984.
22. Schrijver R. S., Kramps J. A., (1998), *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 17, 550-561.
23. van Oirschot J. T., Houwers D., Rziha H., Moonen P. J., (1998), *J. Virol. Meth.*, 22, 191-206.
24. Gut M., Jacobs L., Tyborowska J., Szewczyk B., Bieńkowska-Szewczyk K., (1999), *Vet. Microbiol.*, 69, 239-249.
25. Levinson S. S., (1992), *J. Clin. Immunoassay*, 15, 108-115.
26. Boscato L. M., Stewart M. C., (1988), *Clin. Chem.*, 32, 1491-1495.
27. Vilcek S., Belak S., (1996), *J. Virol. Meth.*, 60, 103-108.
28. Moenning V., Plagemann P. G. W., (1992), *Adv. Virus Res.*, 41, 53-98.
29. van Rijn P., van Gennip H. G., Leendertse C. H., Brusckhe C. J., Paton D. J., Moorman R. J., van Oirschot J. T., (1997), *Virology*, 237, 337-348.
30. Jacobs L., Meloen R. H., Gielkens A. L., van Oirschot J. T., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 191-197.
31. Kramps J. A., Magdalena J., Quak J., Weerdmeester K., Kaashoek M. J., Maris-Veldhuis M. A., Rijsewijk F. A. M., Keil G., van Oirschot J. T., (1994), *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2175-2181.
32. Wensvoort G., Bloemrad M., Terpstra C., (1988), *Vet. Microbiol.*, 17, 129-140.
33. Kimman T. G., de Leeuw O., Kochan G., Szewczyk B., van Roij E., Jacobs L., Kramps J. A., Peeters B., (1996), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3, 167-174.
34. Zuckermann F., Mettenleiter T. C., Scheurs C., Sugg N., Ben-Porat T., (1988), *J. Virol.*, 62, 4622-4626.
35. Berger H. G., Straub O. C., Ahl R., Tesar M., Marquardt O., (1990), *Vaccine*, 8, 312-126.
36. Silberstein E., Kaplan G., Taboga O., Duffy S., Palma E., (1997), *Arch. Virol.*, 142, 795-805.
37. Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Bins M., (1997), *J. Virol. Meth.*, 65, 255-263.
38. van Drunen Littel S., Parker M. D., Massie B., van der Hurk J. V., Harland R., Babiuk L. A., Zamb T. J., (1993), *Vaccine*, 11, 25-34.

39. Moorman R., de Smit A. J., van Rijn P., Wensvoort G., Gielkens A., Hulst M., van Gennip R., Miedema C., de Kluyver E., Terpstra C., (1996), in: *Proc. 3rd European Society for Veterinary Virology Symposium on Pestivirus Infections*, Eds.: Edwards S., Paton D. J., Weensvoort G., 180-187.
40. Kramps J. A., van Rooij E. M., (1997), in: *Proc. of an International Symposium on Diagnosis and Control of Livestock Diseases using Nuclear and Related Techniques*, Wiedeń, 293-303.
41. Wright P. F., Nilsson E., van Rooij E. M., Lelenta M., Jeggo M. H., (1993), *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12, 435-450.
42. Martin S. W., Shoukri M., Thornburn M. A., (1992), *Vet. Med.*, 14, 33-44.
43. Langedijk J. P., Middel W. G., Achaaper W. M., Meloen R., Kramps J. A., van Oirschot J. T., (1996), *J. Immunol. Meth.*, 193, 157-166.
44. Blacksell S. D., Cameron A. R., Chamnanpood C., Tatong D., Monpolrisi M., Westbury H. A., (1996), *Vet. Microbiol.*, 51, 1-9.
45. Caffin J. P., Poutrel B., (1988), *J. Dairy Sci.*, 71, 2035-2043.
46. Kricka L. J., Schmerfeld-Pruss D., Senior M., Goodman B. P., Kaladas P., (1990), *Clin. Chem.*, 37, 26-29.
47. Libeau G., Prehaud C., Lancelot R., Colas F., Guerre L., Bishop D. H. L., Diallo A., (1995), *Res. Vet. Sci.*, 58, 50-55.
48. Qvist P., Sorensen K. J., Meyling A., (1989), *J. Virol. Meth.*, 24, 269-180.
49. van Oirschot J. T., Rziha H. J., Moonen P. J., Pol J. M., van Zaane D., (1986), *J. Gen. Virol.*, 67, 1179-1182.
50. Anderson J., Mertens P. P. C., Herniman K. A. J., (1993), *J. Virol. Meth.*, 43, 167-176.