

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

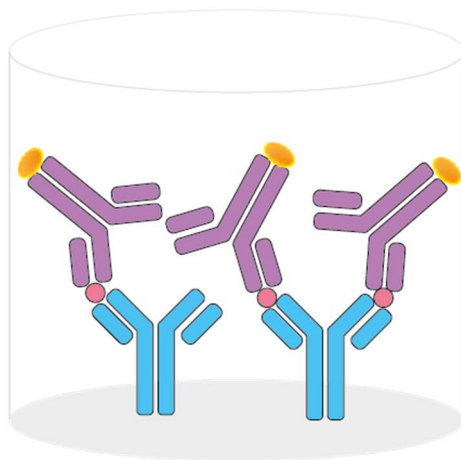


Факультет ветеринарної медицини

**Інститут післядипломного навчання
керівників та спеціалістів
ветеринарної медицини**



**ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ
У ВЕТЕРИНАРНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ
ДІАГНОСТИЦІ**



Методичні рекомендації

Біла Церква
2023

Укладачі: Шевченко М. В. асистент;
Пантелесенко О. В. асистент;
Андрійчук А. В. канд. вет. наук, доцент;
Мазур Т. Г. канд. вет. наук, доцент;
Богатко Н. М. канд. вет. наук, доцент;
Сахнюк В. В. д-р вет. наук, професор;
Богатко А. Ф. асистент;
Папченко І. В. канд. вет. наук, доцент;
Балацький Ю. О. канд. вет. наук, доцент;
Гришко В. А. канд. с-г. наук, доцент;
Царенко Т. М. канд. вет. наук, доцент.

Імуноферментний аналіз у ветеринарній лабораторній діагностиці / Шевченко М. В., Пантелесенко О. В., Андрійчук А. В., Мазур Т. Г., Богатко Н. М., Сахнюк В. В., Богатко А. Ф., Папченко І. В., Балацький Ю. О., Гришко В. А., Царенко Т. М. Біла Церква. – 2023. – 35 с.

Методичні рекомендації «Імуноферментний аналіз у ветеринарній лабораторній діагностиці» розроблені для слухачів Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини, практикуючих ветеринарних лікарів, працівників лабораторій та студентів факультетів ветеринарної медицини України. У рекомендаціях викладені теоретичні основи методу імуноферментного аналізу, основні відомості про різновиди методу, загальні правила його постановки, необхідне обладнання.

Рецензенти:

Зоценко В. М. – канд. вет. наук, доцент кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського національного аграрного університету

Гриневич Н. Є. – д-р вет. наук, професор, завідувач кафедри іхтіології та зоології Білоцерківського національного аграрного університету

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. Значення методу ІФА для ветеринарної лабораторної діагностики.....	6
2. Історія створення методу ІФА.....	7
3. Принцип методу ІФА	9
4. Обладнання для постановки ІФА.....	10
5. Стандартний набір реагентів ІФА.....	13
6. Отримання моноклональних антитіл.....	14
7. Характеристика методів та підходів у ІФА.....	15
7.1. Прямий метод ІФА.....	17
7.2. Непрямий метод ІФА.....	18
7.3. Сендвіч-метод ІФА	20
7.4. Конкурентний метод ІФА.....	21
8. Інтерпретація результатів реакції	22
8.1. Інтерпретація якісних даних	22
8.2. Інтерпретація кількісних даних	24
8.3. Програмне забезпечення для обробки результатів ІФА.....	25
9. Фактори, що впливають на результати ІФА	27
Список використаної літератури.	33

ВСТУП

Імуноферментний аналіз (ІФА) – це діагностичний тест, який широко використовується у ветеринарній медицині. Це чутливий і специфічний метод виявлення наявності антитіл або антигенів у різних зразках. Використання ІФА значно покращило діагностику багатьох захворювань у тварин, що зробило його важливим інструментом у ветеринарній лабораторній діагностиці.

Метод ІФА використовується у ветеринарії для діагностики широкого спектру захворювань інфекційної та неінфекційної етіології. Найбільш часто досліджують сироватку крові або плазму, можливо досліджувати молоко, іноді матеріалом для дослідження можуть бути сеча і кал.

Метод ІФА запропонований для виявлення антитіл проти багатьох вірусних і бактеріальних хвороб, а також паразитів, зокрема *Leishmania*, *Toxoplasma* та *Echinococcus*

В основі ІФА лежить принцип взаємодії антиген-антитіло. Аналіз включає іммобілізацію антигену або антитіла на твердій поверхні, наприклад, мікропланшеті, а потім виявлення зв'язування комплементарного антитіла або антигену за допомогою імуноферментної системи виявлення. Фермент каталізує колориметричну або флуоресцентну реакцію, яку можна виміряти спектрофотометрично.

Існує кілька типів ІФА, які використовуються у ветеринарній медицині, включаючи прямий, непрямий, конкурентний та сендвіч-ІФА. Прямий ІФА використовується для виявлення антигенів, тоді як непрямий ІФА використовується для виявлення антитіл. Конкурентний ІФА використовується для виявлення наявності специфічного антигену в зразку, який конкурує з відомим антигеном за зв'язування з обмеженою кількістю антитіл. Сендвіч-ІФА використовується для виявлення специфічного антигену за допомогою двох антитіл.

Однією з основних переваг ІФА є його висока чутливість і специфічність. ІФА може виявляти низькі рівні антигенів або антитіл у зразку, що робить його інформативним для ранньої діагностики захворювань. ІФА також є відносно швидким і простим у виконанні тестом, який можна автоматизувати для високопродуктивного скринінгу.

Однак метод імуноферментного аналізу має деякі обмеження. Можлива перехресна реактивність з нецільовими білками, що може призвести до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів. Для проведення ІФА також потрібне спеціалізоване обладнання та кваліфікований персонал.

ІФА є потужним діагностичним інструментом у ветеринарній медицині, який має численні застосування в діагностиці та скринінгу захворювань. Розуміння принципів і застосування ІФА є важливим для лікарів ветеринарної медицини та фахівців клініко-діагностичних лабораторій. Незважаючи на те, що існують обмеження у використанні ІФА, його висока чутливість і специфічність роблять цей аналіз важливим інструментом у діагностиці та моніторингу здоров'я тварин.

1. Значення методу ІФА для ветеринарної лабораторної діагностики

Імуноферментний аналіз став невід'ємним інструментом ветеринарної медицини для діагностики інфекційних та паразитарних захворювань. Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (МЕБ) рекомендує використовувати ІФА в якості інструменту діагностики деяких захворювань тварин. Керівництво з діагностичних тестів і вакцин МЕБ містить рекомендації щодо діагностики різних інфекційних захворювань у тварин, і для багатьох з них метод ІФА є рекомендованим.

В Україні ІФА широко використовується для діагностики захворювань у тварин. У минулому найбільш поширеними методами діагностики були бактеріологічні та різноманітні серологічні тести. Однак в останнє десятиліття використання ІФА значно зросло завдяки його високій чутливості, специфічності та наявності стандартизованих і валідованих комерційних тест-наборів.

Нині в Україні ІФА широко використовується для діагностики лейкозу великої рогатої худоби, інфекційних хвороб продуктивних та домашніх тварин. У державних та комерційних лабораторіях метод ІФА використовують для діагностики більшості інфекційних хвороб. Окрім того, ІФА відіграє вирішальну роль у нагляді та моніторингу захворювань тварин в Україні. Він широко використовується в програмах нагляду за захворюваннями, які були створені для контролю і запобігання поширенню інфекційних та паразитарних хвороб тварин. Наприклад, щорічний «План протиєпізоотичних заходів з профілактики основних заразних хвороб тварин в Україні» включає наступні діагностичні дослідження, які можна виконати, використовуючи метод ІФА: серологічні дослідження на лейкоз великої рогатої худоби, бруцельоз, інфекційний ринорухейт великої рогатої худоби, лептоспіроз (окремі серовари), лістеріоз, блутанг, ящур всіх типів, заразний вузликовий дерматит, губчастоподібна енцефалопатія, хламідіози, паратуберкульоз, катаральна лихоманка овець, репродуктивно-респіраторний синдром свиней, хвороба Ауескі, африканська чума свиней, парвовірусна інфекція свиней, хвороба Тешена, трихінельоз, інфекційна анемія коней, грип птиці, хвороба Ньюкасла.

Метод ІФА є життєво важливим інструментом у ветеринарній діагностиці в усьому світі і, зокрема, в Україні.

2. Історія створення методу ІФА

Імуноферментний аналіз (ІФА), як біохімічний метод, новий діагностичний інструмент для виявлення та кількісного визначення антигенів або антитіл у біологічних зразках, уперше був описаний Євою Енгвалл (Eva Engvall) і Пітером Перлманном (Peter Perlmann) у 1971 році в результаті вивчення можливості приєднання ферментів до білків, у тому числі і до імуноглобулінів. Метод ІФА вперше поєднував ферментативний та імунохімічний підходи, коли антитіла виступають у якості специфічного детектора речовини, що визначається, а фермент – маркера імунохімічної реакції, з допомогою якого ідентифікується утворений комплекс.

Невдовзі метод ІФА був визнаний цінним діагностичним інструментом у галузі ветеринарної медицини і швидко прийнятий для використання в діагностиці різних захворювань тварин.

Упродовж багатьох років метод ІФА вдосконалювався і був адаптований для використання в широкому спектрі застосувань, включаючи клінічну діагностику, біомедичні дослідження і контроль якості в харчовій промисловості. Розробка модифікацій методу та створення більш чутливих і специфічних наборів для ІФА також підвищили точність і надійність методу.

Сьогодні метод ІФА широко використовується у гуманній і ветеринарній медицині та став важливим інструментом ранньої діагностики, контролю та профілактики широкого спектру захворювань. Універсальність, швидкість і точність цього методу зробили його наріжним каменем сучасних діагностичних досліджень.



Eva Engvall at Burnham Institute

1941 — Альберт Х. Кунс та його колеги першими позначили антитіла флуоресцентним барвником і використовували його для ідентифікації антигенів у зрізах тканин. Цей метод відомий сьогодні як імуофлуоресценція.

1971 — Сва Енгвалл і Пітер Перлман (незалежно один від одного) винаходять метод, який зробив революцію в медицині під назвою ІФА. Метод використовує антитіла для виявлення присутності гормонів або вірусів.

1977 — Сандвіч-ІФА метод, в якому антитіло наноситься на поверхню пластини для виявлення цільового антигену.

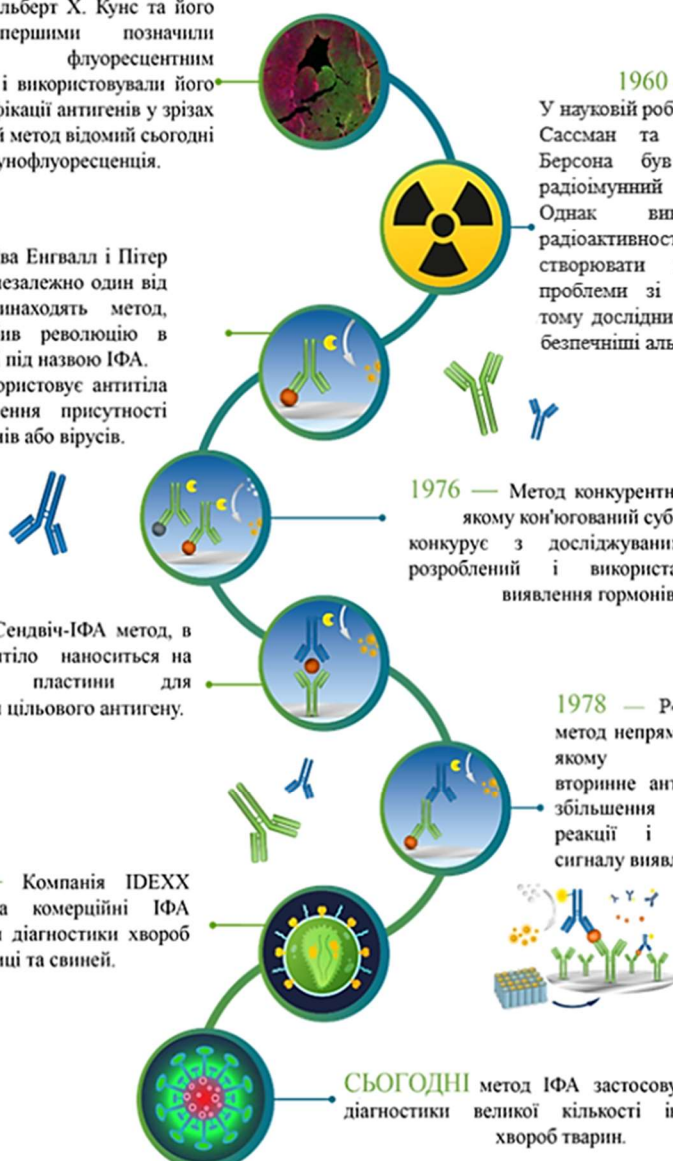
1985 — Компанія IDEXX представила комерційні ІФА набори для діагностики хвороб птиці та свиней.

1960 — У науковій роботі Розалін Сассман та Соломона Берсона був описаний радіоімунний аналіз. Однак використання радіоактивності може створювати потенційні проблеми зі здоров'ям, тому дослідники шукали безпечніші альтернативи.

1976 — Метод конкурентного ІФА, в якому кон'югований субстрат конкурує з досліджуваним білком, розроблений і використаний для виявлення гормонів.

1978 — Розроблений метод непрямого ІФА, в якому додається вторинне антитіло для збільшення чутливості реакції і посилення сигналу виявлення.

СЬОГОДНІ метод ІФА застосовується для діагностики великої кількості інфекційних хвороб тварин.



3. Принцип методу ІФА

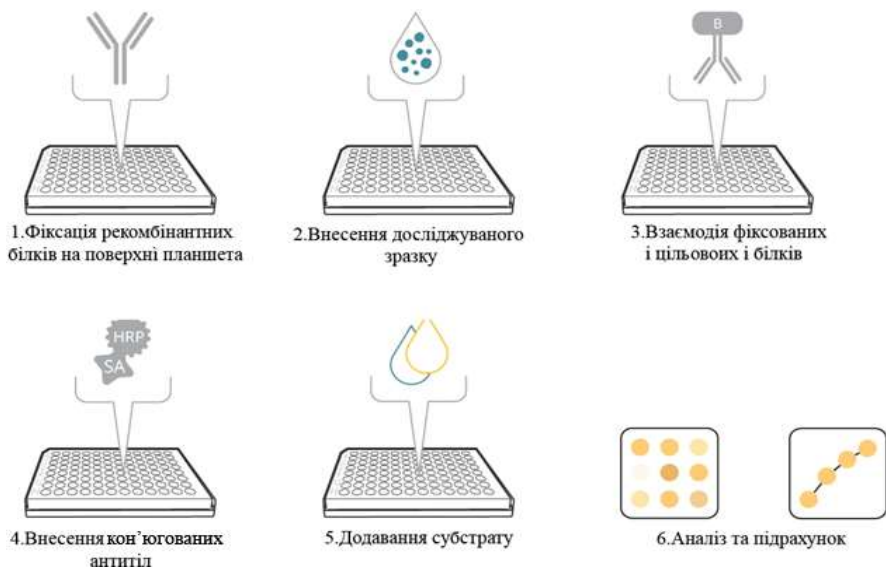
Основний принцип ІФА – це утворення комплексу антиген-антитіло.

Антиген – генетично чужорідна речовина, що індукє специфічну імунну реакцію та реагує з антитілами, що утворюються при потраплянні антигену в організм.

Антитіло – складна білкова природна сполука, що виникає в результаті імунної відповіді організму при введенні або потраплянні в нього чужорідних речовин, а також збудників інфекційних хвороб, різноманітних паразитів тощо. Наявність антитіл свідчить про захворювання чи пост-вакцинальний імунітет.

Якщо антиген (молекула-мішень) являє собою білок, то його використовують для одержання антитіл, за допомогою яких потім і виявляють дану мішень. Спершу історично використовувались первинні антитіла, що були за своєю природою поліклональними. Розробка і застосування моноклональних антитіл дали змогу значно покращити специфічність імуноферментного аналізу.

Ферментний імуносорбентний аналіз широко застосовується для діагностики різних інфекційних, інвазійних захворювань, ракових процесів (в основному завдяки специфічним білкам і пептидам), визначення концентрації різноманітних низькомолекулярних сполук (токсини, лікарські засоби тощо).



За www.mabtech.com

Рис. 1. Кроки та зміст реакції ІФА.



Дізнайтеся, як крок за кроком провести ІФА-тест. Процедура, показана в цьому відео, є специфічною для тестування птахів з використанням набору IDvet (Франція).

4. Обладнання для постановки ІФА

Для постановки ELISA потрібен такий базовий набір обладнання та витратних матеріалів:

1. Імуноферментний аналізатор (рідер);
2. Мікроплашковий інкубатор-шейкер;
3. Мікроплашковий дозатор-промивач (вошер);
4. Мікроцентрифуга-струшувач;
5. Термостат;
6. Електрошафа сушильна;
7. Холодильна камера;
8. Морозильна камера;
9. Дистилятор;
10. Одноканальні автоматичні дозатори перемінного об'єму 5 – 40 мкл;
11. Одноканальні автоматичні дозатори перемінного об'єму 20 – 200 мкл;
12. Одноканальні автоматичні дозатори перемінного об'єму 100 – 1000 мкл;
13. Багатоканальні автоматичні дозатори перемінного об'єму 50 – 300 мкл;
14. Наконечники для автоматичних дозаторів;
15. Пробірки типу “EPPENDORF” об'ємом 1,5 мл;
16. Лабораторний посуд – мірні циліндри та колби.



3D-IW8. Inteliwasher – Промивач планшетів автоматичний



HiRo MPP-96. Фотометр для мікропланшетів (рідер)



PST-60HL-4. Термошейкер для планшетів



Мікроцентрифуга-струшувач



Автоматичні дозатори перемінного об'єму

На ринку представлені різні виробники обладнання для ІФА, зокрема Awareness Technology, Inc, НТІ (США), АТОМ, Maroche (Італія), LabAnalyt, Rayto (Китай) тощо.

ІФА дозволяє виявляти антигени збудників бактеріальних, вірусних та інвазійних хвороб, а також антитіла, що утворились в організмі тварин у відповідь на проникнення антигенів.

5. Стандартний набір реагентів ІФА

Планшети з покриттям: 96-лункові планшети виготовлені з полістиролу і покриті інактивованим антигеном або антитілом. Це покриття є місцем зв'язування антитіл або антигенів у зразку. Незв'язані антитіла або антигени в зразку змиваються після інкубації.

Розчинник для зразка: більшість аналізів вимагають певного розведення зразка. Зразки додаються в розчинник і перемішуються перед нанесенням на планшети з покриттям.

Контролі: позитивний контроль – це розчин, який містить антитіла або антиген. Негативний контроль – розчин без антитіл або анти-

гену. Контролі допомагають нормалізувати або стандартизувати кожен планшет. Контролі також використовуються для валідації аналізу і для розрахунку результатів зразків. У деяких тестах контролі попередньо розведені і готові до використання, а в інших тестах контролі необхідно розводити так само, як і зразки. Необхідно дотримуватись правил роботи, наведених в інструкції до виробу.

Кон'югат для ІФА – це мічені ферментом антитіла або антигени, які специфічно реагують зі зв'язаними на планшетах аналітами зразка. Незв'язаний кон'югат відмивається після інкубації і перед додаванням субстрату. Оптична щільність колориметричного субстрату прямо пропорційна кількості зв'язаного ферменту.

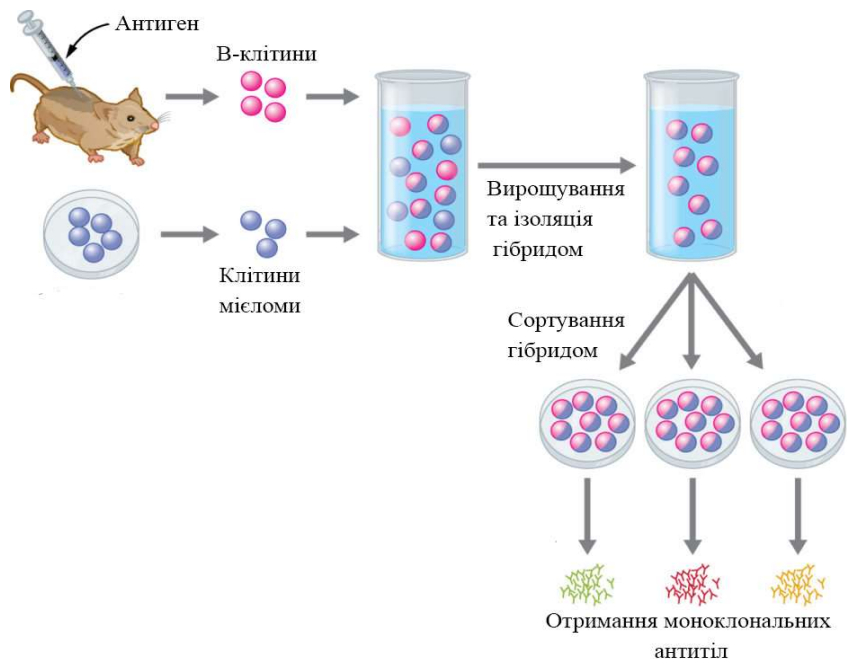
Субстрат для пероксидазних кон'югатів – це суміш водню пероксиду і хромогену, який реагує з ферментною частиною кон'югату, утворюючи забарвлення.

Промивний концентрат – це буферний розчин, що містить мийний засіб, який використовується для змивання незв'язаних матеріалів із пластин. Необхідно дотримуватися настанови в інструкції до виробу щодо розведення промивного розчину перед використанням.

Стоп-розчин зупиняє реакцію фермент-субстрат і, отже, проявлення кольору.

6. Отримання моноклональних антитіл

Моноклональні антитіла отримують *in vitro* за допомогою методів культури тканин. Їх отримують шляхом багаторазової імунізації тварини (часто миші) певним антигеном. Потім В-клітини із селезінки імунізованої тварини видаляють. Одна В-клітина може синтезувати лише один вид антитіла. Оскільки нормальні В-клітини не здатні ділитися вічно, вони зливаються з раковими В-клітинами (клітинами мієломи), які внаслідок мутації втратили механізм апоптозу (клітинної смерті). Отримані клітини називаються гібридами. Після цього всі клітини поміщають у селективне середовище, яке дозволяє рости лише гібриdomам. Незлиті клітини мієломи не можуть рости, а будь-які незлиті В-клітини відмирають. Потім визначають гібриdomи, які продукують бажані моноклональні антитіла. Їх у подальшому вирощують у культури тканин, які постійно синтезують моноклональні антитіла.



За www.courses.lumenlearning.com

Рис. 2. Отримання моноклональних антитіл.

7. Характеристика методів та підходів у ІФА

Методи ІФА розділяються на дві великі групи: гомогенний і твердофазний (гетерогенний) аналіз.

Гомогенні методи аналізу (“EMI”, *enzyme multiplay immunotechnic*) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. Суть цих методів полягає в тому, що ферменти стають інактивованими, коли вони зв'язуються з антитілами. Отже, відсутня стадія промивання, де антиген відділяється із середовища. Гомогенний імуноферментний метод, зазвичай, використовується для вимірювання речовин у малих кількостях, наприклад терапевтичні препарати. Цей метод дороговартісний і має низьку чутливість.

Твердофазний, або гетерогенний, метод у світовій літературі скорочено позначають “ELISA” (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*,

що означає “*ферментзв’язаний імуносорбентний аналіз*”). Під терміном ІФА ми маємо на увазі саме ELISA. У цьому методі для запобігання викривленню результатів будь-які молекули, що не зв’язалися в комплекс антиген-антитіло, видаляються з лунки шляхом промивання. Цей метод більш чутливий та частіше використовується для виявлення специфічних антитіл і розчинних антигенів.

Виявлення специфічних антитіл у фізіологічних рідинах відіграє важливу роль у клінічній діагностиці різноманітних захворювань. Завдяки ІФА з’явилася можливість визначати антитіла не тільки якісно, а й кількісно у широкому діапазоні концентрацій із використанням лише одного розведення сироватки, плазми або молока. ІФА дозволяє також легко розрізняти антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів.

Саме через те, що структура та характеристики речовин, які підлягають вимірюванню, не завжди однакові, для підвищення специфічності вимірювання було розроблено різні типи ІФА: прямий, непрямий, сендвіч та конкурентний. Останні два методи також можна поділити на прямі та непрямі.

Для виявлення **антитіл** застосовують **непрямий** та **конкурентний метод**.

Для виявлення **антигенів** застосовують **прямий, непрямий та сендвіч-метод**.

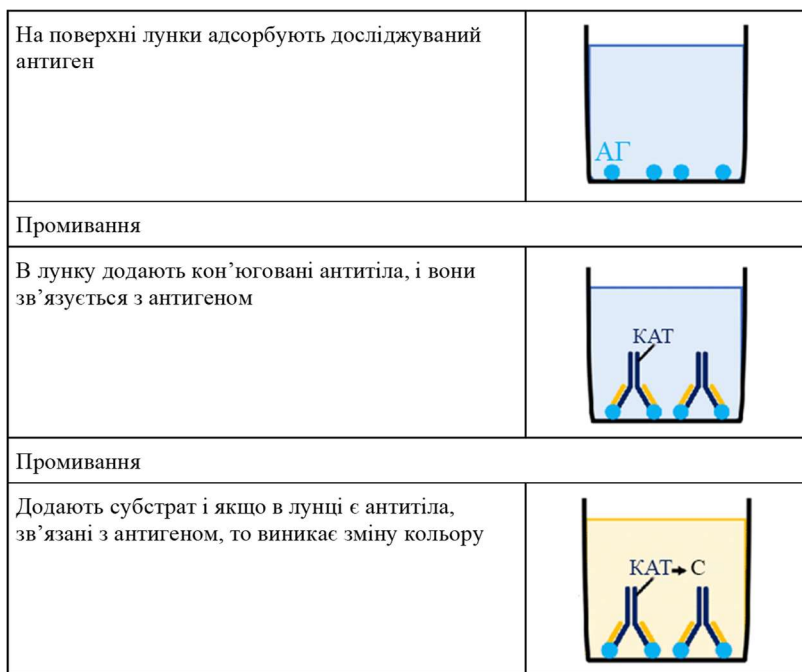


Рис. 3. Класифікація варіантів ІФА.

7.1. Прямий метод ІФА

Цей метод застосовують для пошуку розчинних високомолекулярних антигенів. Це піонер усіх ІФА-методів і був розроблений на початку їх використання.

Перший етап – зв’язування, що включає додавання розчину, який містить антиген, до лунки планшета. Антиген неспецифічно сорбується на стінках планшета. Після завершення етапу інкубації наступним кроком є промивання планшетів від незв’язаних речовин і блокування пустих ділянок лунки нейтральним білком. Після додавання нейтрального білка планшет знову промивають і додають вибрані антитіла первинного виявлення, кон’юговані з ферментом. Планшет надалі інкубують. Лунку планшета знову промивають. Якщо антитіла специфічно зв’язалися з антигеном, вони залишаються в лунці. В такому разі при додаванні субстрату відбудеться зміна кольору. Цей метод дороговартісний, через те що всі реагенти потрібно готувати окремо. Також метод має відносно низьку чутливість, оскільки рідина з дослідним антигеном буде мати велику кількість інших білків.



За (Boguszewska K. та. ін. 2019)

Рис. 4. Схеми прямого методу ІФА.

	 Візуалізація процесів, що відбуваються за постановки прямої реакції ІФА.
---	---

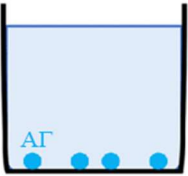
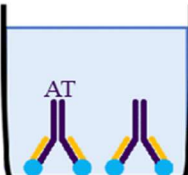
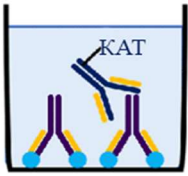
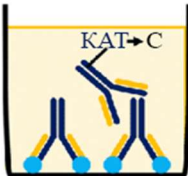
7.2. Непрямий метод ІФА

Цей метод можна застосовувати для виявлення антитіл та антигенів. Для непрямого аналізу ІФА необхідні два види антитіл: антитіла первинного виявлення, які зв'язується із досліджуваним білком, і вторинні антитіла, що пов'язані з ферментом, які є комплементарні до первинного антитіла.

На першому етапі на стінку планшета сорбується відомий антиген чи антитіла, лунку промивають. Потім додають дослідний зразок, що містить антитіла або антигени, залежно від мети дослідження. Лунку знову промивають і додають вторинні кон'юговані антитіла, що комплементарні до комплексу антитіло-антиген (АТ-АГ) із попереднього етапу.

Непрямий ІФА має вищу чутливість порівняно з прямим. Він також менш дороговартісний і більш гнучкий завдяки багатьом можливим первинним антитілам, які можна використовувати. Єдиним серйозним недоліком цього типу ІФА є ризик перехресної реакції між вторинними антитілами.

Отже, в прямому методі ІФА використовують антитіла, що кон'юговані з ферментом. Умовно кажучи, з одним дослідним антигеном зв'яжеться тільки одне антитіло. В непрямому методі використовуються первинні антитіла та вторинні кон'юговані антитіла. Умовно кажучи, з одним первинним антитілом зв'яжеться багато вторинних антитіл і це значно підвищує сигнал.

В лунці з набору містяться кон'юговані антигени	
В лунку вносять дослідний матеріал, що містить антитіла, які зв'язуються з нанесеним на лунку антигеном	
Промивання	
В лунку вносять кон'юговані антитіла, які специфічні до комплексу антиген + антитіло	
Промивання	
Додають субстрат, який зв'язується з кон'югованим антитілом. За позитивної реакції відбувається зміна забарвлення розчину в лунці планшетки	

За (Boguszewska K. та. ін. 2019)

Рис. 5. Схема непрямого методу ІФА.

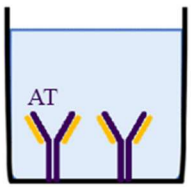
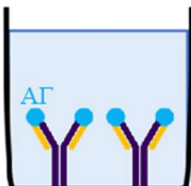
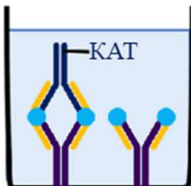


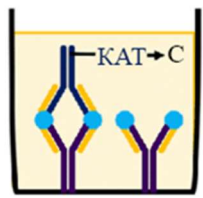
Візуалізація процесів, які відбуваються
за постановки непрямої реакції ІФА.

7.3. Сендвіч-метод ІФА

Це сучасний метод, який застосовують для виявлення антигенів.

На відміну від прямого та непрямого ІФА, сендвіч-ІФА починається із нанесених на лунки планшета антитіл захоплення. Його називають «сендвічем», оскільки антигени затиснуті між двома шарами антитіл (антитіла захоплення та виявлення). Потім цільовий антиген додають до планшетів для зв'язування з антитілом захоплення та інкубують. Планшет повторно промивають, у лунку додають антитіла первинного виявлення і знову інкубують. На цьому етапі антитіла можуть бути кон'юговані і реакція буде пряма. В сучасних наборах частіше використовують вторинні ферментно-кон'юговані антитіла. Тобто використовують непряме виявлення для підвищення сигналу. Після додавання антитіл виявлення планшет повторно промивається і в лунку додається субстрат для зміни забарвлення. Сендвіч-ІФА має найвищу чутливість серед усіх типів ІФА.

У лунці набору містяться закріплені антитіла захоплення	
У лунку додають дослідний антиген, який зв'язується із закріпленими антитілами захоплення	
Промивання	
У лунку додають кон'юговані антитіла, які прикріплюються до зв'язаного антигену	

Промивання	
У лунку додають субстрат, що зв'язується з кон'югованим антитілами і викликає зміну забарвлення	

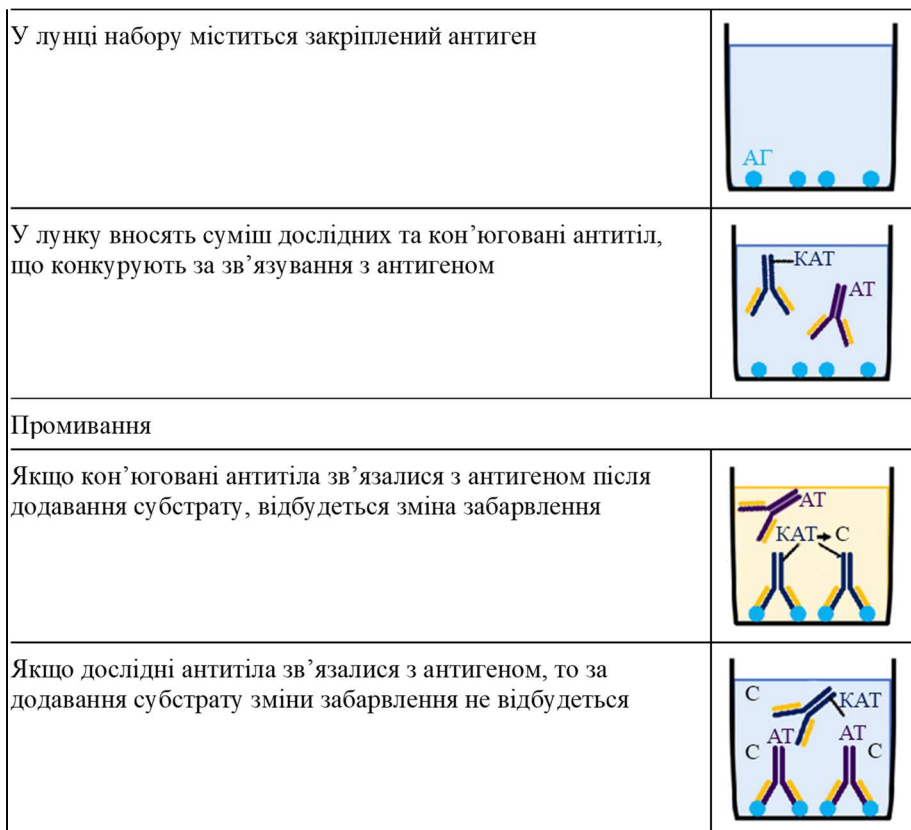
За (Boguszewska K. та. ін. 2019)

Рис. 6. Схема сендвіч-методу ІФА.

	 Візуалізація процесів, які відбуваються за постановки сендвіч ІФА.
---	---

7.4. Конкурентний метод ІФА

Цей метод встановлює наявність антитіл, специфічних до антигенів, у досліджуваних зразках (сироватка, плазма тощо). У цьому типі ІФА використовуються два специфічних антитіла, кон'юговане з ферментом антитіло та інше антитіло, наявне в тестовій позитивній сироватці (якщо сироватка негативна, реакція не відбувається). В лунку, на якій адсорбований антиген, вносять суміш двох антитіл, що призводить до конкуренції за зв'язування з антигеном. Наявність зміни забарвлення свідчить про те, що тест є негативним, оскільки антитіла, кон'юговані з ферментом, зв'язали антигени (а не антитіла досліджуваної сироватки). Відсутність забарвлення свідчить про наявність цільових антитіл у досліджуваній сироватці. Конкурентний ІФА має низьку специфічність і не може використовуватися в розведених зразках. Його переваги полягають у тому, що потрібно менше очищення зразка. Він може вимірювати великий діапазон антигенів у даному зразку і може використовуватися для малих антигенів.



За (Boguszewska K. та. ін. 2019)

Рис. 7. Схема конкурентного методу ІФА.

8. Інтерпретація результатів реакції

8.1. Інтерпретація якісних даних

Для визначення результатів ІФА планшети поміщають у фотометр для мікропланшетів (рідер). У ньому за допомогою датчика інтенсивності світіння визначають показники кожної лунки. Ця величина переводиться у числову форму і передається на комп'ютер. Дані кожної лунки порівнюють одна з одною або з контролем для визначення відносної кількості антигену чи антитіл у кожній лунці.

Результати ІФА дають три різні типи даних: якісні, напівкількісні та кількісні.

Інтерпретація результату вимірювання буде залежати від типу реакції. Це пов'язане з тим, що відсутність забарвлення за конкурентного ІФА вказує на позитивний результат, а за сендвіч-ІФА – на негативний результат дослідження.

Інтерпретація якісних даних. Якісна реакція інтерпретується стосовно показників позитивного і негативного контролю та пустої лунки. Якісну оцінку можна провести візуально (без застосування приладів). Дані підтверджують або спростовують наявність певного антигену в зразку. Ці дані є відповіддю «так» або «ні» та не можуть встановити сумнівні результати.

Інтерпретація напівкількісних даних. За інтерпретації напівкількісних даних оцінюються числові показники, що надав прилади. Оцінку проводять, порівнюючи дані дослідних лунок із контролями. В інструкції до кожного набору наводиться формула, згідно з якою вираховуються позитивний, негативний та сумнівні результати.

При використанні методу **конкурентного ІФА** наявність забарвлення свідчить про відсутність цільових антитіл у досліджуваному зразку. На рисунку 8 наведені результати дослідження сироватки корів на антитіла до збудника лейкозу. Нижче наведено приклад розрахунку результатів напівкількісних даних згідно з інструкцією до набору ID Screen® BLV Competition.

Формула набору ID Screen® BLV Competition:

$$S/N = \frac{O\text{Щ}_{\text{зразка}}}{O\text{Щ}_{\text{К-}}} \times 100,$$

де S/N співвідношення показників дослідного зразку до негативного контролю, $O\text{Щ}_{\text{зразка}}$ показники оптичної щільності дослідного зразку, $O\text{Щ}_{\text{К-}}$ показники оптичної щільності негативного контролю.

Таблиця 1. Інтерпретація результатів досліджень після підрахунку за формулою

Значення S/N	Результат
$S/N \% < 50 \%$	Позитивний
$50 \% < S/N \% < 60 \%$	Сумнівний
$S/N \% > 60 \%$	Негативний

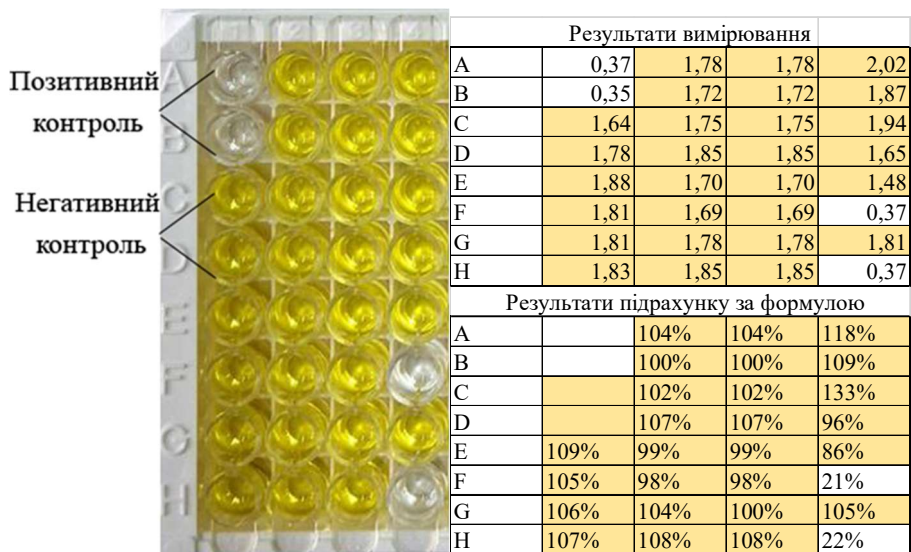


Рис. 8. Інтерпретація результатів реакції ІФА.

Реакція вважається негативною, якщо співвідношення оптичної щільності дослідного зразку до оптичної щільності негативного контролю більше ніж 60 %. Тобто показники у негативного контролю (що не містить антитіл) і дослідного зразку близькі один до одного.

Реакція вважається позитивною, якщо співвідношення оптичної щільності дослідного зразку до оптичної щільності негативного контролю менше ніж 50 %. Тобто показники негативного контролю (що не містить антитіл) і позитивний дослідний результат значно відрізняються один від одного.

За постановки сендвіч-ІФА наявність кольору свідчить про наявність цільового антигену в матеріалі. Отже, більша різниця між негативним контролем (що не містить антитіл) і дослідним матеріалом буде свідчити про позитивну реакцію.

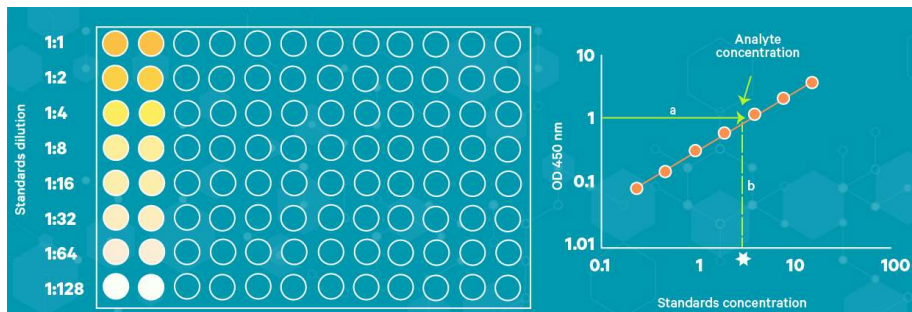
8.2. Інтерпретація кількісних даних

Для інтерпретації результатів кількісної ІФА на графіку будують стандартну криву. Для цього в перший рядок лунок вносять зразок із відомою концентрацією білку (наприклад позитивний контроль). У першу лунку вносять базову концентрацію, в наступну – розбавлений зразок із попередньої лунки і т. д. (табл. 2).

Таблиця 2. Результати розведення позитивного контролю

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрації	K+	K+/2	K+/4	K+/8	K+/16	K+/32	K+/64	K+/128

У сендвіч ІФА K+ – це антигени. Чим більша концентрація антигену, тим більша оптична щільність (рис. 9). Для побудови стандартної кривої на графіку ставлять позначку напроти осі Y, що показує рівень оптичної щільності. Напроти поставленої позначки на осі X вказуємо кількість білку, що відома з інструкції набору. Вказавши всі 8 розведень, провести через всі позначки лінію.



За www.technologynetworks.com

Рис. 9. Стандартна крива для визначення результатів ІФА.

Для встановлення концентрації досліджуваного антигену потрібно поставити позначку напроти осі Y (зелена стрілка рис. 9), що відповідає результатам досліджень. Провівши перпендикуляр на вісь X (зелена штрих-лінія рис. 9), ми зможемо встановити концентрацію антигену, що відповідає визначеній оптичній щільності.

8.3. Програмне забезпечення для обробки результатів ІФА

Програмне забезпечення для обробки результатів ІФА постачається у комплекті з обладнанням для ІФА і є корисним інструментом для виконання аналізу. Програмне забезпечення дозволяє спростувати процес планування та обліку результатів дослідження, надає користувачам зручний візуальний інтерфейс для управління функціями рідера.

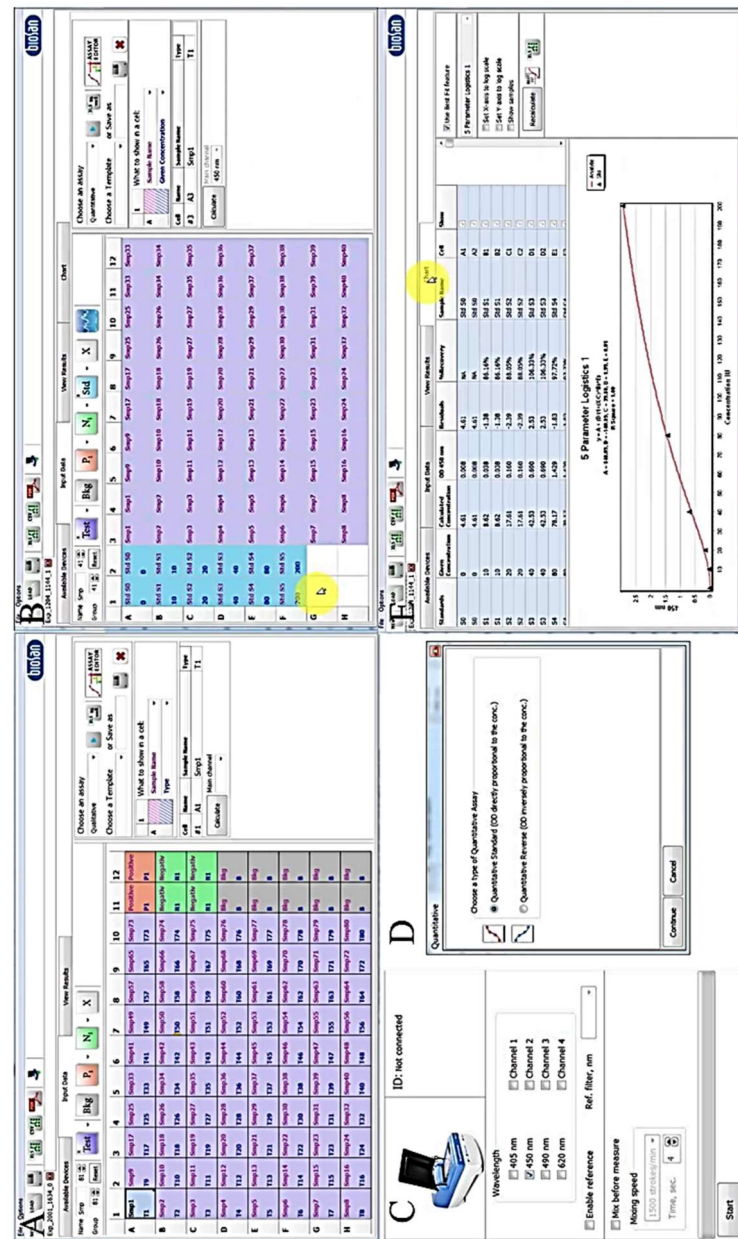


Рис. 10. Інтерфейс програми від виробника обладнання BIOSAN.

А. Позначення лунок для якісного ІФА аналізу. В. Позначення лунок для кількісного ІФА аналізу. С. Вибір лами для зчитування ОПЗ лунок планшетки. Д. Вибір параметрів кривої для кількісної інтерпретації результатів. Е. Результати кількісного ІФА: зверху – числові показники дослідних зразків, знизу – стандартна крива.

Перед початком дослідження у програму необхідно внести методику дослідження згідно з інструкцією до набору. Методи зберігаються в пам'яті пристрою, і для проведення наступних досліджень потрібно буде лише вибрати збережений шаблон.

Планшет для ІФА має дві осі, які пронумеровані цифрами та буквами латинського алфавіту. На етапі планування дослідження у візуальному інтерфейсі програми необхідно позначити лунки, в які будуть внесені позитивний та негативний контроль та дослідні зразки. При проведенні кількісного ІФА потрібно вказати розведення стандартних зразків.

Після аналізу планшетки рідером для кожної лунки планшета в інтерфейсі програмного забезпечення відображаються числові показники оптичної щільності. Числові показники оптичної щільності, які відображаються для кожної лунки планшета в інтерфейсі програмного забезпечення, являють собою дані, отримані зі зразка в результаті дослідження.

Програма, що опрацьовує ці дані, використовує попередньо запрограмовану методику інтерпретації даних. Завдяки цьому користувач отримує готовий результат аналізу, який представлений у вигляді стандартної кривої. Порівняння результатів дослідження з контрольними даними дозволяє зробити висновки щодо властивостей та характеристик зразка.

Отриманий звіт містить інформацію про числові показники оптичної щільності, які були отримані під час аналізу кожної лунки планшетки. Звіт також містить інтерпретований результат аналізу, який відображає характеристики та властивості зразку. Звіт готовий до друку та може бути використаний у наступних дослідженнях або для подальшого аналізу.

Інструкції для користування різним програмним забезпеченням представлені на сайті виробника.

9. Фактори, що впливають на результати ІФА

Метод ІФА широко використовується для виявлення цільових антитіл і антигенів. Однак багато факторів можуть впливати на реакцію ІФА, тому під час постановки реакції необхідно дотримуватися

підготовчих та технічних вимог для уникнення хибнопозитивних або хибнонегативних результатів дослідження.

До таких факторів відносяться: фактор «зразків»; фактор «реагентів»; фактор «виконання реакції».

Фактор «зразків»

Види зразків, які можна використовувати для ІФА: рідини організму (сироватка, плазма крові, спинномозкова і синовіальна рідина), секрети (слина) і екскрети (сеча, кал). Зразки можуть бути використані для визначення антитіл чи антигенів. Найчастіше в дослідженнях ІФА використовують зразки сироватки крові. Плазма зазвичай вважається таким же зразком, як і сироватка. Тому хибнонегативні або хибнопозитивні результати ІФА, пов'язані з фактором «зразків», виникають за присутності компонентів, що негативно впливають на хід реакції, та поділяються на *ендогенні* та *екзогенні*.

Ендогенні компоненти – це речовини організму, що містяться в досліджуваному зразку і можуть різною мірою впливати на результат реакції, викликаючи хибні та перехресні реакції. До таких речовин відносяться: ревматоїдний фактор, комплемент, гетерофільні антитіла, імунні комплекси, аутоантитіла, “природні антитіла” проти невідомих антигенів та інші речовини організму (ліпіди, білірубін, гемоглобін тощо). Зазвичай дослідник не може впливати на вміст ендогенних компонентів у зразках, проте в разі отримання хибних результатів ІФА потрібно звернути увагу на ймовірність присутності таких речовин.

Екзогенні компоненти – це забруднення, що часто спричинені неправильним забором та зберіганням зразків крові, що використовуються для ІФА. Наприклад, гемоліз крові, забруднення зразку бактеріями, тривале зберігання зразку, неповна аглютинація зразку та вплив добавок у пробірці для забору крові.

Гемоліз еритроцитів у зразках крові, спричинений людським фактором, може призвести до вивільнення великої кількості гемоглобіну і підвищення пероксидазної активності у зразку. Це сприяє специфічному надмірному забарвленню, яке впливає на результати аналізу. Тому зразок повинен бути зібраний таким чином, щоб уникнути гемолізу.

Зразки, забруднені бактеріями: оскільки бактерії можуть містити ендогенну пероксидазу хрону, зразки, забруднені бактеріями, як і гемолізовані зразки, також можуть давати неспецифічне забарвлення і впливати на результати вимірювання.

Порушення умов зберігання зразків: у зразках, що тривалий час зберігалися в холодильнику, сироватковий IgG може полімеризуватися в мультимери, а альфа-фетопротейн утворювати димери, що може призвести до надмірного фону ІФА і навіть хибнопозитивних результатів при непрямому ІФА. За тривалої інкубації зразків (понад одну добу) іноді імунореактивність антигену або антитіла послаблюється і можуть виникати хибнонегативні результати. Для подолання вищезазначених перешкод зразки сироватки для ІФА повинні бути зібрані свіжими. Якщо тест не виконується негайно, зразки сироватки, зібрані упродовж 5 днів, можна зберігати при температурі 2–8 °С, при -20 °С – до 30 діб, а при -80 °С – до 60 діб. У зразках, розчинених після кріоконсервування, білки частково концентруються і розподіляються нерівномірно. Перед визначенням зразок слід ретельно перемішати. Однак перемішувати слід обережно, уникаючи сильних вібрацій.

Неповна аглютинація зразків: за відсутності прокоагулянту та антикоагулянту нормальна кров починає згортатися через 0,5–2 год. після забору і повністю згортається через 18–24 год. Якщо сироватку центрифугувати, коли кров не повністю згорнулася, частина фібриногену залишається в сироватці, і під час проведення ІФА може утворитися згусток фібрину, видимий неозброєним оком, що може призвести до хибнопозитивних результатів. Тому після забору зразку крові сироватка повинна бути відокремлена після достатнього згортання або зразки повинні бути зібрані за допомогою пробірки для забору крові з гелем для розділення або відповідним коагулянтом, що попередньо додали в пробірку.

Вплив речовин, доданих у пробірку для відбору зразків: антикоагулянти (гепарин), інгібітори ферментів (NaN_3) можуть пригнічувати активність пероксидази хрону в системі ІФА. Спеціальні пробірки для відбору сироватки містять гелі для швидкого розділення фракцій крові. Потрібно обережно відбирати зразки, тому що частинки гелю можуть впливати на результати ІФА.

Фактор «реагентів»

Якість ІФА-наборів на ринку сильно варіюється. Якість наборів має вплив на точність результатів ІФА-тесту. Тому дуже важливо вибрати правильний набір ІФА. Важливими факторами, які слід враховувати при виборі набору для ІФА, є такі: цільове призначення тест-системи ІФА; контроль якості набору, наприклад, специфічність, чутливість та відтворюваність; перевірка набору споживачем, наприклад, наявність рекомендацій; термін придатності набору.

Специфічність ІФА-набору пов'язана з ключовим компонентом набору – антитілом. Набір використовується для скринінгу цільових матеріалів за допомогою антитіл, які суворо контролюються для забезпечення специфічності набору.

Чутливість ІФА відображає здатність набору виявляти мінімальну кількість досліджуваної речовини (титри). Можна вибрати набір ІФА відповідно до кількості індикаторів, які потрібно протестувати у зразку. Якщо кількість індикатора, що тестується, дуже низька і загальний набір не може відповідати вимогам, необхідно вибрати високочутливий ІФА-набір.

Вірогідність результатів: діагностичні, клінічні та наукові дослідження зосереджені на точності отриманих показників ІФА тесту у повторюваних вимірюваннях. Для стандартних наборів ІФА коефіцієнт варіації між тест-системами повинен перебувати в межах близько 15 %.

Термін придатності: як правило, набір дійсний упродовж півроку, використання прострочених наборів заборонено.

Фактор «виконання реакції»

Технологія ІФА має високу чутливість та специфічність і отримала широке визнання в біологічних дослідженнях, а також широко використовується в клінічних випробуваннях. Для початківців (якщо не звертати увагу на всі етапи ІФА в процесі роботи) це може мати відносно великий вплив на кінцеві результати реакції, такі як «знебарвлена пластина», слабкий колір, низька чутливість, феномен «квіткової пластини», відсутність градієнта і високий фон ІФА. Для уникнення негативних кінцевих результатів необхідно дотримуватись загальних правил виконання протоколу ІФА (нижче наведені етапи

виконання аналізу, на яких найчастіше можна зробити технічну помилку).

Етап підготовки реагентів: попередньо покриті ферментними мітками планшети реагенти набору ІФА повинні бути витримані при температурі 20 – 25 °С та не менше 30 хв.

Реагенти слід ретельно перемішати перед використанням для забезпечення їхньої однорідності.

Зазвичай рідина для промивання – це концентрований розчин, який потрібно заздалегідь приготувати у відповідній концентрації, а значення рН слід підтримувати в межах 7,2–7,4.

Кон'югант, як розчин для промивання, зазвичай також є концентрованим і потребує додаткового розведення.

Реагенти з різних партій не повинні змішуватися. Слід перевірити валідність кожного компонента.

Етап внесення зразків та реагентів: інколи виконання реакції заздалегідь потребує розведення зразків. Тому потрібно ознайомитися з інструкцією набору ІФА, щоб визначити, чи потрібне розведення зразків, та вибрати відповідний розчинник.

При внесенні зразків та реагентів у лунки планшета потрібно контролювати час внесення, щоб уникнути помилок, викликаних довготривалим внесенням.

Звертайте увагу на кут внесення зразків та реагентів. Зразок повинен вноситись вертикально без торкання до стінок та дна лунки планшета, в нижню частину.

Дотримуйтеся правила: один зразок, один наконечник піпетки. Запобігайте перехресному забрудненню.

Етапи інкубації та промивання: дотримуйтеся зазначених в інструкції до набору часових та температурних діапазонів при інкубації планшетів.

Перед інкубацією, для запобігання випаровуванню, планшет потрібно закрити клейкою стрічкою, що додається в наборі.

Зверніть увагу на кількість повторень промивань та кількість розчину для промивання.

При «ручному» промиванні планшета тримайте його вертикально для уникнення перехресного забруднення.

Етапи зчитування та аналіз даних: під час закінчення реакції потрібно уникати утворення бульбашок повітря в лунках.

Зчитування даних з планшета слід завершити протягом 5 хвилин після завершення реакції.

За 15–30 хвилин до початку реакції рекомендовано увімкнути рідер та налаштувати програми зчитування. Уважно ознайомтеся з інструкцією виробника набору ІФА для встановлення відповідних діапазонів УФ-хвилі (контроль та референс фільтрів).

Список використаної літератури

1. Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; February 2, 2022.
2. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015 Oct;72:4-15.
3. Boguszewska K, Szewczuk M, Urbaniak S, Karwowski BT. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(23):4689-4704. doi:10.1007/s00018-019-03239-6.
4. ELISA- Definition, Principle, Procedure, Types, Steps, Uses. Режим доступу: <https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>
5. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol*. 2023;2612:1-17. doi:10.1007/978-1-0716-2903-1_1.
6. IDEXX ELISA Technical Guide, 2019.
7. Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017 Jun 01;2017(6):pdb.prot093724.
8. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2016 Jul;77(7):C. 98–101.
9. Types of ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Tests. Режим доступу: <https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests>
10. What Factors Could Affect ELISA Results? Режим доступу: <https://www.cusabio.com/c-15109.html>.
11. Step-by-step guide to ELISA Режим доступу: <https://www.mabtech.com/knowledge-hub/step-step-guide-elisa>.
12. Polyclonal and Monoclonal Antibody Production. Режим доступу: <https://courses.lumenlearning.com/suny-microbiology/chapter/polyclonal-and-monoclonal-antibody-production/>
13. Woolums AR. Serology in Bovine Infectious Disease Diagnosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2023;39(1):141-155. doi:10.1016/j.cvfa.2022.10.007.
14. Імуноферментний аналіз ELISA у ветеринарній імунодіагностиці (ELISA in veterinary immuno diagnostics.): метод. вказ. зі спец. вет. імунологія для студентів фак. вет. мед.: напрям підготовки 8.11.101 – ветеринарна медицина, освітній рівень – магістр / Мішель Піпен, Клер Мілард, Рубленко І.О., Андрійчук А. В., Костецька Ю. П., Зоценко В. М., Тарану-ха С. І., Островський Д. М.. – Біла Церква, 2017 – 16 с.

15. Мандигра, М. С., Г. Б. Алексєєва, and О. С. Петренко. Порівняльно-статистичний аналіз методів арбітражних досліджень лейкозу великої рогатої худоби. Ветеринарна біотехнологія 24 (2014): 91–94.

16. Петренко, О. С., Петренко, А. С., Алексєєва, Г. Б., Алексєєва, Г. Б., Прискока, В. А., Головаха, В. І., ... & Киевская, А. В. (2016). Порівняльна характеристика чутливості тест-систем ІФА різних виробників для діагностики лейкозу. Ветеринарна біотехнологія. 2016; 29: 204–212.

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ У ВЕТЕРИНАРНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

Методичні рекомендації

**Шевченко М. В.
Пантелєснко О. В.
Андрійчук А. В.
Мазур Т. Г.
Богатко Н. М.
Сахнюк В. В.
Богатко А. Ф.
Папченко І. В.
Балацький Ю. О.
Гришко В. А.
Царенко Т. М.**

Здано до складання 25.10.2023. Підп. до друку2023.
Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 2,1. Тираж 100.
РВІКВ, Сектор оперативної поліграфії БНАУ
09117, Біла Церква, Соборна пл., 8; тел. 33-11-01