

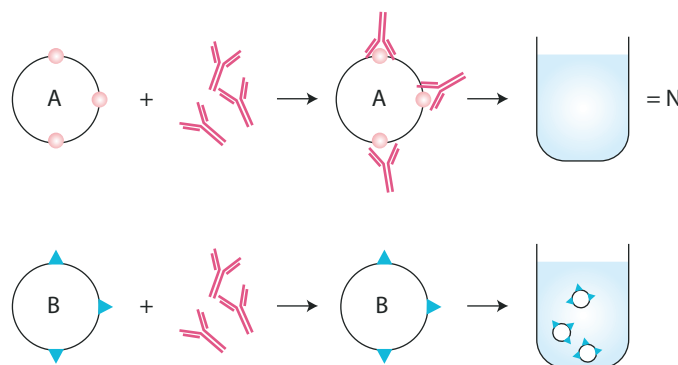
18.10. METODY IDENTYFIKACJI WIRUSÓW OPARTE NA INTERAKCJI ANTYGEN-PRZECIWCIAŁO

W odpowiedzi na zakażenia wirusowe i związane z tym pojawienie się wirusowych antygenów, organizm człowieka i zwierząt uruchamia mechanizmy komórkowe prowadzące do syntezy swoistych przeciwciał (białek – immunoglobulin), które można wykryć w krwioobiegu za pomocą odczynów serologicznych. Wirusowe antygeny są to przede wszystkim białka, kodowane przez wirusa, specyficzne dla danego szczepu. Antygenem może być również polisacharyd. W pierwszej fazie zakażenia, jak również po szczepieniu, pojawiają się makroimmunoglobuliny IgM, natomiast później immunoglobuliny IgG, których ocena pozwala na zidentyfikowanie fazy zakażenia. IgM stanowią około 10% surowicznych immunoglobulin, natomiast IgG około 75%.

Przeciwciała rozpoznają na powierzchni wirusowych antygenów specyficzne determinanty antygenowe (epitopy). Jeden antygen może posiadać liczne determinanty antygenowe. Epitop może tworzyć 5 reszt aminokwasowych lub 1–6 monosacharydów. Miejsce, w którym przeciwciało wiąże antygen nazywamy paratopem lub antydeterminantą. Interakcja pomiędzy antygenem a przeciwciałem polega na dopasowaniu przestrzennym powierzchni epitopu i paratopu. Z tego względu jeden epitop może być rozpoznawany jako komplementarny przez np. dwa różniące się sekwencją aminokwasową paratopy. Przeciwciała stosowane są do identyfikacji antygenów wirusowych, ich analizy ilościowej i jakościowej, do oczyszczania antygenów, jak również w celach terapeutycznych. W celu otrzymania przeciwciał, do krwioobiegu zwierząt doświadczalnych wprowadza się antygen. Jest to tzw. immunizacja. Zwierzętami immunizowanymi są najczęściej

króliki, owce lub kozy. Po podaniu antygenów, w surowicy zwierzęcia syntetyzowane są przeciwciała, skierowane przeciwko podanemu antygenowi. Surowica pobrana od immunizowanych zwierząt zawiera przeciwciała o zróżnicowanej specyficzności, które zostały zsintetyzowane w limfocytach B (odrębnych klonach limfocytów) w odpowiedzi na wszystkie epitopy danego antygeny. Przeciwciała takie nazywamy **przeciwciałami poliklonalnymi**, w przeciwieństwie do **przeciwciał monoklonalnych** skierowanych przeciwko jednemu epitopowi danego antygeny. Przeciwciała monoklonalne otrzymywane są z jednego klonu limfocyty B. Do wykrywania antygenów wirusowych stosuje się bezpośrednio znakowane przeciwciało lub reakcję przeprowadza się w dwóch etapach. Na I etapie stosuje się przeciwciało pierwszorzędowe, które rozpoznaje badany antygen, a następnie przeciw związanemu przeciwciału podaje się znakowane przeciwciało drugorzędowe. W tym przypadku przeciwciało pierwszorzędowe jest antygenem z licznymi epitopami dla przeciwciała drugorzędowego, co umożliwia przyłączenie licznych cząsteczek znakowanego przeciwciała drugorzędowego i wzmocnienie reakcji.

Przeciwciała poliklonalne rozpoznające różne epitopy w danym antygenie stosuje się w metodzie immunoprecypitacji, którą można wykorzystać np. do identyfikacji białek wirusowych oddziałujących z białkami komórki gospodarza. Z kolei przeciwciała monoklonalne stosuje się np. do detekcji antygenów w różnych preparatach. Spośród wszystkich przeciwciał wiążących antygen ważną rolę odgrywają **przeciwciała neutralizujące**, czyli takie, których zadaniem jest bezpośrednio unieszkodliwienie zakaźnej cząstki wirusa i jej neutralizacja (rys. 18.8). Przeciwciała neutralizujące są syntetyzowane podczas infekcji lub po podaniu szczepionki przeciwko danemu



Rys. 18.8. Test neutralizacji. Do zawiesiny wirusa A dodaje się swoiste przeciwciała wiążące białka odpowiedzialne za interakcję wirusa z komórką. Nie dochodzi do zakażenia komórek. Wirus jest neutralizowany (N). Przeciwciała te nie wiążą się z białkami wirusa B. Wirus zachowuje swoją zakaźność i namnaża się w komórkach hodowli

[Na podstawie: Dimmock N.J., Primrose S.B., *Introduction to Modern Virology*. Blackwell Science 1994]

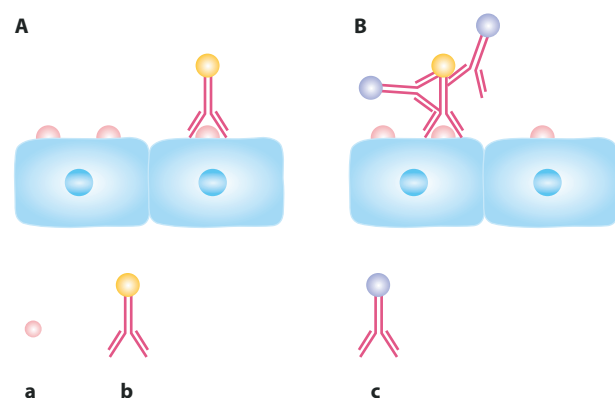
wirusowi i stanowią specyficzną obronę przed wirusami, hamując infekcję, np. blokują interakcję z receptorem.

18.10.1. Metoda precypitacji w żelu (immunodyfuzja)

W celu badania struktury antygenowej danego wirusa stosuje się prostą metodę precypitacji w żelu. Polega ona na identyfikacji antygenów wirusowych za pomocą swoistego przeciwciała w żelu agarozowym. W tym przypadku w dwóch oddzielnych dołkach wyciętych w żelu agarozowym umieszcza się w jednym badaną próbę (zawierającą badany antygen), w drugim surowicę z przeciwciałami. Antygen i przeciwciała dyfundując w żelu, po spotkaniu się ze sobą, w wyniku reakcji odpowiadających sobie antygenów i przeciwciał tworzą ostrą linię precypitacyjną.

18.10.2. Identyfikacja wirusowych antygenów

Często stosowaną metodą do detekcji wirusowych antygenów jest immunofluorescencja (IF), w której stosuje się swoiste przeciwciała połączone z substancją fluoryzującą (tzw. fluorochrom). Metodę tę można stosować do identyfikacji wirusów bezpośrednio w pobranych próbach. Znane są dwa typy IF: bezpośrednia (A) i pośrednia (B) (rys. 18.9). W metodzie bezpośredniej reakcja zachodzi między znakowanym przeciwciałem a antygenem wirusowym. W metodzie pośredniej w pierwszej fazie stosuje się do wykrywania antygeny nieznakowane przeciwciała, a po jego związaniu



Rys. 18.9. Identyfikacja wirusowych antygenów w badanym materiale. A – wirusowe antygeny na powierzchni komórki. (a) identyfikuje się za pomocą swoistych znakowanych przeciwciał (b); B – antygen wirusowy identyfikuje się przy pomocy nieznakowanego przeciwciała, a po jego związaniu do jego identyfikacji stosuje się znakowane przeciwciała II. rz. (c)

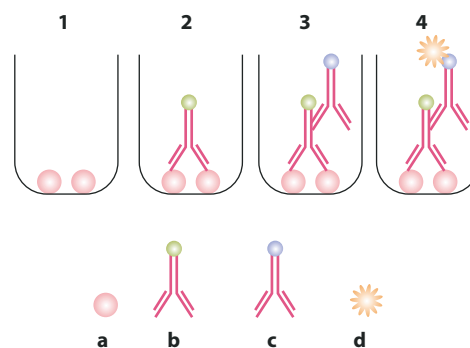
[Na podstawie: Korsman S.N.J., van Zyl G.U., Nutt L., Andersson M.I., Preiser W., *Virology*. Churchill Livingstone, Elsevier New York 2012]

wykazuje się je za pomocą znakowanych przeciwciała II rzędu związanych z fluorochromem. Powstałe kompleksy analizuje się w mikroskopie fluorescencyjnym.

IF stosuje się np. do identyfikacji swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko konkretnym antygenom w serokonwersji. Serokonwersja zachodzi w czasie 2–3 tygodni w przypadku IgM i 3–6 tygodni dla IgG po szczepieniu lub zakażeniu wirusem. **Test awidności** (ang. *Avidity test*) może być stosowany we wczesnej fazie zakażenia do testowania IgG i określenia odporności przetrwałej lub infekcji latentnej. Test ten pomaga odróżnić np. ostrą formę zakażenia od zakażenia przebytego. Polega on na mierzeniu siły wiązania antygeny mającego kilka determinantów antygenowych z wielowartościowym przeciwciałem. Awidność jest sumą powinowactwa antygeny do przeciwciała.

18.10.3. Odczyn immunoperoksydazy

Jest to odczyn immunoenzymatyczny, w którym antygen wirusowy jest identyfikowany za pomocą przeciwciała znakowanego najczęściej peroksydazą chrzanową. Związane z antygenem znakowane przeciwciała można wykryć po dodaniu substratu dla peroksydazy, która zamienia go w kolorowy produkt (chemiluminescencja). Związanie substratu może także powodować jego zamianę w produkt luminescencyjny. Świecenie substratu może być także wywołane przez



Rys. 18.10. Schemat wykrywania antygenów wirusa przy pomocy testu ELISA. Na odpowiednie podłoże nanosi się warstwę antygenów przeciw badanemu wirusowi (a) (1). Na tak przygotowane podłoże nakłada się zawiesinę materiału badanego na danego wirusa, np. surowicę zawierającą przypuszczalnie przeciwciała przeciw antygenom badanego wirusa (b) (2), po czym dokładnie płucze w celu usunięcia niezwiązanych składników i nakłada się znakowane peroksydazą przeciwciała II rz. (c) (3), a następnie substrat dla peroksydazy (d) (4). Jeżeli w badanej zawieszynie obecne były przeciwciała wiążące antygeny badanego wirusa, substrat zostanie rozłożony przez peroksydazę, co wyraża się barwną reakcją produktu reakcji

[Na podstawie: Larski Z., *Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt*. PWRL, Warszawa 1992]