

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ІНСТИТУТ ПІСЛЯДИПЛОМНОГО НАВЧАННЯ КЕРІВНИКІВ ТА СПЕЦІАЛІСТІВ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Кафедра ветеринарно-санітарної експертизи та лабораторної діагностики
Кафедра епізоотології та інфекційних хвороб

Державна установа «Науково-методичний центр вищої та фахової передвищої освіти»
Міністерства освіти і науки України

ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Біла Церква
2026

УДК: 636.09:616-07(075.8)

Затверджено вченою радою
Білоцерківського НАУ
(протокол №2 від 23 квітня 2026 року)

Затверджено до видання Науково-методичною Радою
Державної установи «Науково-методичного центру
вищої та фахової передвищої освіти» Міністерства
освіти і науки України
(протокол №3 від 28 травня 2026 року)

Укладачі: **Пантелеєнко О.В.**, доктор філософії (PhD); **Мазур Т.Г.**, к.вет.н.; **Богатко Н.М.**, д.вет.н.; **Довгаль О.В.**, к.вет.н.; **Білик С.А.**, к.вет.н.; **Шевченко М.В.**, доктор філософії (PhD); **Богатко А.Ф.**, доктор філософії (PhD); **Савченко М.О.**, доктор філософії (PhD); **Царенко Т.М.**, к.вет.н.

Імунологічні методи діагностики у ветеринарній медицині: навчальний посібник для підвищення кваліфікації та перепідготовки керівників і спеціалістів державної та відомчої ветеринарної медицини / Пантелеєнко О.В.; Мазур Т.Г.; Богатко Н.М.; Довгаль О.В.; Білик С.А.; Шевченко М.В.; Богатко А.Ф.; Савченко М.О.; Царенко Т.М. Біла Церква, 2026. 252 с.

ISBN 978-966-2122-99-2

Навчальний посібник висвітлює актуальні питання імунологічних методів діагностики інфекційних хвороб тварин. У розділах посібника викладено систематизовані відомості про теоретичні основи імунологічних методів діагностики, їх класифікацію, принципи та механізми серологічних реакцій; надано детальний опис основних імунологічних методів, що використовуються у ветеринарній практиці, з акцентом на особливостях виконання, інтерпретації результатів та сфері застосування; розкрито сучасні підходи до розробки, стандартизації та валідації діагностичних тестів відповідно до рекомендацій ВООЗ та міжнародних стандартів; пояснена концепція невизначеності вимірювань та методи її оцінки в імунологічній діагностиці; висвітлено принципи організації системи контролю та забезпечення якості в діагностичній лабораторії згідно з вимогами ISO/IEC 17025, а також представлено сучасні тенденції розвитку імунологічних методів діагностики та перспективні технології. Посібник поєднує теоретичні знання з практичними рекомендаціями, що дозволяє використовувати його як для навчання, так і як довідковий матеріал у повсякденній діагностичній практиці. Особлива увага приділена питанням забезпечення якості та валідації, що відповідає сучасним вимогам до діагностичних лабораторій. Навчальний посібник ілюстровано таблицями, схемами, рисунками та додатками для полегшення сприйняття матеріалу.

Навчальний посібник розроблено для керівників і спеціалістів діагностичних лабораторій Держпродспоживслужби, лабораторних діагностів та лаборантів, які виконують імунологічні дослідження, наукових співробітників науково-дослідних інститутів та лабораторій, а також для керівників ветеринарних служб та епізоотологів. Навчальний посібник буде корисним для здобувачів вищої ветеринарної освіти та фахівців, які прагнуть підвищити свою кваліфікацію в галузі імунологічної діагностики інфекційних хвороб тварин.

Рецензенти: **Рубленко І.О.** – завідувач кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського НАУ, доктор ветеринарних наук, професор; **Сахнюк В.В.** – професор кафедри пропедевтики та медицини внутрішніх хвороб тварин і птиці ім. В.І. Левченка, доктор ветеринарних наук, професор Білоцерківського НАУ, член-кореспондент НААН; **Кіт А.А.** – кандидат ветеринарних наук, менеджер системи якості ТОВ «Imperovo Foods International»; **Радзиховський М.Л.** – доктор вет. наук, професор НУБіП України; **Андрійчук А.В.** – канд. вет. наук, науковий співробітник Центру медичних наук Університету штату Луїзіана (Louisiana State University Health Sciences Center), Шривпорт, Луїзіана, США.

© Колектив авторів, 2026

Зміст	
РОЗДІЛ 1. ВСТУП	6
1.1. Актуальність імунологічних методів діагностики у сучасній ветеринарній практиці.....	6
1.2. Ціль та призначення посібника	7
1.3. Структура та особливості використання посібника	8
РОЗДІЛ 2. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ІМУНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ	9
2.1. Фундаментальні імунологічні концепції	9
2.1.1. Антигени та антитіла: будова, властивості та механізми взаємодії	9
2.1.2. Типи імунної відповіді: гуморальна та клітинна.....	14
2.1.3. Динаміка антитілоутворення при інфекційних захворюваннях тварин.....	21
2.2. Класифікація імунологічних методів	26
2.2.1. Тести первинного зв'язування (пряме виявлення реакції антиген-антитіло)	28
2.2.2. Тести вторинного зв'язування (виявлення наслідків взаємодії антиген-антитіло)	29
2.2.3. Тести третинного зв'язування (оцінка функціональних наслідків імунної відповіді)	30
2.3. Принципи побудови імунологічних тестів	32
2.3.1. Вибір системи виявлення	32
2.3.2. Форматування імунологічних тестів	34
2.3.3. Специфічність та чутливість імунологічних методів	36
РОЗДІЛ 3. ОСНОВНІ ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ	38
3.1. Імуноферментний аналіз.....	38
3.1.1. Принципи імуноферментного аналізу	39
3.1.2. Типи імуноферментного аналізу.....	43
3.1.3. Методика виконання імуноферментного аналізу.....	47
3.2. Імунохроматографічний аналіз.....	55
3.2.1. Принципи роботи імунохроматографічних експрес-тестів.....	56
3.3. Реакція імунофлуоресценції.....	68
3.3.1. Варіанти реакції імунофлуоресценції.....	71
3.4. Реакції преципітації та аглютинації	79
3.4.2. Імуноелектрофорез	87
3.5. Реакція зв'язування комплекменту	96
3.6. Імуноблотинг (Western blot).....	109
3.6.2. Принципи методу імуноблотингу	110

3.6.3. Застосування для підтвердження результатів	114
3.6.4. Аналіз специфічності імунної відповіді.....	116
РОЗДІЛ 4. ВАЛІДАЦІЯ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ДІАГНОСТИЧНИХ	
ТЕСТІВ	130
4.1. Загальні принципи валідації.....	130
4.1.1. Аналітичні характеристики.....	133
4.1.2. Діагностичні характеристики	140
4.1.3. Вибір референтних зразків.....	146
4.1.4. Організація порівняльних випробувань	153
4.2. Верифікація діагностичних методів	158
4.2.1. Етапи проведення верифікації.....	162
4.2.2. Відмінності у обсязі верифікації залежно від ситуації.....	167
РОЗДІЛ 5. НЕВИЗНАЧЕНІСТЬ ВИМІРЮВАНЬ В	
ІМУНОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ	170
5.1. Концепція невизначеності вимірювання	170
5.1.1. Визначення та значення невизначеності	170
5.1.2. Нормативна база (ISO/IEC 17025).....	171
5.1.3. Типи невизначеності	173
5.2. Джерела невизначеності в імунологічній діагностиці	176
5.2.1. Варіабельність біологічного матеріалу.....	176
5.2.2. Інструментальні похибки	178
5.2.3. Людський фактор	180
5.3. Оцінка невизначеності вимірювання.....	184
5.3.1. Низхідний підхід оцінки невизначеності.....	185
5.3.2. Використання контрольних зразків.....	186
5.3.3. Статистичні методи розрахунку кількісної оцінки невизначеності.....	188
5.3.4. Вираження невизначеності на порогових значеннях	190
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ	
ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	196
6.1. Система управління якістю в діагностичній лабораторії	196
6.1.1. Стандарти якості (ISO/IEC 17025, GLP)	196
6.1.2. Документація системи якості	198
6.1.3. Акредитація лабораторій	200
6.2. Внутрішній контроль якості	203
6.2.1. Контрольні зразки та стандарти	203
6.2.2. Контрольні карти (карти Леві-Дженнінгса).....	205
6.2.4. Критерії прийняття/відхилення результатів	207
6.3. Зовнішня оцінка якості	209
6.3.1. Міжлабораторні порівняльні випробування	209
6.3.2. Програми професійного тестування	211

6.3.3. Аналіз розбіжностей	212
6.4. Калібрування обладнання та його обслуговування.....	214
6.4.1. Вимоги до калібрування	215
6.4.2. Графіки технічного обслуговування	217
6.4.3. Кваліфікація персоналу	219
Додаток А. Терміни та скорочення	222
Додаток Б. Стандартні операційні процедури.....	233
Додаток В. Форми протоколів та звітів.....	242
Додаток Е. Нормативно-правова база	245
Список використаних джерел.....	248

РОЗДІЛ 1. ВСТУП

1.1. Актуальність імунологічних методів діагностики у сучасній ветеринарній практиці

Імунологічні методи діагностики посідають центральне місце в системі епізоотологічного нагляду та контролю інфекційних хвороб тварин. Їхня роль неухильно зростає у зв'язку з глобалізацією торгівлі тваринами та продукцією тваринного походження, появою нових і повторним виникненням відомих інфекційних захворювань, а також необхідністю забезпечення високих стандартів біологічної безпеки та епізоотичного благополуччя.

Сучасні виклики ветеринарної медицини охоплюють широкий спектр проблем:

- транскордонні інфекційні хвороби тварин (африканська чума свиней, високопатогенний пташиний грип, блутанг та інші) вимагають швидкої та точної діагностики для своєчасного виявлення збудників і запобігання їх поширенню.
- зоонозні інфекції (сказ, бруцельоз, туберкульоз, лептоспіроз) потребують надійних методів виявлення та моніторингу для забезпечення здоров'я як тварин, так і людей.
- програми ерадикації інфекційних захворювань базуються на серологічному скринінгу та моніторингу імунного статусу популяцій тварин.
- міжнародна торгівля тваринами та продукцією тваринництва регулюється вимогами Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ВООЗ, WOAH), які передбачають використання валідованих діагностичних тестів.

Імунологічні методи діагностики мають низку переваг, які роблять їх незамінними в сучасній ветеринарній практиці:

- високу специфічність та чутливість – здатність виявляти навіть незначні кількості антигенів чи антитіл.
- можливість масового скринінгу – одночасне дослідження великої кількості зразків, що особливо важливо для епідеміологічних досліджень.
- ретроспективну діагностику – виявлення антитіл дозволяє встановити факт перенесеної інфекції навіть після елімінації збудника.
- оцінку поствакцинального імунітету – визначення напруженості імунної відповіді та ефективності вакцинопрофілактики.
- диференціацію вакцинованих і інфікованих тварин (DIVA-стратегія) – критично важливу для програм контролю та ерадикації.

- економічну ефективність – відносно низьку вартість досліджень порівняно з молекулярно-біологічними методами.

Розвиток імунологічних технологій призвів до появи широкого спектру методів – від класичних реакцій преципітації та аглютинації до сучасних високотехнологічних систем (імуноферментний аналіз, імунохроматографія, імуноблотинг, мультиплексні аналізи). Кожен метод має свої особливості, переваги та обмеження, що визначає сферу його застосування.

Актуальності набуває стандартизація та валідація діагностичних тестів згідно з міжнародними вимогами. Рекомендації ВООЗ щодо валідації діагностичних тестів, оцінки невизначеності вимірювань та забезпечення якості лабораторних досліджень встановлюють єдині критерії для оцінки діагностичних характеристик тестів і гармонізації методів у різних країнах.

Сучасна ветеринарна діагностична лабораторія повинна відповідати вимогам міжнародних стандартів якості (ISO/IEC 17025, GLP), що передбачає впровадження системи управління якістю, валідацію використовуваних методів, оцінку невизначеності вимірювань та участь у програмах міжлабораторних порівняльних випробувань. Це забезпечує довіру до результатів лабораторних досліджень і визнання компетентності лабораторій на національному та міжнародному рівнях.

1.2. Ціль та призначення посібника

Цей посібник призначений для широкого кола фахівців ветеринарної медицини, які професійно займаються діагностикою інфекційних хвороб тварин або використовують результати лабораторних досліджень у своїй практичній діяльності.

Основна цільова аудиторія:

керівники та спеціалісти діагностичних лабораторій державної та відомчої ветеринарної служби, які відповідають за організацію діагностичних досліджень, впровадження нових методів, валідацію тестів та забезпечення якості.

лабораторні діагности та лаборанти, які безпосередньо виконують імунологічні дослідження і потребують глибокого розуміння теоретичних основ та практичних аспектів методів.

наукові співробітники науково-дослідних інститутів та лабораторій, які розробляють нові діагностичні тести, проводять валідаційні дослідження та епідеміологічні обстеження.

викладачі вищих та середніх спеціальних навчальних закладів ветеринарного профілю, які викладають дисципліни з діагностики інфекційних хвороб, імунології, епізоотології.

студенти та аспіранти ветеринарних факультетів, які опановують теоретичні та практичні навички лабораторної діагностики.

керівники ветеринарних служб та епізоотологи, які використовують результати лабораторних досліджень для прийняття управлінських рішень щодо протиепізоотичних заходів.

Основні завдання посібника:

1. Забезпечити систематизовані знання про теоретичні основи імунологічних методів діагностики, їх класифікацію, принципи та механізми.

2. Надати детальний опис основних імунологічних методів, що використовуються у ветеринарній практиці, з акцентом на особливостях виконання, інтерпретації результатів та сфері застосування.

3. Розкрити сучасні підходи до розробки, стандартизації та валідації діагностичних тестів відповідно до рекомендацій ВООЗ та міжнародних стандартів.

4. Пояснити концепцію невизначеності вимірювань та методи її оцінки в імунологічній діагностиці.

5. Висвітлити принципи організації системи контролю та забезпечення якості в діагностичній лабораторії згідно з вимогами ISO/IEC 17025.

6. Ознайомити з сучасними тенденціями розвитку імунологічних методів діагностики та перспективними технологіями.

Посібник поєднує теоретичні знання з практичними рекомендаціями, що дозволяє використовувати його як для навчання, так і як довідковий матеріал у повсякденній діагностичній практиці. Особлива увага приділена питанням забезпечення якості та валідації, що відповідає сучасним вимогам до діагностичних лабораторій.

1.3. Структура та особливості використання посібника

Посібник побудований за принципом послідовного викладу матеріалу – від теоретичних основ до практичного застосування методів та організації системи якості.

Рекомендації щодо практичного застосування:

1. Для керівників лабораторій особливу увагу слід звернути на розділи, що стосуються валідації, контролю якості та організації системи управління якістю.

2. Для лабораторних діагностів важливими є розділи, що детально описують методики виконання досліджень та їх стандартизацію.

3. Для наукових співробітників, що розробляють нові тести, ключовими є розділи, присвячені розробці, валідації та оцінці невизначеності.

4. Для викладачів та студентів посібник може використовуватися як основний або додатковий навчальний матеріал із систематичним вивченням усіх розділів.

5. Для епізоотологів та керівників ветслужб рекомендуються розділ, що розкривають питання інтерпретації результатів та серологічного моніторингу.

Посібник відображає сучасний стан імунологічної діагностики у ветеринарії та буде корисним усім, хто прагне підвищити свою кваліфікацію у цій галузі ветеринарної медицини. Автори сподіваються, що представлений матеріал сприятиме підвищенню якості діагностичних досліджень, гармонізації методів і поліпшенню епізоотичного благополуччя та безпеки продукції тваринного походження.

РОЗДІЛ 2. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ІМУНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ

2.1. Фундаментальні імунологічні концепції

2.1.1. Антигени та антитіла: будова, властивості та механізми взаємодії

Усі імунологічні реакції, що лежать в основі сучасних методів діагностики інфекційних захворювань тварин, ґрунтуються на здатності антитіл специфічно зв'язуватися з антигенами з високою афінністю. Розуміння молекулярних основ цієї взаємодії є критично важливим для правильної інтерпретації результатів серологічних досліджень та вибору оптимальних діагностичних підходів.

Антигени: визначення та базові характеристики

Антигени (Ag) – це молекули білків або полісахаридів, які здатні викликати специфічну імунну відповідь організму, що супроводжується синтезом антитіл або активацією клітинного імунітету. Антигеном може бути будь-яка речовина, яку імунна система розпізнає як чужорідну та проти якої формує захисну відповідь.

До антигенів належать різноманітні біологічні макромолекули: білки, полісахариди, ліпіди та нуклеїнові кислоти, які є компонентами вірусів, бактерій, грибів, паразитів або навіть змінених клітин власного організму. Коли антиген потрапляє в організм, він активує різні ланки імунної системи,

зокрема Т-лімфоцити та В-лімфоцити, ініціюючи каскад імунологічних реакцій спрямованих на його елімінацію.

Ключові властивості антигенів

Функціональна активність антигенів визначається двома властивостями:

- 1. Імуногенність** – здатність індукувати специфічну імунну відповідь, внаслідок якої відбувається продукція антитіл або формування популяції імунних лімфоцитів. Імуногенність залежить від багатьох факторів, включаючи молекулярну масу речовини, її хімічну природу, ступінь чужорідності для організму, шлях введення та дозу антигену.
- 2. Антигенність (специфічність)** – здатність специфічно реагувати з антитілами або сенсibilізованими лімфоцитами, які продукувалися у відповідь на введення даного антигену. Ця властивість визначає специфічність імунологічної реакції та є основою для розробки високоточних діагностичних тестів.

Важливим поняттям у розумінні антигенної структури є *epitope*, або *антигенна детермінанта* – це конкретна ділянка на поверхні антигену або всередині його молекули, яка безпосередньо взаємодіє з антигенрозпізнавальним центром антитіла. Один антиген може містити декілька різних епітопів, що дозволяє йому зв'язуватися з різними антитілами одночасно. Розмір епітопу зазвичай становить 5-15 амінокислотних залишків для білкових антигенів або 5-7 моносахаридних одиниць для полісахаридних антигенів.

Молекулярна будова та структурна організація антитіл

Антитіла (Ат), або імуноглобуліни (Ig) – це специфічні білкові сполуки, які синтезуються плазматичними клітинами (диференційованими В-лімфоцитами) у відповідь на проникнення антигенів і мають здатність специфічно з ними зв'язуватися. Антитіла є центральним компонентом гуморального імунітету та основою більшості серологічних діагностичних методів.

Базова структура молекули антитіла має Y-подібну форму і складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів: двох ідентичних важких (H-ланцюги, від англ. *heavy*) та двох ідентичних легких (L-ланцюги, від англ. *light*) ланцюгів, з'єднаних дисульфідними містками. Молекулярна маса повної молекули імуноглобуліну становить приблизно 150-160 кДа.

Функціонально молекулу антитіла можна розділити на два основні фрагменти:

- 1. Fab-фрагменти** (*Fragment antigen binding*) – два ідентичні антигензв'язувальні фрагменти, розташовані на «руках» Y-подібної

структури. Кожен Fab-фрагмент містить варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів (VH та VL), які формують антигенрозпізнавальний центр – унікальну тривимірну структуру, комплементарну до конкретного епітопу антигену. Саме варіабельні домени визначають специфічність антитіла до певного антигену.

2. Fc-фрагмент (*Fragment crystallizable*) – константний фрагмент, що формує «ніжку» Y-подібної структури. Цей фрагмент відповідає за ефекторні функції антитіла: зв'язування з комплементом, взаємодію з Fc-рецепторами на поверхні різних клітин імунної системи (макрофагів, нейтрофілів, природних кілерів), а також визначає клас імуноглобуліну та його здатність проникати через біологічні бар'єри.

Схематична будова антитіла та його зв'язування з епітопами антигенів показано на Рисунку 2.1.

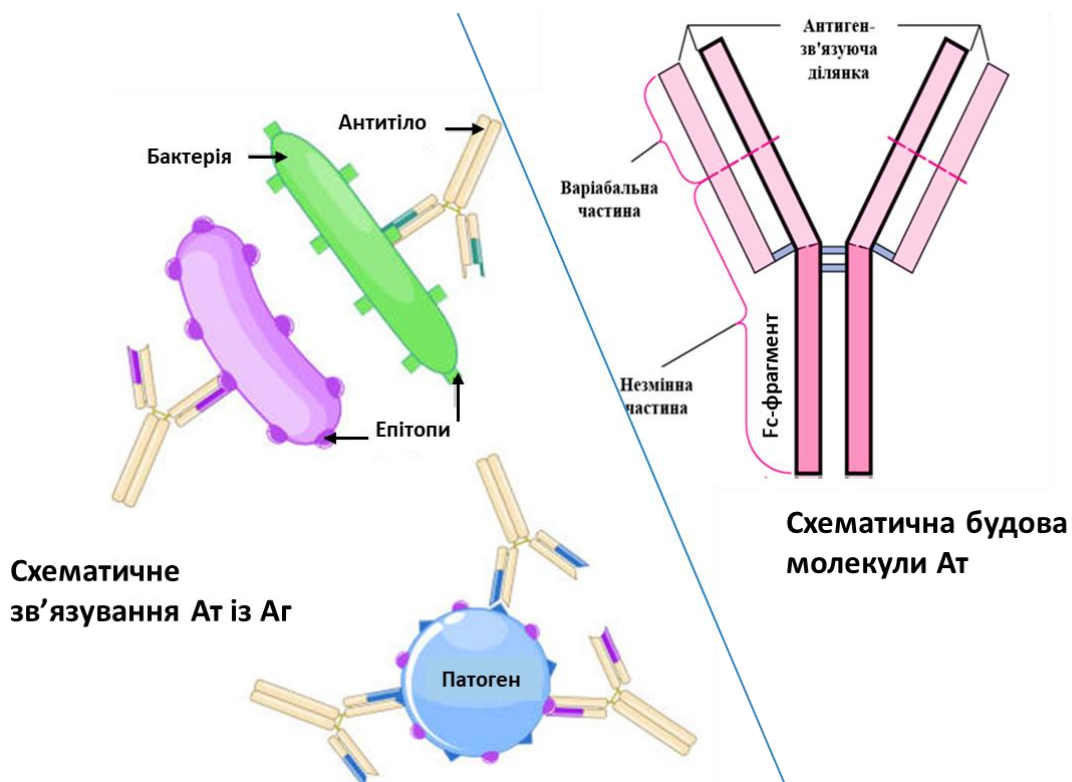


Рис. 2.1. Будова антитіла та його зв'язування з антигеном

Класи імуноглобулінів та їх функціональні особливості. У ссавців виділяють п'ять основних класів імуноглобулінів, які відрізняються за структурою Fc-фрагмента, фізико-хімічними властивостями та біологічними функціями:

Імуноглобуліни класу G (IgG) є найбільш поширеними антитілами сироватки крові, складаючи близько 75% всіх імуноглобулінів. IgG виробляються на пізній стадії первинної імунної відповіді та є основними антитілами вторинної імунної відповіді. Їх основні функції включають нейтралізацію

токсинів та вірусів, опсонізацію бактерій, активацію системи комплементу та забезпечення довготривалого захисту. Завдяки невеликому розміру молекули, IgG здатні легко проникати в позасудинні простори та через плацентарний бар'єр, забезпечуючи пасивний імунітет новонароджених.

Імуноглобуліни класу M (IgM) є першими антитілами, що виробляються В-лімфоцитами під час первинної імунної відповіді на антигенну стимуляцію. IgM мають пентамерну структуру (п'ять базових мономерів, з'єднаних J-ланцюгом), що забезпечує їм десять антигензв'язувальних центрів та високу авідність. Основне завдання IgM – швидка активація системи комплементу та аглютинація мікроорганізмів на ранніх стадіях інфекції. Згодом IgM замінюються на більш специфічні IgG.

Імуноглобуліни класу A (IgA) переважно містяться у секретах слизових оболонок: кишкові соки, слина, сльози, бронхіальний слиз, молозиво та грудне молоко. Секреторний IgA існує у вигляді димеру з додатковим секреторним компонентом, який захищає молекулу від протеолітичної деградації. Їхня основна функція полягає у забезпеченні місцевого імунітету та захисті організму від патогенів, які можуть потрапляти через слизові оболонки, шляхом нейтралізації вірусів та бактерій до їх проникнення в тканини.

Імуноглобуліни класу E (IgE) присутні у сироватці крові у мінімальних концентраціях, але відіграють ключову роль в алергічних реакціях та захисті від паразитарних інвазій. IgE здатні міцно зв'язуватися з Fc-рецепторами на поверхні тучних клітин та базофілів, і при повторному контакті з антигеном викликають дегрануляцію цих клітин з вивільненням медіаторів запалення.

Імуноглобуліни класу D (IgD) є найменш вивченими імуноглобулінами, що присутні в сироватці крові у дуже низьких концентраціях. IgD переважно експресуються на поверхні наївних В-лімфоцитів як частина В-клітинного рецептора і беруть участь в активації та диференціюванні цих клітин.

Механізми взаємодії антигенів та антитіл. Взаємодія між антигеном і антитілом є основою всіх серологічних реакцій та діагностичних тестів. Ця взаємодія ґрунтується на принципі молекулярної комплементарності – просторової та хімічної відповідності між епітопами антигенів і паратопами (антигензв'язувальними центрами) антитіл.

Зв'язування антигену з антитілом відбувається за рахунок множинних нековалентних взаємодій, які включають: водневі зв'язки між полярними

групами; електростатичні взаємодії між зарядженими амінокислотними залишками; Ван-дер-Ваальсові сили між неполярними групами; гідрофобні взаємодії.

Хоча кожна окрема нековалентна взаємодія є відносно слабкою, сумарна дія багатьох таких зв'язків забезпечує високу міцність та специфічність комплексу антиген-антитіло.

Основні імунні характеристики взаємодії антиген-антитіло:

Афінність – міра сили зв'язування одного антигензв'язувального центру антитіла з одним епітопом антигену. Високоафінні антитіла утворюють стабільні комплекси з антигенами навіть при низьких концентраціях обох компонентів.

Авідність – загальна міра міцності зв'язку між мультивалентним антигеном та антитілом, що враховує як афінність окремих взаємодій, так і ефект множинності зв'язків. Авідність завжди перевищує суму афінностей окремих взаємодій завдяки кооперативному ефекту.

Специфічність – здатність антитіла розрізнити та зв'язувати конкретний епітоп серед множини схожих структур. Висока специфічність є критично важливою для діагностичних застосувань, оскільки вона мінімізує перехресні реакції з неспорідненими антигенами.

Функціональна класифікація антитіл

За функціональними властивостями та механізмом дії антитіла можна класифікувати на три основні типи:

1. Аглютиніни – антитіла, що забезпечують склеювання (аглютинацію) корпускулярних антигенів: мікроорганізмів, еритроцитів або інших клітин. Аглютинація відбувається завдяки перехресному зв'язуванню антигенів на поверхні різних клітин через бівалентні молекули антитіл, що призводить до утворення видимих агрегатів. Цей феномен лежить в основі реакцій аглютинації, широко використовуваних у діагностиці.

2. Преципітини – антитіла, що взаємодіють з розчинними антигенами та формують нерозчинні імунні комплекси, які випадають в осад (преципітат). Розчинні антигени, що індукують утворення преципітинів, називаються преципітиногенами. Утворення преципітату відбувається при оптимальному співвідношенні концентрацій антигену та антитіла, коли формується тривимірна перехресно-зшита решітка з молекул антигену та антитіла.

3. Лізини – антитіла, що викликають лізис (руйнування) клітин-мішеней за обов'язкової участі комплементу – каскаду білків сироватки крові. Зв'язування лізинів з антигенами на поверхні клітини активує систему комплементу, що призводить до формування мембранно-атакуючого комплексу і, як наслідок, до осмотичного лізису клітини.

Біологічні наслідки взаємодії антиген-антитіло. Утворення комплексів антиген-антитіло ініціює різноманітні біологічні ефекти, які є основою як захисних імунних реакцій, так і діагностичних процедур:

Преципітація базується на реакції взаємодії антитіл з розчинними антигенами, що призводить до утворення видимого нерозчинного комплексу. Цей процес залежить від концентрації і найефективніше відбувається в зоні еквівалентності, коли співвідношення антигену та антитіла є оптимальним для формування великих імунних решіток.

Аглютинація застосовується для виявлення антигенів або антитіл за рахунок утворення видимих агрегатів (аглютинатів) при взаємодії антитіл з корпускулярними антигенами. Аглютинація може бути прямою (безпосередня взаємодія антитіл з антигенами на поверхні частинок) або непрямою (пасивною), коли розчинні антигени попередньо адсорбуються на поверхні інертних носіїв (еритроцитів, латексних частинок).

Активація системи комплементу – каскадна реакція, що ініціюється зв'язуванням комплексів антиген-антитіло з першим компонентом комплементу. Активація системи комплементу призводить до опсонізації патогенів, рекрутування фагоцитів, індукції запальної відповіді та, у випадку бактеріальних клітин, до їх безпосереднього лізису.

Ці фундаментальні процеси взаємодії антигенів та антитіл є основою для розробки і застосування широкого спектру імунологічних методів діагностики, які будуть детально розглянуті в наступних підрозділах. Розуміння молекулярних механізмів цих взаємодій важливі для правильної інтерпретації результатів серологічних досліджень та оптимізації діагностичних протоколів у ветеринарній практиці.

2.1.2. Типи імунної відповіді: гуморальна та клітинна

Імунна відповідь організму тварини на інфекційні агенти реалізується через два тісно взаємопов'язані, але функціонально відмінні механізми: гуморальну та клітинну імунну відповідь. Розуміння особливостей кожного типу імунітету є важливим для спеціалістів діагностичних лабораторій та епізоотологів, оскільки визначає вибір методів дослідження, інтерпретацію результатів та формування стратегій контролю інфекційних захворювань у популяціях тварин.

Кожен тип імунної відповіді спрямований на боротьбу з різними категоріями патогенів і характеризується специфічними клітинними та молекулярними механізмами, які можна виявити та оцінити за допомогою відповідних діагностичних методів. Вибір адекватного методу діагностики

безпосередньо залежить від розуміння, який тип імунної відповіді домінує при конкретному захворюванні та на якій стадії інфекційного процесу проводиться дослідження.

Гуморальна імунна відповідь: механізми та діагностичне значення.

Гуморальна імунна відповідь забезпечується В-лімфоцитами (В-клітинами) і характеризується продукцією специфічних антитіл (імуноглобулінів, Ig), які циркулюють у крові, лімфі та інших біологічних рідинах організму. Основна функція гуморального імунітету полягає у нейтралізації позаклітинних патогенів та їх токсинів, опсонізації бактерій для полегшення фагоцитозу, а також активації системи комплементу.

В-лімфоцити розвиваються у кістковому мозку та експресують на своїй поверхні мембранні імуноглобуліни (переважно IgM та IgD), які функціонують як антигенрозпізнавальні рецептори. При зустрічі з відповідним антигеном В-клітини проходять активацію, проліферацію та диференціацію в плазматичні клітини, які інтенсивно синтезують та секретують специфічні антитіла. Залежно від характеру антигену та наявності допомоги Т-хелперів, розрізняють два типи В-клітинної відповіді: Т-залежну (В2-лімфоцити) та Т-незалежну (В1-лімфоцити).

Динаміка гуморальної відповіді: первинна та вторинна імунна реакція.

Для практичної діагностики важливо розуміти механізми і динаміку гуморальної відповіді.

Первинна імунна відповідь розвивається при першому контакті макроорганізму з антигеном і характеризується повільним наростанням титру антитіл протягом 7-14 днів. На початковій стадії (перші 5-7 днів) переважають імуноглобуліни класу М (IgM) – великі пентамерні молекули з високою авідністю, здатні ефективно активувати систему комплементу та аглютинувати патогени. Рівень IgM досягає піку приблизно на 7-10 день після інфікування, після чого поступово знижується.

Паралельно зі зниженням рівня IgM відбувається перемикання класу імуноглобулінів (*class switching*), і В-клітини починають продукувати антитіла класу G (IgG). Імуноглобуліни IgG з'являються на 10-14 день після інфікування і поступово наростають, досягаючи максимуму на 3-4 тижні. На відміну від IgM, антитіла IgG мають меншу молекулярну масу, здатні проникати через плацентарний бар'єр та забезпечують довготривалий захист, циркулюючи в крові місяцями і навіть роками.

Вторинна імунна відповідь реалізується при повторному контакті з тим самим антигеном і має принципово інші характеристики. Завдяки існуванню В-клітин пам'яті, які утворились під час первинної відповіді, вторинна реакція розвивається значно швидше (2-3 дні), характеризується вищими титрами

антитіл та переважанням високоафінних IgG з мінімальною продукцією IgM. Саме наявність високих титрів IgG при низьких рівнях IgM свідчить про попередній контакт з патогеном або вакцинацію.

Діагностичне значення визначення класів імуноглобулінів. Для спеціаліста діагностичної лабораторії співвідношення IgM та IgG є одним з маркерів стадії інфекційного процесу:

Рання (гостра) фаза інфекції: виявлення специфічних IgM при відсутності або низьких титрах IgG є маркером первинної інфекції або недавнього інфікування (до 2-3 тижнів). Діагностична чутливість тестів на IgM максимальна на 1-2 тижні після появи клінічних симптомів.

Проміжна (середня) фаза: одночасне виявлення як IgM, так і IgG вказує на активний інфекційний процес. Рівень IgM досягає піку і починає знижуватися, тоді як титр IgG прогресивно наростає. Цей період зазвичай спостерігається на 2-4 тижні після інфікування.

Пізня фаза або перенесена інфекція: виявлення високих титрів IgG при відсутності IgM свідчить про перенесену інфекцію або імунітет після вакцинації. У цей період IgM повністю зникають, а IgG залишаються на високому рівні протягом місяців або років, забезпечуючи довготривалий імунітет.

Поствакцинальний імунітет: після вакцинації часто спостерігається вироблення IgG без попереднього підвищення IgM або з мінімальною продукцією IgM. Титри поствакцинальних антитіл зазвичай нижчі, ніж після природної інфекції.

Застереження для діагноста: якщо зразок сироватки взятий на ранній стадії інфікування (до 5-7 днів), імунна відповідь може ще не встигнути виробити антитіла у виявлюваних концентраціях, що призведе до хибнонегативного результату. Тому при підозрі на гостру інфекцію рекомендується дослідження парних сироваток з інтервалом 2-3 тижні для виявлення сероконверсії (чотириразове і більше зростання титру антитіл).

Методи серологічної діагностики гуморальної відповіді. Гуморальний імунітет є основою для найбільш широко використовуваної групи діагностичних методів – серологічних тестів. За допомогою цих методів виявляють та вимірюють специфічні антитіла у сироватці крові, плазмі, молоці, слині та інших біологічних рідинах. Основні серологічні методи включають:

Імуноферментний аналіз (ІФА/ELISA) – найпоширеніший метод, що дозволяє виявляти як загальні антитіла, так і специфічні класи (IgM, IgG, IgA). Формати включають непрямий, прямий, конкурентний та сендвіч-варіанти.

Реакція нейтралізації вірусів (РНВ) – «золотий стандарт» для багатьох вірусних інфекцій, що виявляє функціональні нейтралізуючі антитіла.

Реакції аглютинації (пряма, непряма, латексна) – виявляють аглютинуючі антитіла, ефективні для діагностики бактеріальних інфекцій.

Реакція зв'язування комплементу (РЗК) – класичний метод, цінний для виявлення антитіл на ранніх стадіях інфекції.

Імунохроматографічні тести – швидкі тести, придатні для польових умов та експрес-діагностики.

Імунофлуоресцентний аналіз (РІФ) – високочутливий метод для виявлення антитіл та антигенів, за допомогою мічених антитіл, у тканинних зрізах або культурах клітин.

Клітинна імунна відповідь: механізми та діагностичні підходи.

Клітинна імунна відповідь реалізується Т-лімфоцитами (Т-клітинами) і спрямована переважно на елімінацію внутрішньоклітинних патогенів (вірусів, деяких бактерій, найпростіших), знищення інфікованих, пухлинних або інших змінених клітин організму. На відміну від гуморального імунітету, клітинна відповідь не супроводжується продукцією циркулюючих антитіл, що створює специфічні виклики для діагностики.

Т-лімфоцити дозрівають у тимусі і експресують на своїй поверхні Т-клітинні рецептори (ТКР), які розпізнають антигени тільки у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС). У процесі диференціювання Т-клітини набувають специфічні поверхневі маркери (кластери диференціювання, CD), які визначають їх функціональну спеціалізацію та можуть використовуватися для ідентифікації різних субпопуляцій у діагностичних дослідженнях.

Функціональні субпопуляції Т-лімфоцитів:

Т-хелпери (CD4+ клітини) відіграють центральну координуючу роль в імунній відповіді. Після розпізнавання антигену, представленого у комплексі з МНС II класу на поверхні антигенпрезентуючих клітин (дендритних клітин, макрофагів, В-лімфоцитів), Т-хелпери активуються та диференціюються у два основні функціональні підтипи:

Т-хелпери 1-го типу (Th1) є активаторами клітинного імунітету. Вони секретують прозапальні цитокіни (інтерферон- γ , інтерлейкін-2, фактор некрозу пухлин- α), які активують макрофаги, природні кілери та цитотоксичні Т-лімфоцити. Th1-відповідь домінує при вірусних інфекціях, внутрішньоклітинних бактеріальних інфекціях (мікобактерії, лістерії, бруцели) та при протипухлинному імунітеті. Для діагностики Th1-опосередкованої відповіді використовують визначення специфічних цитокінів або функціональні тести.

Т-хелпери 2-го типу (Th2) відповідають за кооперацію з В-лімфоцитами та активацію гуморальної імунної відповіді. Через секрецію інтерлейкінів-4, -5, -10 і -13 вони стимулюють проліферацію В-клітин, перемикають класу імуноглобулінів та синтез антитіл. Th2-відповідь домінує при позаклітинних паразитарних інфекціях, алергічних реакціях та деяких бактеріальних інфекціях. Непрямим свідченням Th2-відповіді є виявлення високих титрів специфічних антитіл.

Цитотоксичні Т-лімфоцити або Т-кілери (CD8+ клітини) є ефекторними клітинами, які безпосередньо знищують інфіковані або трансформовані клітини. Т-кілери розпізнають антигени, представлені у комплексі з МНС I класу, що експресується на всіх ядерних клітинах організму. Коли вірус інфікує клітину, вірусні білки процесуються всередині клітини і їх фрагменти (пептиди) виставляються на поверхню за допомогою молекул МНС I. Т-кілери розпізнають ці комплекси за допомогою свого CD8 корецептора і, після активації, секретують цитотоксичні молекули (перфорин, гранзими), які індукують апоптоз інфікованої клітини.

Процес активації цитотоксичних Т-клітин вимагає часу: наївні Т-кілери повинні отримувати активуючі сигнали протягом кількох годин, після чого вони інтенсивно діляться, утворюючи велику популяцію ефекторних клітин, здатних швидко знищувати інфіковані клітини. Після елімінації патогену більшість ефекторних Т-кілерів гинуть, але частина перетворюється на Т-клітини пам'яті, які забезпечують швидку вторинну відповідь при повторній інфекції.

Діагностика клітинно-опосередкованого імунітету: виклики та методи. На відміну від гуморальної відповіді, клітинний імунітет не залишає легко вимірюваних «слідів» у вигляді циркулюючих антитіл, що значно ускладнює його діагностику. Традиційні серологічні методи неефективні для оцінки клітинно-опосередкованого імунітету, тому використовуються альтернативні підходи, які зазвичай є більш трудомісткими, дорогими та потребують спеціалізованого обладнання:

Шкірні алергічні проби (наприклад, туберкулінова проба для діагностики туберкульозу) – найдоступніший метод оцінки клітинного імунітету *in vivo*. Заснований на реакції гіперчутливості сповільненого типу, опосередкованої Th1-клітинами. Результат оцінюється через 48-72 години.

Визначення антигенспецифічних Т-клітин методом проточної цитометрії – дозволяє ідентифікувати та підрахувати різні субпопуляції Т-лімфоцитів (CD4+, CD8+) та оцінити їх функціональний стан через внутрішньоклітинне фарбування цитокінів.

Тести вивільнення інтерферону- γ (IGRA) – сучасний метод оцінки клітинного імунітету, що вимірює продукцію інтерферону- γ лімфоцитами після стимуляції специфічним антигеном *in vitro*. Особливо цінний для діагностики туберкульозу.

Тести лімфоцитарної проліферації – оцінюють здатність Т-клітин проліферувати у відповідь на специфічний антиген, вимірюючи включення радіоактивного тимідину або використовуючи флуоресцентні барвники.

Визначення цитокінів методом ІФА – непряма оцінка клітинної відповіді через вимірювання концентрації специфічних цитокінів (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) у сироватці або культуральній рідині стимульованих лімфоцитів.

Молекулярні методи (ПЛР у реальному часі) – визначення експресії генів цитокінів або специфічних маркерів активації Т-клітин на рівні мРНК.

Оцінка клітинного імунітету рідко використовується в рутинній діагностиці через високу вартість та складність методів. Однак для деяких захворювань (туберкульоз, паратуберкульоз, бруцельоз) дослідження клітинно-опосередкованої відповіді є критично важливим, оскільки гуморальна відповідь може бути слабкою або відсутньою, особливо на ранніх стадіях інфекції.

Взаємодія гуморального та клітинного імунітету: комплексний підхід до діагностики. У реальному інфекційному процесі гуморальний та клітинний імунітет не функціонують ізольовано, а тісно взаємодіють, формуючи комплексну імунну відповідь. Т-хелпери 2-го типу активують В-лімфоцити та стимулюють продукцію антитіл, надаючи сигнали через цитокіни та прямий міжклітинний контакт. В свою чергу, антитіла можуть опосередковувати клітинні ефекторні механізми, такі як антитілозалежна клітинна цитотоксичність (АЗКЦ), коли антитіла, зв'язані з поверхнею інфікованої клітини, розпізнаються Fc-рецепторами природних кілерів, що призводить до знищення клітини-мішені.

Баланс між Th1 та Th2 відповідями визначає характер імунної реакції та клінічний перебіг захворювання. Надмірна Th1-відповідь може призводити до імунопатології та пошкодження тканин, тоді як домінування Th2-відповіді сприяє хронізації деяких внутрішньоклітинних інфекцій. Розуміння цих механізмів критично важливе для інтерпретації діагностичних результатів та прогнозування перебігу захворювання.

Практичні рекомендації для вибору діагностичного підходу. Вибір методу діагностики має базуватися на розумінні патогенезу конкретного захворювання та домінуючого типу імунної відповіді:

Для позаклітинних бактеріальних інфекцій (більшість бактеріальних захворювань, викликаних коками, паличками, спірохетами) домінує гуморальна відповідь. Оптимальний підхід – серологічні методи (ІФА, реакції аглютинації, РЗК). Результати інтерпретують з урахуванням динаміки IgM/IgG.

Для вірусних інфекцій активуються обидва типи імунітету. Серологічні методи (ІФА, РНВ, РГА) ефективні для виявлення гуморальної відповіді та визначення імунного статусу стада. Однак на ранніх стадіях (перші 5-7 днів) серологія може бути негативною, і доцільніше використовувати молекулярні методи (ПЛР) для виявлення вірусного геному.

Для внутрішньоклітинних бактеріальних інфекцій (туберкульоз, паратуберкульоз, бруцельоз) домінує клітинно-опосередкована відповідь. Хоча гуморальна відповідь також розвивається, вона може бути слабкою або з'являтися пізно. Оптимальна стратегія – комбінація шкірних проб, тестів визначення інтерферону-γ та серологічних методів (ІФА для виявлення IgG).

Для паразитарних інфекцій зазвичай розвивається сильна Th2-опосередкована гуморальна відповідь з високими титрами IgG та IgE. Серологічні методи (ІФА) високоефективні, особливо для діагностики хронічних інвазій.

Для оцінки імунного статусу стада та ефективності вакцинації найбільш практичними є серологічні методи (ІФА, РНВ), які дозволяють швидко обробити велику кількість зразків. Для масових досліджень переважають методи, що виявляють IgG як маркер протективного імунітету.

Порівняльна характеристика типів імунної відповіді:

Параметр	Гуморальна відповідь	Клітинна відповідь
Ефекторні клітини	В-лімфоцити, плазматичні клітини	Т-лімфоцити (Th1, Th2, CD8+ Т-кілери)
Ефекторні молекули	Антитіла (IgM, IgG, IgA, IgE)	Цитокіни, цитотоксичні білки (перфорин, гранзими)
Основні мішені	Позаклітинні патогени, токсини, віруси у біологічних рідинах	Внутрішньоклітинні патогени, інфіковані клітини, пухлинні клітини
Діагностичні методи	ІФА, РНВ, РЗК, аглютинація, ІФА, імунохроматографія	Шкірні проби, ІГРА, проточна цитометрія, тести проліферації
Терміни виявлення	IgM: 5-7 днів, IgG: 10-14 днів після інфікування	3-7 днів після інфікування (раніше ніж антитіла)

Переваги для діагностики	Простота, швидкість, можливість масових досліджень, об'єктивність	Раннє виявлення інфекції, оцінка протективного імунітету
Недоліки для діагностики	Відсутність відповіді на ранніх стадіях, неможливість виявити клітинний імунітет	Складність, висока вартість, потреба у свіжих зразках, суб'єктивність інтерпретації

Розуміння механізмів гуморальної та клітинної імунної відповіді, їх динаміки та особливостей при різних інфекційних захворюваннях є фундаментом для раціонального вибору діагностичних методів, правильної інтерпретації результатів лабораторних досліджень та формування ефективних стратегій епізоотологічного контролю. Інтегративний підхід, що враховує обидва типи імунітету, дозволяє максимально повно оцінити імунний статус тварини або стада та приймати обґрунтовані рішення щодо профілактики та боротьби з інфекційними захворюваннями.

2.1.3. Динаміка антитілоутворення при інфекційних захворюваннях тварин

Розуміння динаміки антитілоутворення є критично важливим для правильної інтерпретації результатів серологічних досліджень та прийняття обґрунтованих діагностичних рішень. Концентрація антитіл у сироватці крові не є статичною величиною – вона змінюється протягом інфекційного процесу, створюючи специфічні серологічні профілі, що характеризують різні стадії взаємодії макроорганізму з патогеном.

Практичне застосування знань про динаміку антитілоутворення дозволяє не лише встановити факт інфікування, але й визначити стадію інфекційного процесу, диференціювати гостру інфекцію від хронічної, відрізнити природне інфікування від вакцинального імунітету.

«Діагностичне вікно» та серонегативна фаза

«Діагностичне вікно» – це проміжок часу між моментом інфікування та появою антитіл у крові тварини. Цей період становить одну з найбільших діагностичних проблем у серології, оскільки протягом нього тварина вже є інфікованою та потенційно заразною, але серологічні тести дають негативні результати.

Тривалість діагностичного вікна залежить від типу патогену та його імуногенності, індивідуальних особливостей імунної системи тварини, шляху та дози інфікування, чутливості використаного серологічного методу.

Практичні рекомендації для мінімізації впливу «діагностичного вікна». Повторне серологічне дослідження через 2-4 тижні при підозрі на гостру

інфекцію; комбінація серологічних методів з виявленням патогену (ПЛР, виділення культури); карантинування нових тварин на термін, що перевищує «діагностичне вікно»; використання високочутливих методів (ІФА замість РА або РЗК).

Сероконверсія та методика парних сироваток

Сероконверсія – це процес переходу від серонегативного стану (відсутність антитіл) до серопозитивного (виявлення специфічних антитіл). Документування сероконверсії є золотим стандартом підтвердження гострої інфекції у ветеринарній діагностиці.

Методика парних сироваток полягає у порівнянні титрів антитіл у двох зразках сироватки, відібраних від однієї тварини з інтервалом 10-21 день. Перший зразок відбирають у гострій фазі захворювання, другий – у фазі реконвалесценції.

Критерії оцінки результатів парних сироваток:

- достовірна сероконверсія: збільшення титру антитіл у 4 рази і більше;
- сумнівний результат: збільшення титру у 2 рази;
- відсутність сероконверсії: титр залишається незмінним або знижується.

Приклад інтерпретації: Корова №453, підозра на лептоспіроз. Перша сироватка (3-й день): титр 1:100. Друга сироватка (17-й день): титр 1:800. Збільшення у 8 разів – сероконверсія – підтвердження гострого лептоспірозу.

Застереження при роботі з парними сироватками:

- обидві сироватки необхідно досліджувати одночасно, в одному аналітичному проході;
- термін між відбором повинен бути оптимальним для конкретної інфекції;
- перший зразок слід відбирати якомога раніше після появи клінічних ознак;
- результат інтерпретують лише при дотриманні всіх технічних вимог.

Індекс авідності IgG як маркер ранньої інфекції. Авідність характеризує міцність зв'язку між антитілом та антигеном. На відміну від афінності, яка описує силу зв'язку одного антигензв'язувального центру, авідність відображає сумарну міцність зв'язку всієї молекули антитіла з антигеном.

Під час первинної імунної відповіді В-лімфоцити спочатку продукують антитіла з низькою авідністю. У процесі дозрівання імунної відповіді відбираються В-клітини, що продукують антитіла з вищою афінністю. Цей процес «дозрівання авідності» триває від 2-3 тижнів до 3-4 місяців після інфікування.

Індекс авідності (IA, Index of Avidity) – це лабораторний показник, що відображає відсоток зв'язаних антитіл у загальній кількості специфічних IgG. Визначається шляхом обробки сироватки дисоціюючим агентом (6-8М сечовиною), який руйнує слабкі зв'язки.

Формула розрахунку індексу авідності:

$$IA = \frac{\text{ОЩ після обробки}}{\text{ОЩ без обробки}} \times 100\%,$$

AI – індекс авідності;

ОЩ – оптична щільність;

IA - Індекс авідності.

Інтерпретація індексу авідності IgG:

Індекс авідності	Інтерпретація	Час після інфікування
< 30%	Низька – гостра інфекція	До 3 місяців
30-50%	Проміжна – перехідна стадія	2-4 місяці
> 50%	Висока – хронічна інфекція	> 3-4 місяців

Материнські антитіла та їх вплив на діагностику. Материнські антитіла (MAT) – це імуноглобуліни класу G, які передаються від матері до потомства трансплацентарно або через молозиво. MAT забезпечують пасивний імунітет новонародженим тваринам.

Періоди циркуляції материнських антитіл (MAT) у різних видів тварин:

Вид тварин	Тривалість циркуляції MAT
Велика рогата худоба	4-8 місяців
Свині	2-5 місяців
Коні	4-6 місяців
Собаки	2-4 місяці
Кішки	2-3 місяці
Птиця	1-4 тижні

Діагностичні проблеми, пов'язані з материнськими антитілами: хибнопозитивні результати (молодняк дає позитивну реакцію, не будучи інфікованим); інтерференція з вакцинацією (MAT можуть нейтралізувати вакцинні штами); період вікна: час між зникненням MAT та розвитком власного імунітету.

Стратегії подолання «проблеми» материнських антитіл: визначення класу імуноглобулінів: IgM вказує на активну інфекцію; повторне тестування

через 3-4 тижні; тестування після зникнення МАТ (дотримання вікових обмежень); використання ПЛР-діагностики (виявлення збудника не залежить від антитіл).

Персистенція антитіл та їх клінічне значення

Персистенція антитіл – це тривалість циркуляції специфічних імуноглобулінів у крові після інфікування або вакцинації.

Фактори, що впливають на персистенцію: характер інфекції, імуногенність патогену, інтенсивність первинної імунної відповіді, вид та індивідуальні особливості тварини, реінфекція або повторна вакцинація.

Клінічне значення персистенції антитіл: епізоотологічні дослідження: виявлення контакту з збудником у минулому; планування вакцинації: тривала персистенція забезпечує захист; оцінка імунного статусу стада: відсоток серопозитивних тварин; диференціальна діагностика: швидке зникнення може вказувати на імуносупресію.

Після досягнення піку імунної відповіді концентрація антитіл поступово знижується. Цей процес називається згасанням титру і відбувається зі специфічною кінетикою для кожного збудника.

Динаміка зниження титрів антитіл: швидка фаза (перші 2-3 місяці) – титр знижується на 50-70% від піку; повільна фаза (3-12 місяців): стабілізація на рівні довгоживучих плазматичних клітин; плато або повільне зниження: залишкові антитіла можуть циркулювати роками.

Практичне значення явища зниження титрів антитіл: визначення термінів ревакцинації (моніторинг титрів дозволяє встановити оптимальний час); оцінка захищеності (титр нижче захисного рівня вказує на необхідність ревакцинації); епізоотологічний моніторинг (масове зниження титрів може свідчити про відсутність циркуляції збудника).

Приклад: Стадо ВРХ, вакциноване проти ящуру. Через 1 місяць – титр 1:128, через 6 місяців – 1:32, через 12 місяців – 1:16. Захисний титр – 1:32. Висновок: рекомендована ревакцинація через 6-8 місяців.

Вторинна імунна відповідь при повторному контакті з антигеном.

Вторинна імунна відповідь виникає при повторному контакті імунної системи з тим самим антигеном. На відміну від первинної імунної відповіді, вторинна реакція розвивається значно швидше, досягає вищих титрів антитіл і характеризується переважною продукцією високоафінних IgG.

Порівняльна характеристика первинної та вторинної імунної відповіді:

Параметр	Первинна відповідь	Вторинна відповідь
Латентний період	5-10 днів	1-3 дні
Час досягнення піку	14-21 день	5-7 днів
Пікова концентрація IgG	1-10 г/л	10-100 г/л (у 10-100 разів вище)
Співвідношення IgM:IgG	переважає IgM	переважає IgG
Авідність антитіл	Низька до високої	Відразу висока
Тривалість підтримання	2-6 місяців	6-24 місяці і більше

Практичне значення вторинної імунної відповіді:

- стратегія вакцинації – більшість вакцин вимагають первинної серії з 2-3 введень, потім ревакцинація викликає потужну вторинну імунну відповідь;
- диференціальна діагностика: швидке (3-5 днів) і значне (у 8-16 разів) зростання титру свідчить про реінфекцію
- оцінка напруженості імунітету – здатність до вторинної відповіді вказує на наявність імунологічної пам'яті
- проблеми інтерпретації – вторинна імунна відповідь на вакцинацію може імітувати серологічну картину гострої інфекції

Приклад: Теля, вакциноване проти паразитозу-3. Перша вакцинація: титр через 21 день – 1:64. Ревакцинація через 3 тижні: титр через 7 днів – 1:512 (зростання у 8 разів). Це класична вторинна імунна відповідь.

Для коректної інтерпретації результатів серологічних досліджень з урахуванням динаміки антитілоутворення необхідно використовувати системний підхід, що включає аналіз множинних параметрів.

Практична інтерпретація динаміки утворення антитіл та алгоритм прийняття рішень:

1. Оцінка клінічного статусу та анамнезу:

- наявність клінічних ознак захворювання та їх тривалість;
- вік тварини (можливість циркуляції материнських антитіл);
- дані щодо вакцинації (типи вакцин, дати, виробники);
- епізоотична ситуація в стаді/регіоні;
- час відбору проби відносно початку захворювання/вакцинації.

2. Аналіз серологічних даних:

- визначення присутніх класів імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) ;
- оцінка титрів та їх співвідношення;
- при можливості – визначення індексу авідності IgG;

- порівняння з пороговими значеннями для конкретної інфекції.

3. Інтерпретація результатів з урахуванням динаміки

антитілоутворення:

Серологічний профіль	Інтерпретація	Рекомендовані дії
IgM(+), IgG(-)	Рання гостра інфекція	Повторити через 10-14 днів
IgM(+), IgG(+) низький	Гостра інфекція, середня стадія	Парні сироватки
IgM(+/-), IgG(+) IA низький	Гостра інфекція (до 3 міс)	Лікування, карантин
IgM(-), IgG(+) IA високий	Хронічна інфекція (>3-4 міс)	Моніторинг
IgM(-), IgG(+) низький	Віддалений контакт / поствакц.	Оцінити вакцинацію
IgM(-), IgG(-)	Відсутність контакту або діагн. вікно	ПЛР, повторити через 2-3 тижні
IgG зростання 4+ рази	Сероконверсія, гостра інфекція	Діагноз встановлено
IgG стабільно високий роками	Персистуюча інфекція	Моніторинг, оцінка елімінації

4. Прийняття клінічного рішення:

- серологічні дані завжди інтерпретують у контексті клінічної картини та епізоотичної ситуації;
- при сумнівних результатах обов'язкове повторне дослідження та додаткові методи (ПЛР, культура);
- одноразовий позитивний результат без клініки та епізоотології вимагає обережної інтерпретації;
- документування сероконверсії в парних сироватках є найнадійнішим підтвердженням гострої інфекції.

Правильна інтерпретація результатів вимагає не лише знання теоретичних основ імунології, але й практичного досвіду та розуміння специфіки кожного конкретного захворювання. Системний підхід до аналізу серологічних даних з урахуванням усіх факторів дозволяє приймати обґрунтовані діагностичні рішення та забезпечувати ефективний контроль інфекційних хвороб у ветеринарній практиці.

2.2. Класифікація імунологічних методів

Імунологічні діагностичні методи становлять основу сучасної серологічної діагностики інфекційних захворювань тварин. Розмаїття цих методів зумовлено різними способами виявлення та вимірювання імунної

відповіді, що дозволяє підібрати оптимальний метод для кожної конкретної діагностичної задачі.

Класифікація імунологічних методів базується на принципі виявлення різних етапів імунної відповіді. Залежно від того, який аспект взаємодії антиген-антитіло або який ефект імунної відповіді досліджується, всі імунологічні методи поділяють на три основні групи: тести первинного зв'язування, тести вторинного зв'язування та тести третинного зв'язування.

Загальна характеристика груп імунологічних методів:

Група методів	Що виявляється	Основний принцип	Приклади методів
Тести первинного зв'язування	Безпосереднє зв'язування Аг-Ат	Пряма детекція імунного комплексу за допомогою міток	РІФ, ІФА, ІХА, ХЛІА
Тести вторинного зв'язування	Наслідки реакції Аг-Ат	Виявлення видимих змін внаслідок утворення імунних комплексів	РА, РП, РЗК, імуноблот
Тести третинного зв'язування	Функціональна активність імунітету	Оцінка біологічних ефектів імунної відповіді <i>in vivo/in vitro</i>	РН, тести захисту, цитотоксичні тести

Примітки: Аг – антиген; Ат – антитіло; РІФ – реакція імунофлуоресценції; ІФА – імуноферментний аналіз; ІХА – імунохроматографічний аналіз; ХЛІА – хемілюмінесцентний імуноаналіз; РА – реакція аглютинації; РП – реакція преципітації; РЗК – реакція зв'язування комплементу; РН – реакція нейтралізації.

Тести первинного зв'язування є найбільш чутливими та специфічними методами, оскільки вони безпосередньо виявляють взаємодію антигену з антитілом ще до виникнення будь-яких вторинних ефектів. Використання різноманітних міток (флуоресцентних, ферментних, радіоактивних, колоїдного золота) дозволяє візуалізувати навіть мінімальні кількості утворених імунних комплексів.

Тести вторинного зв'язування реєструють видимі наслідки взаємодії антиген-антитіло, такі як преципітація (утворення осаду), аглютинація (злипання частинок), фіксація комплементу. Ці методи, хоча й менш чутливі порівняно з первинними тестами, мають важливе практичне значення завдяки простоті виконання та можливості візуальної оцінки результатів.

Тести третинного зв'язування оцінюють кінцевий біологічний ефект імунної відповіді – здатність антитіл нейтралізувати патоген, захищати від інфекції, опосередковувати цитотоксичність. Ці методи найбільш адекватно відображають рівень захисного імунітету, проте є найбільш трудомісткими та потребують роботи з живими культурами клітин або піддослідними тваринами.

Вибір методу діагностики залежить від низки факторів:

- мети дослідження (скринінг, підтвердження діагнозу, оцінка імунітету)
- стадії інфекційного процесу (гостра фаза, хронічна інфекція, реконвалесценція)
- доступності лабораторного обладнання та реактивів
- кількості зразків, що підлягають дослідженню
- термінів, відведених на виконання аналізу
- кваліфікації персоналу
- економічної доцільності

У сучасній ветеринарній практиці найширше застосування знайшли тести первинного зв'язування, особливо імуноферментний аналіз (ІФА), завдяки оптимальному поєднанню чутливості, специфічності, швидкості виконання та можливості автоматизації процесу.

2.2.1. Тести первинного зв'язування (пряме виявлення реакції антиген-антитіло)

Тести первинного зв'язування представляють найбільш чутливу та специфічну групу імунологічних методів, які безпосередньо виявляють та вимірюють зв'язування антигену з антитілом на молекулярному рівні. На відміну від тестів вторинного зв'язування, які реєструють видимі фізичні зміни (преципітацію, аглютинацію), тести первинного зв'язування детектують сам процес формування імунного комплексу за допомогою спеціальних міток.

Принцип тестів первинного зв'язування полягає у використанні антитіл або антигенів, кон'югованих з певною міткою (репортерною молекулою), яка дозволяє візуалізувати або кількісно виміряти утворення комплексу антиген-антитіло. Залежно від типу мітки розрізняють: флуоресцентні мітки (флуорохроми), ферментні мітки, радіоактивні ізотопи, частинки колоїдного золота, хемілюмінесцентні сполуки.

Переваги тестів первинного зв'язування:

- висока чутливість: можливість виявлення мінімальних концентрацій антигену або антитіл (пікограми)
- висока специфічність: пряма детекція імунного комплексу мінімізує неспецифічні реакції
- можливість кількісного визначення: побудова калібрувальних кривих та визначення концентрації
- швидкість виконання: результати можуть бути отримані протягом годин
- об'єктивність оцінки: інструментальна реєстрація результатів знижує суб'єктивізм

- придатність до автоматизації: можливість високопродуктивного скринінгу

До основних методів первинного зв'язування, що застосовуються у ветеринарній діагностиці, належать: реакція імунофлуоресценції (РІФ), імуноферментний аналіз (ІФА), імунохроматографічний аналіз (ІХА), хемілюмінесцентний імуноаналіз (ХЛІА), радіоіmunний аналіз (РІА).

2.2.2. Тести вторинного зв'язування (виявлення наслідків взаємодії антиген-антитіло)

Тести вторинного зв'язування представляють групу імунологічних методів, які виявляють і вимірюють вторинні ефекти (видимі наслідки) взаємодії антиген-антитіло. На відміну від тестів первинного зв'язування, які безпосередньо детектують утворення іmunного комплексу за допомогою міток, тести вторинного зв'язування реєструють фізичні та хімічні зміни, що виникають внаслідок накопичення іmunних комплексів у достатній кількості.

Принцип тестів вторинного зв'язування базується на здатності іmunних комплексів, утворених при взаємодії антигену з антитілом, викликати видимі макроскопічні чи мікроскопічні зміни. До таких змін відносяться: преципітація (утворення нерозчинного осаду при взаємодії розчинних антигенів з антитілами), аглютинація (злипання корпускулярних антигенів або частинок, вкритих антигенами), активація системи комплементу (каскадна реакція білків комплементу при зв'язуванні з іmunними комплексами), перенесення білків в електричному полі з візуалізацією зон преципітації (імуноелектрофорез).

Переваги тестів вторинного зв'язування:

- простота виконання: не потребують складного обладнання або міток
- візуальна оцінка результатів: результат можна спостерігати неозброєним оком або під мікроскопом
- економічність: низька вартість реагентів та витратних матеріалів
- довгий термін зберігання реагентів: багато реагентів стабільні протягом тривалого часу
- можливість напівкількісної оцінки: титрування дозволяє оцінити концентрацію антитіл
- історична значущість: класичні методи з багаторічним досвідом застосування

Обмеження тестів вторинного зв'язування:

- нижча чутливість: порівняно з тестами первинного зв'язування потребують більшої кількості антигену або антитіл для формування видимого результату

- тривалість виконання: багато методів потребують інкубації протягом 18-48 годин
- суб'єктивність оцінки: інтерпретація результатів залежить від досвіду оператора
- можливість неспецифічних реакцій: проблеми прозони та постзони при реакціях аглютинації, складність контролю якості
- обмежена автоматизація: більшість методів важко автоматизувати

До основних методів вторинного зв'язування, що застосовуються у ветеринарній діагностиці, належать: реакції преципітації (РП) та її модифікації (імунодифузія в агарі, імуноелектрофорез, радіальна імунодифузія), реакції аглютинації (РА) та її модифікації (пряма аглютинація, непряма гемаглютинація, латекс-аглютинація, реакція мікроаглютинації), реакція зв'язування комплементу (РЗК), імуноблотинг (Western blot, імунохроматографічний блот).

Незважаючи на нижчу чутливість порівняно з тестами первинного зв'язування, методи вторинного зв'язування зберігають своє значення у сучасній діагностичній практиці завдяки простоті, доступності та можливості використання в лабораторіях з базовим оснащенням. Особливе місце ці методи займають при підтвердженні результатів скринінгових досліджень та у референс-лабораторіях для арбітражних досліджень.

2.2.3. Тести третинного зв'язування (оцінка функціональних наслідків імунної відповіді)

Тести третинного зв'язування представляють найбільш біологічно релевантну групу імунологічних методів, які оцінюють функціональні наслідки імунної відповіді *in vivo* та *in vitro*. На відміну від тестів первинного та вторинного зв'язування, які виявляють лише факт зв'язування антигену з антитілом або його наслідки, тести третинного зв'язування визначають здатність імунної системи нейтралізувати патоген, захищати організм від інфекції та опосередковувати специфічну цитотоксичність.

Принцип тестів третинного зв'язування полягає в оцінці біологічного ефекту імунної відповіді на рівні цілісного організму, органів, тканин або клітинних систем. Ці тести вимірюють кінцевий результат імунологічної реакції: здатність антитіл нейтралізувати інфекційність вірусів, токсичність бактеріальних токсинів, блокувати інвазію паразитів; спроможність імунної системи забезпечити захист від летальної дози збудника; ефективність клітинного імунітету в знищенні інфікованих або трансформованих клітин; функціональну активність ефекторних механізмів імунітету (комплемент-залежна цитотоксичність, антитіло-залежна клітинна цитотоксичність).

Переваги тестів третинного зв'язування:

- найвища біологічна релевантність: безпосередньо відображають захисну спроможність імунітету
- функціональна оцінка антитіл: визначають не тільки наявність, але й активність антитіл
- прогностична цінність: дозволяють передбачити клінічний результат інфекції або ефективність вакцинації
- золотий стандарт: часто використовуються як референтні методи для валідації інших тестів
- міжнародна стандартизація: результати можуть бути виражені в міжнародних одиницях
- оцінка імунітету популяції: незамінні при визначенні колективного імунітету та ефективності вакцинальних програм

Обмеження тестів третинного зв'язування:

- висока складність виконання: потребують роботи з живими вірусами, бактеріями, клітинними культурами або лабораторними тваринами
- вимоги до біобезпеки: необхідність спеціалізованих приміщень (BSL-2, BSL-3) та дотримання суворих правил біобезпеки
- тривалість аналізу: від кількох днів до тижнів (час на культивування вірусів, інкубацію клітин, спостереження за тваринами)
- висока вартість: дорогі реагенти, витратні матеріали, утримання тварин, кваліфікований персонал
- низька продуктивність: неможливість одночасного аналізу великої кількості зразків
- варіабельність результатів: залежність від багатьох біологічних факторів (штами вірусів, лінії клітин, генетика тварин)
- етичні міркування: використання лабораторних тварин потребує дотримання принципів 3R (replacement, reduction, refinement)

До основних методів третинного зв'язування, що застосовуються у ветеринарній діагностиці та дослідженнях, належать: реакція нейтралізації вірусів (РН) *in vitro* на клітинних культурах, тести захисту (*protection assays*) на лабораторних тваринах, тести пасивної передачі імунітету (*passive transfer assays*), цитотоксичні тести (комплемент-залежна цитотоксичність, антитіло-залежна клітинна цитотоксичність), тести на гіперчутливість (*delayed-type hypersensitivity, passive cutaneous anaphylaxis*), викликова проба (*challenge tests*) для оцінки ефективності вакцинації.

Тести третинного зв'язування займають особливе місце у ветеринарній імунології та діагностиці. Вони незамінні при розробці та оцінці ефективності вакцин, визначенні корелятив захисту, встановленні референтних значень

для інших діагностичних тестів. Незважаючи на складність та високу вартість, ці методи залишаються золотим стандартом для оцінки функціонального імунітету та прийняття критичних рішень у програмах контролю та ерадикації інфекційних захворювань. У сучасній практиці спостерігається тенденція до заміщення тестів третинного зв'язування на лабораторних тваринах альтернативними *in vitro* методами, що відповідає принципам гуманного поводження з тваринами та зменшує вартість досліджень.

2.3. Принципи побудови імунологічних тестів

Побудова ефективного імунологічного тесту вимагає комплексного підходу, який враховує мету діагностики, властивості збудника, особливості імунної відповіді організму та доступні технічні можливості. Правильний вибір системи виявлення, оптимальне форматування тесту та забезпечення балансу між специфічністю і чутливістю є критичними факторами, що визначають успішність діагностичного методу.

2.3.1. Вибір системи виявлення

Система виявлення є ключовим елементом імунологічного тесту, що дозволяє візуалізувати або кількісно виміряти утворення імунного комплексу антиген-антитіло. Вибір системи виявлення визначається метою дослідження, типом аналізу, доступністю обладнання та вимогами до чутливості методу.

Основні типи систем виявлення:

Ферментні мітки представляють найпоширенішу систему виявлення в сучасній діагностиці. Найчастіше використовуються пероксидаза хрому (HRP) та лужна фосфатаза (AP), які каталізують перетворення хромогенних субстратів з утворенням кольорового продукту. Переваги ферментних міток включають стабільність реагентів, безпеку використання, можливість кількісного вимірювання за допомогою спектрофотометра, широку доступність комерційних кон'югатів. До недоліків належать можливість інгібування ферментів компонентами біологічних зразків, необхідність точного дотримання термінів інкубації, обмежена стабільність деяких субстратів.

Флуоресцентні мітки (флуорохроми) емітують світло певної довжини хвилі при опроміненні ультрафіолетовим або видимим світлом. Найпоширеніші флуорохроми: FITC (зелене свічення), родамін (червоне свічення), фікоеритрин, Alexa Fluor. Переваги включають високу чутливість виявлення, можливість множинного аналізу (різні

флуорохроми в одному зразку), швидкість реакції (без необхідності інкубації з субстратом), застосування в проточній цитометрії та мікроскопії. Обмеження: необхідність спеціального обладнання (флуоресцентний мікроскоп, спектрофлуориметр), вигорання флуорохромів при тривалому опроміненні, висока вартість деяких реагентів.

Хемілюмінесцентні мітки генерують світло в результаті хімічної реакції без необхідності зовнішнього джерела збудження. Основні системи: акридиніумові ефіри, люмінол з HRP, діоксетанові субстрати з AP. Переваги: надвисока чутливість (виявлення зептомольарних концентрацій 10^{-21} M), широкий динамічний діапазон вимірювання, відсутність фонового поглинання світла, придатність до повної автоматизації. Недоліки: дороге обладнання (люмінометри), швидке згасання сигналу в деяких системах, висока вартість реагентів.

Колоїдні мітки (колоїдне золото, кольоровий латекс) забезпечують візуальну детекцію без приладів. Частинки колоїдного золота (20-40 нм) мають червоно-пурпурове забарвлення, латексні частинки можуть бути різних кольорів. Переваги: візуальна оцінка результату, не потрібне обладнання, довгий термін зберігання, швидкість аналізу (5-20 хвилин), ідеальні для польових тестів. Обмеження: нижча чутливість порівняно з ферментними методами, якісні або напівкількісні результати, можливі проблеми з суб'єктивною інтерпретацією.

Радіоактивні мітки (^{125}I , ^3H , ^{32}P) забезпечують найвищу чутливість виявлення. Переваги: екстремальна чутливість, стабільність сигналу, точність кількісного визначення. Недоліки: необхідність ліцензування та спеціальних приміщень, радіаційна небезпека, короткий термін придатності через розпад ізотопів, складність утилізації відходів, поступово витісняються безпечнішими альтернативами.

Критерії вибору системи виявлення:

Мета дослідження: скринінг (акцент на продуктивності), підтвердження (акцент на специфічності), кількісне визначення (потреба в широкому динамічному діапазоні).

Необхідна чутливість: для виявлення слідових концентрацій – хемілюмінесценція, для рутинної діагностики – ферментні мітки.

Умови проведення: лабораторія з обладнанням (ІФА, ХЛІА), польові умови (ІХА), дослідницькі завдання (флуоресценція, мультиплексування)

Продуктивність: для масового скринінгу – автоматизовані ферментні системи, для поодиноких зразків – експрес-тести.

Економічні міркування: вартість обладнання, реагентів, навчання персоналу, терміни зберігання.

Безпека: уникнення радіоактивних міток, дотримання біобезпеки при роботі з живими збудниками.

2.3.2. Форматування імунологічних тестів

Формат тесту визначає спосіб організації імунологічної реакції та послідовність додавання реагентів. Правильний вибір формату критично важливий для досягнення оптимальних діагностичних характеристик і залежить від природи аналіту (антиген чи антитіло), мети тестування та доступних реагентів.

Формати для виявлення антитіл:

Непрямий формат є найпоширенішим для виявлення антитіл у сироватці крові.

Принцип: антиген іммобілізований на твердій фазі → додають досліджувану сироватку (первинні антитіла) → промивання → додають мічені вторинні антитіла (анти-видові імуноглобуліни) → промивання → субстрат/реєстрація сигналу.

Переваги: ампліфікація сигналу (кілька вторинних антитіл зв'язуються з одним первинним), універсальність вторинних антитіл (одні реагенти для різних антигенів), можливість виявлення різних класів Ig (IgM, IgG, IgA), економічність (не потрібно мітити кожне специфічне антитіло).

Недоліки: можливе неспецифічне зв'язування компонентів сироватки з твердою фазою, необхідність високих стартових розведень сироватки для зменшення фону, видова специфічність (потрібні різні вторинні антитіла для різних видів тварин).

Конкурентний (блокуючий) формат базується на конкуренції між антитілами зразка та міченими антитілами за зв'язування з антигеном.

Принцип: антиген іммобілізований на твердій фазі → одночасно додають досліджувану сироватку та мічені антитіла → відбувається конкуренція → промивання → субстрат/реєстрація (інтерпретація інверсна: більше антитіл у зразку = менший сигнал).

Переваги: міжвидова універсальність (один тест для різних видів тварин), мінімізація неспецифічного зв'язування (сироватка в низьких розведеннях), висока специфічність при використанні моноклональних антитіл, можливість стандартизації.

Недоліки: складніша оптимізація (потреба в точному балансі реагентів), вища вартість (моноклональні антитіла), інверсна інтерпретація може бути неінтуїтивною.

Формати для виявлення антигенів:

Прямий формат є найпростішим методом виявлення антигену.

Принцип: антиген адсорбується безпосередньо на твердій фазі → промивання → додають мічені специфічні антитіла → промивання → субстрат/реєстрація.

Переваги: мінімальна кількість стадій, швидкість виконання, менше джерел варіабельності.

Недоліки: необхідність мічення кожного специфічного антитіла окремо, нижча чутливість (без ампліфікації сигналу), можливі проблеми з орієнтацією антигену на твердій фазі.

Сендвіч-формат забезпечує найвищу чутливість для виявлення великих антигенів з множинними епітопами.

Принцип: захоплююче антитіло іммобілізоване на твердій фазі → додають зразок з антигеном → антиген зв'язується з захоплюючим антитілом → промивання → додають детектуюче мічене антитіло (до іншого епітопу) → промивання → субстрат/реєстрація.

Переваги: найвища чутливість та специфічність, можливість використання неочищених препаратів (захоплююче антитіло вибірково зв'язує антиген), зменшення неспецифічного зв'язування, придатність для аналізу складних матриць.

Недоліки: антиген повинен мати щонайменше два різні епітопи, складність розробки (потрібна пара антитіл до різних епітопів), обмеження для малих молекул, можливий ефект стеричних перешкод.

Конкурентний формат для антигенів використовується для малих молекул або коли неможливий сендвіч-формат.

Принцип: обмежена кількість антитіл іммобілізована на твердій фазі → одночасно додають зразок та мічений стандартний антиген → відбувається конкуренція → промивання → реєстрація (більше антигену в зразку = менший сигнал).

Переваги: придатність для малих молекул (гаптени, гормони), не потрібна пара антитіл, можливість кількісного визначення.

Недоліки: складна оптимізація, інверсна інтерпретація, часто нижча чутливість.

Фактори вибору формату:

Природа аналіту: великі білки – сендвіч метод, малі молекули – конкурентний формат.

Доступність реагентів: наявність пари антитіл для сендвіч-формату, моноклональних антитіл для конкурентного.

Видова специфічність: конкурентний формат для множинних видів, непрямий для окремих видів.

Складність матриці: сендвіч для складних зразків, прямий для очищених препаратів.

Мета: скринінг (високочутливий непрямий або сендвіч), підтвердження (високоспецифічний конкурентний).

2.3.3. Специфічність та чутливість імунологічних методів

Специфічність і чутливість є двома найважливішими характеристиками будь-якого діагностичного тесту, які визначають його здатність правильно ідентифікувати хворих і здорових тварин. Розуміння цих понять та факторів, що на них впливають, є критичним для розробки, валідації та правильного застосування імунологічних тестів у ветеринарній практиці.

Аналітична чутливість (Analytical Sensitivity, ASe) відображає здатність методу виявляти мінімальну концентрацію аналіту (антигену або антитіла) в зразку. Вона визначається як *нижня межа виявлення (Limit of Detection, LOD)* – найменша концентрація, яку метод може надійно відрізнити від нульової (*blank*). Аналітична чутливість залежить від типу системи виявлення (хемілюмінесценція > флуоресценція > ферменти > колоїдне золото), формату тесту (сендвіч зазвичай чутливіший за прямий), якості реагентів (афінність антитіл, чистота антигенів), оптимізації умов реакції (концентрації, час інкубації, температура), рівня фонового сигналу (неспецифічне зв'язування).

Аналітична специфічність (Analytical Specificity, ASp) характеризує здатність методу виявляти саме цільовий аналіт без перехресних реакцій з іншими речовинами. Висока аналітична специфічність означає мінімум хибнопозитивних сигналів від споріднених антигенів або гетерофільних антитіл. *Фактори впливу:* специфічність антитіл (моноклональні зазвичай специфічніші за поліклональні), вибір антигенних епітопів (унікальні проти консервативних ділянок), блокування неспецифічних сайтів зв'язування, умови промивання (видалення незв'язаних компонентів), склад зразка (ліпери, гемоліз, ревматоїдний фактор).

Діагностична чутливість (Diagnostic Sensitivity, DSe) – це здатність тесту правильно ідентифікувати хворих/інфікованих тварин.

Діагностична чутливість (DSe) розраховується як:

$$DSe = \frac{\text{Істинно позитивні}}{\text{Істинно позитивні} + \text{Хибнонегативні}} \times 100\%$$

Висока DSe критична для скринінгових програм, програм ерадикації захворювань, ранньої діагностики інфекцій, мінімізації ризику пропуску хворих тварин. DSe залежить від стадії захворювання (рання/пізня), штаму збудника (варіабельність антигенів), індивідуальної імунної відповіді тварини, вибору порогового значення (cut-off).

Діагностична специфічність (Diagnostic Specificity, DSp) – це здатність тесту правильно ідентифікувати здорових/неінфікованих тварин.

Діагностична специфічність (DSp) розраховується як:

$$DSp = \frac{\text{Істинно позитивні}}{\text{Істинно позитивні} + \text{Хибнонегативні}} \times 100\%$$

Висока DSp важлива для підтверджувальних тестів, міжнародної торгівлі тваринами, сертифікації благополучних стад, уникнення економічних втрат від хибнопозитивних результатів. DSp залежить від перехресних реакцій з іншими збудниками, вакцинального анамнезу тварин, наявності материнських антитіл, аутоімунних процесів.

Взаємозв'язок чутливості та специфічності

Між діагностичною чутливістю та специфічністю існує зворотний зв'язок, який визначається вибором порогового значення (**cut-off**). Зниження cut-off підвищує DSe (виявляє більше слабкопозитивних), але знижує DSp (більше хибнопозитивних через фонові сигнали). Підвищення cut-off підвищує DSp (зменшує хибнопозитивні), але знижує DSe (пропускає слабкопозитивні зразки). Оптимальний cut-off визначається метою тестування: для скринінгу пріоритет DSe (краще виявити всіх потенційно хворих), для підтвердження пріоритет DSp (мінімізувати хибнопозитивні).

Стратегії оптимізації діагностичних характеристик:

- послідовне тестування: високочутливий скринінговий тест → високоспецифічний підтверджуючий тест для позитивних зразків;
- паралельне тестування: одночасне використання кількох тестів (позитивний хоча б в одному) підвищує загальну DSe;
- мультимаркерний підхід: виявлення кількох антигенів або антитіл одночасно для підвищення точності;
- врахування клінічного контексту: інтерпретація результатів з урахуванням клінічних ознак, епізоотичної ситуації, анамнезу;

- повторне тестування: аналіз парних сироваток для виявлення сероконверсії або зростання титру антитіл.

Правильне розуміння та збалансування специфічності і чутливості є ключовим для успішного застосування імунологічних методів у ветеринарній діагностиці. Вибір оптимальних параметрів тесту повинен базуватися на конкретній діагностичній задачі, епізоотичній ситуації та можливих наслідках діагностичних помилок. У наступних розділах будуть детально розглянуті конкретні методи та підходи до їх валідації і стандартизації.

РОЗДІЛ 3. ОСНОВНІ ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

3.1. Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ІФА), або *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), є найпоширенішим і найбільш універсальним методом серологічної діагностики в сучасній ветеринарній практиці. Поєднуючи високу чутливість і специфічність з можливістю автоматизації та кількісного визначення результатів, ІФА став золотим стандартом для виявлення антитіл і антигенів при діагностиці інфекційних захворювань тварин, контролі ефективності вакцинації та моніторингу епізоотичної ситуації.

Історія розвитку методу. Імуноферментний аналіз з'явився на перетині кількох наукових напрямків і став результатом тривалої еволюції імунологічних методів діагностики. Передумови для створення ІФА були закладені ще в 1950-х роках, коли дослідники почали активно шукати альтернативу радіоімунному аналізу (RIA), який, незважаючи на високу чутливість, мав серйозні обмеження через використання радіоактивних ізотопів.

Ключовий прорив відбувся в 1960-х роках, коли кілька груп дослідників незалежно один від одного почали експериментувати з використанням ферментів як міток для виявлення імунологічних реакцій. У 1966 році Stratis Avrameas і Jacques Uriel в Інституті Пастера у Парижі розробили метод кон'югації ферментів з антитілами, що стало технологічною основою майбутнього ІФА. Вони продемонстрували, що пероксидаза хрому може бути хімічно зв'язана з антитілами без втрати їх імунологічної активності.

Паралельно, в 1967-1968 роках, Peter Perlmann і Eva Engvall зі Стокгольмського університету розробили перший варіант твердофазного імуноферментного аналізу, де антиген адсорбувався на полістироловій

поверхні. Однак справжнім народженням методу ELISA в його сучасному розумінні вважається 1971 рік, коли дві незалежні групи дослідників – Anton Schuurs і Bauke van Weemen в Нідерландах, а також Eva Engvall і Peter Perlmann у Швеції – опублікували детальні протоколи методу, які включали основні принципи, що використовуються й досі:

- іммобілізацію антигену або антитіла на твердій фазі
- блокування неспецифічних сайтів зв'язування
- використання ферментних міток та хромогенних субстратів

Термін «ELISA» (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) був запропонований у 1976 році і швидко набув міжнародного визнання. Протягом 1970-1980-х років метод активно розвивався: були створені різні модифікації (непрямий, конкурентний, сендвіч-варіанти), розроблені стандартизовані протоколи, удосконалені ферментні мітки та субстрати. Важливим етапом стала поява комерційних діагностичних наборів у 1980-х роках, що зробило ІФА доступним для рутинної лабораторної практики.

У ветеринарній медицині ІФА почав активно впроваджуватися з середини 1980-х років, спочатку для діагностики вірусних захворювань великої рогатої худоби (лейкоз, вірусна діарея), а згодом розширився практично на всі види тварин і більшість інфекційних захворювань. Революційним моментом стала розробка міжвидових конкурентних тест-систем, які дозволили використовувати один набір для діагностики різних видів тварин.

На сучасному етапі ІФА продовжує еволюціонувати: з'явилися мультиплексні варіанти для одночасного виявлення кількох аналітів, розроблені повністю автоматизовані системи для високопродуктивного скринінгу, створені портативні варіанти для польових умов. Однак базові принципи, закладені майже півстоліття тому, залишаються незмінними і продовжують слугувати основою для цього надзвичайно важливого діагностичного методу.

3.1.1. Принципи імуноферментного аналізу

Імуноферментний аналіз базується на трьох ключових компонентах, які в сукупності забезпечують високу чутливість і специфічність методу: специфічна імунологічна реакція між антигеном та антитілом, іммобілізація одного з реагентів на твердій фазі та ферментна мітка для візуалізації результату.

Тверда фаза та принцип іммобілізації. Критичним елементом ІФА є використання твердої фази – зазвичай 96-лункових полістиролових планшетів, які мають високу здатність до адсорбції білків. Процес

іммобілізації білків (антигенів або антитіл) на полістироловій поверхні відбувається через гідрофобні взаємодії та Ван-дер-Ваальсові сили. Важливо, що адсорбція є відносно необоротною, що дозволяє проводити множинні цикли промивання без втрати іммобілізованого матеріалу.

Для ІФА використовують спеціально оброблені планшети з різним ступенем гідрофобності поверхні:

Стандартні планшети – підходять для більшості білків.

Високоадсорбційні планшети – використовують для антигенів з низькою молекулярною масою.

Планшети з модифікованою поверхнею – застосовують для ковалентного зв'язування білків через функціональні групи.

Ефективність іммобілізації залежить від:

- концентрації білка;
- рН та іонної сили буферного розчину (зазвичай карбонатно-бікарбонатний буфер рН 9,4-9,6);
- температури та тривалості інкубації (4°C протягом ночі або 37°C 2-3 години);
- властивостей самого білка (молекулярна маса, гідрофобність, конформація).

Блокування та мінімізація неспецифічного зв'язування. Після іммобілізації антигену або антитіла на твердій фазі значна частина поверхні планшета залишається вільною і може неспецифічно зв'язувати компоненти наступних розчинів. Для запобігання цьому проводять етап блокування – інкубацію лунок з розчином, що містить білки або детергенти, які займають вільні сайти зв'язування, але не взаємодіють з компонентами імунологічної реакції.

Найпоширеніші блокуючі розчини:

- бичачий сироватковий альбумін (Bovine Serum Albumin, BSA) 1-5% у фосфатно-сольовому буфері;
- знежирене сухе молоко 3-5% (містить казеїн та інші блокуючі білки);
- сироватку тварин (зазвичай 5-10%, від виду, відмінного від досліджуваного);
- комерційні блокуючі розчини (суміші білків і детергентів оптимізованого складу).

Важливо: вибір блокуючого агента критично важливий, оскільки неправильний вибір може призвести до підвищення фонового сигналу або, навпаки, до блокування специфічного зв'язування. Наприклад, молоко не можна використовувати при роботі з біотинілованими системами через наявність біотину в складі казеїну.

Ферментні мітки та система візуалізації. Основою методу ІФА є використання ферментів як репортерних молекул. Фермент, кон'югований з антитілом або антигеном, каталізує перетворення безбарвного хромогенного субстрату в кольоровий продукт, концентрація якого пропорційна кількості зв'язаного кон'югату. Ця ферментна ампліфікація сигналу є ключем до високої чутливості методу – одна молекула ферменту може перетворити тисячі молекул субстрату.

Найпоширеніші ферментні мітки в ІФА:

- 1. Пероксидаза хрому (Horseradish Peroxidase, HRP).** Є найчастіше використовуваним ферментом завдяки високій питомій активності, стабільності, відносно невеликій молекулярній масі (40 кДа) та широкій доступності субстратів. HRP каталізує окиснення різноманітних хромогенних субстратів у присутності перекису водню.

Основні субстрати для HRP та їх характеристики:

Субстрат	Колір продукту	λ (нм)	Чутливість	Примітки
TMB (тетраметилбензидин)	Синій → Жовтий	450	Висока	Найчутливіший, стандарт
OPD (о-фенілєндіамін)	Оранжевий	492	Середня	Канцерогенний
ABTS (діамоній 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонат))	Зелений	405	Середня	Розчинний продукт
DAB (діамінобензидин)	Коричневий	-	Висока	Для гістохімії

TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) є найпопулярнішим субстратом для HRP у сучасних діагностичних наборах. Реакція проходить у дві стадії: спочатку утворюється синій розчинний продукт ($\lambda_{max} = 650$ нм), який при зупинці реакції кислотою (зазвичай 1М H₂SO₄ або 1М HCl) перетворюється на жовтий продукт ($\lambda_{max} = 450$ нм). Зупинка реакції критично важлива для стабілізації забарвлення та стандартизації вимірювань.

- 2. Лужна фосфатаза (Alkaline Phosphatase, AP).** Є другим за популярністю ферментом у ІФА. Вона має високу питому активність, стабільна при зберіганні та дає мінімальний фоновий сигнал. Молекулярна маса AP становить близько 140 кДа (димер), що дещо більше, ніж HRP, але це рідко становить проблему в практичних застосуваннях.

Основні субстрати для лужної фосфатази:

Субстрат	Колір продукту	λ (нм)	Особливості
pNPP (п-нітрофенілфосфат)	Жовтий	405	Стандартний, розчинний
BCIP/NBT	Синьо-фіолетовий	-	Нерозчинний, для блотингу

PNPP з підсиленням	Жовтий	405	Високочутливий варіант
--------------------	--------	-----	------------------------

Реакція з pNPP (п-нітрофенілфосфат) відбувається в лужному середовищі (рН 9,5-10,5): фермент каталізує відщеплення фосфатної групи від безбарвного субстрату з утворенням жовтого п-нітрофенолу. На відміну від реакції з HRP, реакцію з AP зазвичай не зупиняють, а вимірюють інтенсивність забарвлення після певного часу інкубації.

Вибір між HRP та AP для конкретного застосування

HRP використовують переважно для:

- рутинної діагностики (більшість комерційних наборів);
- високочутливого виявлення (ТМВ субстрат);
- швидких аналізів (реакція триває 10-30 хвилин);
- автоматизованих систем.

AP краще застосовувати для:

- тривалих інкубацій (фермент стабільніший);
- мінімізації ендогенної активності (менше ендогенної AP у біологічних зразках);
- імуногістохімії та блотингу;
- мультиплексних аналізів (можна комбінувати з HRP).

Система промивання та її важливість. Промивання є одним з найкритичніших етапів ІФА, оскільки визначає співвідношення сигнал/шум у фінальному результаті. Мета промивання – повне видалення незв'язаних компонентів реакції при збереженні специфічних імунних комплексів на твердій фазі.

Промивання проводять після кожного етапу інкубації:

- після блокування – видалення надлишку блокуючого розчину;
- після інкубації з досліджуваним зразком – видалення незв'язаних антитіл;
- після інкубації з кон'югатом – видалення надлишку мічених антитіл.

Стандартний промивний буфер – фосфатно-сольовий буфер (PBS, рН 7,2-7,4) з додаванням неіоногенного детергенту Tween-20 (0,05-0,1%). Детергент необхідний для послаблення гідрофобних взаємодій і видалення неспецифічно зв'язаних білків, але його концентрація не повинна бути надто високою, щоб не порушити специфічні імунні комплекси.

Основні параметри промивання:

- кількість циклів: зазвичай 3-5 промивань по 300-400 мкл на лунку;
- тривалість контакту: 30-60 секунд замочування між промиваннями;
- повнота видалення: планшет перевертають і струшують на абсорбуючому папері;

- уникнення висихання: між етапами лунки не повинні пересихати.

Важливо: недостатнє промивання призводить до високого фонового сигналу та хибнопозитивних результатів. Надмірне або агресивне промивання може призвести до втрати специфічного сигналу, особливо при роботі з низькоафінними антитілами. Автоматичні промивні пристрої забезпечують найкращу стандартизацію і рекомендуються для високопродуктивних лабораторій.

3.1.2. Типи імуноферментного аналізу

Залежно від мети дослідження (виявлення антитіл або антигенів) та специфіки аналізу, розроблено кілька варіантів ІФА. Кожен формат має свої переваги, обмеження та оптимальні сфери застосування у ветеринарній діагностиці.

Непрямий ІФА для виявлення антитіл є найпоширенішим форматом для виявлення специфічних антитіл у сироватці крові тварин. Метод отримав назву «непрямий», оскільки виявлення досліджуваних антитіл відбувається опосередковано – через вторинні мічені антитіла.

Принцип методу:

1. Специфічний антиген іммобілізують на твердій фазі (лунки мікропланшета)
2. Вільні сайти блокують білковим розчином.
3. Додають досліджувану сироватку; якщо присутні специфічні антитіла, вони зв'язуються з антигеном.
4. Промивають для видалення незв'язаних антитіл.
5. Додають вторинні антитіла, кон'юговані з ферментом (анти-видові імуноглобуліни).
6. Промивають для видалення незв'язаного кон'югату.
7. Додають хромогенний субстрат; розвиток кольору пропорційний кількості зв'язаних антитіл.
8. Зупиняють реакцію та вимірюють оптичну густина на спектрофотометрі.

Переваги непрямого ІФА:

- ампліфікація сигналу: кілька молекул вторинних антитіл можуть зв'язатися з однією молекулою первинного антитіла, що підсилює сигнал;
- економічність: один препарат мічених вторинних антитіл можна використовувати для виявлення різних специфічних антитіл;
- гнучкість: можливість виявлення різних класів імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) шляхом використання відповідних вторинних антитіл;
- висока чутливість: ампліфікація сигналу дозволяє виявляти низькі концентрації антитіл.

Обмеження непрямого ІФА:

- видова специфічність: потрібні різні вторинні антитіла для різних видів тварин;
- неспецифічне зв'язування: компоненти сироватки можуть неспецифічно адсорбуватися на твердій фазі;
- високі розведення: необхідність використання високих стартових розведень сироватки (1:100-1:400) для зменшення фону;
- додатковий етап: інкубація з вторинними антитілами продовжує час аналізу.

Застосування у ветеринарній практиці: непрямий ІФА широко використовується для діагностики більшості інфекційних захворювань тварин: бруцельозу, лейкозу ВРХ, вірусної діареї ВРХ, інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3, інфекційної анемії коней, хвороби Ауескі свиней, класичної чуми свиней, репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. Також метод незамінний для оцінки поствакцинального імунітету та серологічного моніторингу стад.

Конкурентний (блокуючий) ІФА є особливим форматом, який базується на принципі конкуренції між антитілами зразка та міченими антитілами за обмежену кількість антигену. Відмінною особливістю цього методу є те, що інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації антитіл у досліджуваному зразку: чим більше специфічних антитіл у сироватці, тим менший сигнал буде отримано.

Принцип методу:

1. Специфічний антиген іммобілізують на твердій фазі в обмеженій кількості
2. Блокують неспецифічні сайти зв'язування.
3. Одночасно додають досліджувану сироватку та мічені моноклональні антитіла до того самого епітопу.
4. Відбувається конкуренція за зв'язування з антигеном: чим більше антитіл у зразку, тим менше мічених антитіл зможе зв'язатися.
5. Промивають для видалення незв'язаних антитіл.
6. Додають субстрат; інтенсивність забарвлення обернено пропорційна кількості антитіл у зразку.
7. Вимірюють оптичну густину; результат виражають як відсоток інгібування (PI%, Inhibition Percentage) відносно негативного контролю.

Формула розрахунку відсотка інгібування (PI):

$$PI\% = \left[1 - \frac{\text{ОЩ зразка}}{\text{ОЩ негативного контролю}} \right] \times 100\%,$$

де ОЩ – оптична щільність при відповідній довжині хвилі.

Переваги конкурентного ІФА:

Міжвидова універсальність: один тест можна використовувати для різних видів тварин без необхідності видоспецифічних кон'югатів.

Висока специфічність: використання моноклональних антитіл забезпечує виявлення антитіл тільки до визначеного епітопу.

Мінімізація неспецифічних реакцій: сироватка використовується в низьких розведеннях, що зменшує вплив інтерферуючих речовин.

Економічність для масових досліджень: не потрібні різні кон'югати для кожного виду тварин.

Стандартизація: використання стандартизованих моноклональних антитіл забезпечує високу відтворюваність результатів між різними лабораторіями.

Обмеження конкурентного ІФА:

Складність розробки: потрібна ретельна оптимізація концентрацій усіх компонентів для досягнення оптимальної конкуренції.

Висока вартість реагентів: моноклональні антитіла значно дорожчі за поліклональні.

Інверсна інтерпретація: може бути неінтуїтивною (високий сигнал = негативний результат, низький сигнал = позитивний результат).

Обмежена інформація: не дозволяє диференціювати класи імуноглобулінів (IgM від IgG).

Застосування в ветеринарній практиці: Конкурентний ІФА особливо цінний для масових досліджень різних видів тварин у рамках програм моніторингу та контролю. Широко використовується для діагностики ящуру (найпоширеніший тест для міжнародної торгівлі), класичної чуми свиней, африканської чуми свиней, блютангу, хвороби Шмаленберга, везикулярного стоматиту. Метод є офіційно визнаним Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (WOAH) для багатьох захворювань у програмах сертифікації.

Сендвіч-ІФА для виявлення антигенів (або подвійний антитільний метод) є найчутливішим форматом для виявлення антигенів у біологічних зразках. Назва «сендвіч» відображає структуру імунного комплексу, де молекула антигену «затискається» між двома антитілами: захоплюючим антитілом на твердій фазі та детектуючим міченим антитілом.

Принцип методу:

1. Захоплююче антитіло (зазвичай моноклональне до одного епітопу) іммобілізують на твердій фазі.
2. Блокують неспецифічні сайти зв'язування.

3. Додають досліджуваний зразок; якщо присутній антиген, він специфічно зв'язується з захоплюючим антитілом.
4. Промивають для видалення незв'язаних компонентів зразка.
5. Додають детектуюче мічене антитіло (зазвичай до іншого епітопу того самого антигену).
6. Промивають для видалення незв'язаного детектуючого антитіла.
7. Додають субстрат; інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості антигену в зразку.
8. Вимірюють оптичну густину та порівнюють з калібрувальною кривою для кількісного визначення.

Антиген повинен мати щонайменше два різні неперехресні епітопи (антигенні детермінанти), розташовані на достатній відстані один від одного, щоб дозволити одночасне зв'язування обох антитіл без стеричних перешкод. Це обмежує застосування методу для малих молекул (гаптени, пептиди з молекулярною масою <5 кДа).

Переваги сендвіч-ІФА:

- найвища чутливість: дозволяє виявляти пікограмові концентрації антигену завдяки подвійному специфічному зв'язуванню;
- висока специфічність: подвійне розпізнавання різних епітопів мінімізує хибнопозитивні результати;
- аналіз складних матриць: можна використовувати неочищені зразки (сироватка, плазма, культуральна рідина, тканинні гомогенати);
- кількісне визначення: широкий динамічний діапазон дозволяє точно вимірювати концентрацію антигену;
- зменшення неспецифічного зв'язування: захоплює антитіло селективно «витягує» цільовий антиген зі складної суміші.

Обмеження сендвіч-ІФА:

- складність розробки: потрібна пара високоякісних антитіл до різних епітопів одного антигену;
- висока вартість: виробництво та скринінг пари моноклональних антитіл є дорогим процесом;
- обмеження розміру: не підходить для малих антигенів з одним епітопом або для гаптенів;
- ефект гачка: при надзвичайно високих концентраціях антигену можливе отримання хибнонегативних результатів через насичення системи;
- стеричні перешкоди: якщо епітопи розташовані надто близько, зв'язування першого антитіла може блокувати доступ другого.

Застосування в ветеринарній практиці: сендвіч-ІФА є методом вибору для раннього виявлення інфекції, коли антитіла ще не виробилися. Використовується для діагностики вірусних інфекцій (виявлення вірусних

антигенів): грипу птахів (антиген H5/N7), ротавірусних інфекцій телят та поросят, парвовірусного ентериту собак, панлейкопенії котів, коронавірусних інфекцій; бактеріальних інфекцій: виявлення токсинів (ботулінічний токсин, токсини *Clostridium difficile*, ентеротоксини *E.coli*), антигени *Salmonella*, *Campylobacter*; паразитарних інвазій: криптоспоридіоз, гіардіоз; моніторингу вакцинації та виробництва біопрепаратів (кількісне визначення антигенів у вакцинах).

3.1.3. Методика виконання імуноферментного аналізу

Правильне виконання ІФА вимагає суворого дотримання протоколу, контролю умов на кожному етапі та забезпечення якості реагентів. Навіть незначні відхилення від рекомендованої процедури можуть суттєво вплинути на результати аналізу.

Підготовка до виконання аналізу

Підготовка обладнання та матеріалів:

- планшетний спектрофотометр (ІФА-рідер) з відповідними світлофільтрами (зазвичай 450 нм);
- багатоканальні піпетки (8- або 12-канальні) об'ємом 50-300 мкл;
- одноканальні автоматичні піпетки (10-1000 мкл);
- промивний пристрій для планшетів (автоматичний або напівавтоматичний);
- термостат або інкубатор для планшетів (21-37°C);
- холодильник (2-8°C) для зберігання реагентів;
- мікропланшети (96-лункові) відповідного типу;
- плівка або кришки для планшетів (запобігання випаровуванню);
- одноразові наконечники для піпеток;
- пробірки та резервуари для розведення зразків та реагентів.

Підготовка реагентів:

1. Витримування при кімнатній температурі: всі реагенти та зразки повинні бути витримані при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 30-60 хвилин перед використанням. Холодні реагенти можуть призвести до неповного зв'язування та заниження результатів.

2. Приготування промивного буфера: якщо використовується концентрований буфер, його необхідно розвести відповідно до інструкцій (зазвичай 1:20 або 1:25 дистильованою або деіонізованою водою). Перевірити рН (повинен бути 7,2-7,4).

3. Підготовка субстрату: готувати безпосередньо перед використанням. Субстрат повинен бути безбарвним або мати слабе

забарвлення. Якщо субстрат синій (для ТМВ), він не придатний для використання.

4. Ретельне перемішування: всі реагенти перед використанням необхідно ретельно, але обережно перемішати, уникаючи утворення піни. Не вортексувати реагенти з білками.

Підготовка зразків:

1. Сироватка крові: використовувати свіжу або заморожену сироватку. Уникати повторного замороження-розморожування (максимум 3 цикли). Перед використанням центрифугувати (1000-2000 g, 10 хвилин) для осадження фібрину та клітинних елементів.

2. Плазма: може використовуватися замість сироватки для більшості тестів. Переконайтеся, що антикоагулянт не інтерферує з аналізом (ЕДТА, гепарин зазвичай прийнятні).

3. Молоко: для тестування молока зазвичай потрібне попереднє знежирення центрифугуванням або використання спеціальних буферів.

4. Гемолізовані зразки: сильний гемоліз може інтерферувати з результатами, особливо при використанні HRP (гемоглобін має пероксидазну активність). За можливості використовувати негемолізовані зразки.

Процедура виконання непрямого ІФА

Етап 1. Нанесення зразків та контролів

1. Розвести зразки відповідно до інструкцій набору (типове стартове розведення 1:100 - 1:400). Для деяких комерційних наборів зразки не потребують попереднього окремого розведення, натомість, допускається внесення у лунки розчинника, а потім зразків.

2. Внести необхідний об'єм (мкл) підготовлених зразків у відповідні лунки планшета.

3. Обов'язково внести позитивний та негативний контролі у визначені лунки (зазвичай у дублікатах).

4. Накрити планшет плівкою або кришкою.

5. Інкубувати при 21-37°C протягом 60 хвилин (або згідно з протоколом: можливі варіанти 30-90 хвилин).

Етап 2. Промивання №1

1. Видалити вміст лунок (вилити або аспірувати).

2. Заповнити лунки промивним буфером (300-400 мкл).

3. Витримати 30-60 секунд.

4. Видалити буфер.

5. Повторити промивання ще 3-4 рази.

6. Після останнього промивання перевернути планшет та енергійно струснути на абсорбуючому папері для повного видалення рідини.

Етап 3. Нанесення кон'югату

1. Розвести кон'югат (мічені вторинні антитіла) відповідно до інструкцій.
2. Внести по 100 мкл розведеного кон'югату в усі лунки.
3. Накрити планшет.
4. Інкубувати при 21-37°C протягом 30-60 хвилин.

Важливо: кон'югат містить ферменти, які чутливі до світла. Мінімізувати вплив прямого сонячного світла на планшет під час інкубації.

Етап 4. Промивання №2

1. Повторити процедуру промивання аналогічно Етапу 2.
2. 4-5 циклів промивання по 30-60 секунд кожен.

Критично: це промивання є найважливішим для зменшення фонового сигналу. Ретельне видалення незв'язаного кон'югату критично впливає на специфічність результатів.

Етап 5. Додавання субстрату

1. Приготувати субстратний розчин безпосередньо перед використанням (змішати компоненти А та Б, якщо постачаються окремо, допускається наявність гогового субстрату у комерційних наборах).

2. Внести по 100 мкл субстрату в усі лунки швидко та в однаковій послідовності.

3. Інкубувати при кімнатній температурі (18-25°C) у темряві протягом 10-30 хвилин.

4. Спостерігати за розвитком забарвлення: позитивні зразки стають синіми (для ТМВ).

Етап 6. Зупинка реакції

1. Після відповідного часу інкубації додати 100 мкл стоп-розчину (зазвичай 1М H₂SO₄) в усі лунки в тій самій послідовності, що і субстрат.

2. Забарвлення змінюється з синього на жовте.

Обережно: стоп-розчин містить концентровану кислоту. Рекомендовано використовувати захисні рукавички та окуляри. Уникати контакту зі шкірою та очима.

Етап 7. Вимірювання результатів

1. Обережно видалити бульбашки повітря з лунок (якщо присутні) гострим кінцем чистого наконечника до мікродозатора.

2. Протерти дно планшета м'якою тканиною для видалення відбитків пальців та бруду.

3. Виміряти оптичну густину при 450 нм (основна довжина хвилі) та опційно при 620-650 нм (референсна довжина хвилі).

4. Вимірювання провести протягом 30 хвилин після зупинки реакції.

5. Якщо використовується референсна довжина хвилі, кінцевий результат = $ОГ_{450} - ОГ_{620}$.

Інтерпретація результатів імуноферментного аналізу. Правильна інтерпретація результатів ІФА вимагає розуміння принципів валідації тесту, критеріїв прийнятності контролів та методів розрахунку cut-off значень. Інтерпретація завжди повинна проводитися з урахуванням клінічного статусу тварини, епізоотичної ситуації та анамнезу вакцинації.

Валідація аналітичного проходу

Перед інтерпретацією результатів зразків необхідно переконатися, що аналітичний прохід був виконаний коректно. Для цього оцінюють показники контрольних зразків.

Критерії валідності аналізу:

1. Оптична щільність негативного контролю (ОЩ НК) повинна бути нижче визначеного порогу (зазвичай $< 0,3-0,5$ при 450 нм). Високе значення НК вказує на недостатнє промивання або неспецифічне зв'язування.

2. Оптична щільність позитивного контролю (ОЩ ПК) повинна бути вище визначеного порогу (зазвичай $> 0,8-1,0$ при 450 нм). Низьке значення ПК може вказувати на деградацію реагентів або неправильне виконання протоколу.

3. Співвідношення ОЩ ПК / ОЩ НК повинно бути більше визначеного значення (зазвичай $> 3-5$). Це співвідношення відображає динамічний діапазон тесту.

4. Коефіцієнт варіації (Coefficient Variation, CV%) між дублікатами контрольних зразків повинен бути $< 10-15\%$. Високий CV вказує на нестабільність системи або погану техніку піпетування.

Формула розрахунку коефіцієнта варіації (CV):

$$CV\% = \frac{\text{Стандартне відхилення}}{\text{Середнє значення}} \times 100\%$$

Якщо хоча б один з критеріїв валідності не виконується, результати аналізу визнаються недійсними, і тест необхідно повторити.

Методи інтерпретації та розрахунку результатів. Існує кілька підходів до інтерпретації результатів ІФА, вибір яких залежить від типу тесту, його призначення та доступності референтних зразків.

Метод 1. Якісна інтерпретація за cut-off. Найпростіший метод, який класифікує зразки як позитивні, негативні або сумнівні на основі порогового значення (cut-off).

Розрахунок cut-off може проводитися різними способами:

а) Фіксований cut-off: встановлений виробником на основі валідаційних досліджень (наприклад, ОЩ = 0,5).

Інтерпретація: ОЩ зразка < 0,5 → негативний; ОЩ зразка ≥ 0,5 → позитивний.

б) Розрахунок cut-off на основі негативного контролю:

$$\text{Cut-off} = \text{ОЩ НК} \times \text{коефіцієнт}$$

де НК – негативний контроль; коефіцієнт зазвичай становить 2-3 (згідно інструкцій виробника тест-системи).

в) Сіра зона (зона сумнівних результатів): деякі тести використовують діапазон сумнівних значень.

Наприклад: ОЩ < 0,4 → негативний; 0,4 ≤ ОЩ ≤ 0,6 → сумнівний; ОЩ > 0,6 → позитивний.

Зразки із сумнівним результатом рекомендується повторно дослідити через 2-3 тижні.

Метод 2. Напівкількісна інтерпретація за відношенням зразок/позитивний контроль (sample/positive control, S/P). Цей метод нормалізує результати відносно позитивного контролю, що дозволяє порівнювати результати між різними аналітичними проходами та лабораторіями.

Формула розрахунку відношення зразок/позитивний контроль (S/P):

$$\frac{S}{P} = \frac{\text{ОЩ зразка} - \text{ОЩ НК}}{\text{ОЩ ПК} - \text{ОЩ НК}}$$

де НК – негативний контроль;

ПК – позитивний контроль;

ОЩ – оптична щільність.

Або у відсотках (S/P%):

$$\frac{S}{P} = \frac{\text{ОЩ зразка} - \text{ОЩ НК}}{\text{ОЩ ПК} - \text{ОЩ НК}} \times 100\%$$

Інтерпретація:

- $S/P\% < 30\%$ → негативний
- $30\% \leq S/P\% \leq 40\%$ → сумнівний
- $S/P\% > 40\%$ → позитивний

Переваги співвідношення S/P методу: компенсує варіабельність між планшетами та проходами; дозволяє напівкількісно оцінити рівень антитіл; полегшує порівняння результатів між лабораторіями.

Метод 3. Кількісна інтерпретація за титром антитіл

Для точного визначення концентрації антитіл проводять титрування зразків – серійні розведення сироватки з наступним тестуванням кожного розведення.

Процедура:

1. Готують серію дворазових розведень сироватки (наприклад: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200).
2. Тестують кожне розведення в дублікаті.
3. Будують криву титрування (ОЩ залежно від розведення).
4. Титр визначають як зворотне значення максимального розведення, при якому ОЩ перевищує cut-off.

Приклад: якщо розведення 1:800 дає ОЩ $>$ cut-off, а 1:1600 дає ОЩ $<$ cut-off, то титр = 800.

Застосування титрування: моніторинг динаміки антитілоутворення; оцінка ефективності вакцинації; дослідження імунної відповіді; встановлення захисних титрів антитіл.

Метод 4. Інтерпретація конкурентного ІФА за відсотком інгібування

Для конкурентного формату використовується інверсна інтерпретація: чим нижча ОГ, тим вища концентрація антитіл.

Формула розрахунку відсотка інгібування (PI%):

$$PI\% = \left[1 - \frac{\text{ОЩ зразка}}{\text{ОЩ НК}} \right] \times 100\%$$

де ОЩ – оптична щільність;

НК – негативний контроль.

Інтерпретація (приклад):

- $PI\% < 40\%$ → негативний (мало або відсутні антитіла)

- $40\% \leq PI\% \leq 50\%$ → сумнівний
- $PI\% > 50\%$ → позитивний (високий рівень антитіл)

Примітка: конкретні порогові значення $PI\%$ встановлюються виробником тест-системи на основі валідаційних досліджень і можуть відрізнятися для різних наборів.

Фактори, що впливають на результати та їх інтерпретацію

1. Стадія інфекційного процесу:

- рання стадія (перші 5-7 днів): антитіла можуть бути відсутні або присутні у невисокому рівні, що може призвести до хибнонегативного результату. Рекомендується повторне дослідження через 2-3 тижні;
- гостра стадія (1-3 тижні): наростання титру антитіл, переважно IgM. Діагностична цінність найвища при дослідженні парних сироваток;
- хронічна стадія (> 1 місяць): високі стабільні титри IgG. Важко диференціювати активну інфекцію від перенесеної;
- реконвалесценція: поступове зниження титрів. IgM зникають, IgG можуть залишатися місяцями або роками.

2. Вакцинальний анамнез

- поствакцинальні антитіла можуть давати позитивний результат у серологічних тестах. Необхідно враховувати терміни вакцинації та тип вакцини (жива/інактивована);
- для диференціації інфекції від вакцинації використовують DIVA-стратегію (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) з маркерними вакцинами та супутніми тестами;
- титри поствакцинальних антитіл зазвичай нижчі та швидше знижуються порівняно з постінфекційними.

3. Материнські антитіла:

- новонароджені тварини отримують материнські антитіла через молозиво (у жуйних) або трансплацентарно та через молозиво (у коней, свиней, хижаків);
- МАТ можуть циркулювати від 2-4 тижнів (птиця) до 6-8 місяців (ВРХ), даючи хибнопозитивні результати у молодняка;
- для диференціації власних антитіл від МАТ: (а) визначення класу Ig (IgM вказує на власну відповідь), (б) повторне тестування через 3-4 тижні (МАТ знижуються, власні антитіла наростають), (в) дотримання вікових обмежень для тестування.

4. Імуносупресія:

- імунодефіцитні стани (первинні або вторинні) можуть призводити до слабкої або відсутньої продукції антитіл навіть при активній інфекції;
- причини імуносупресії: вірусні інфекції (лейкоз ВРХ, імунодефіцит котів, цирковірусна інфекція свиней), стрес, недостатнє харчування, застосування кортикостероїдів або цитостатиків;
- у таких випадках серологічна діагностика може бути неінформативною; рекомендується використання методів прямого виявлення збудника (ПЛР, виділення культури).

5. Перехресні реакції:

- можливі при наявності антитіл до споріднених збудників з гомологічними антигенними епітопами;
- приклади: перехресні реакції між різними серотипами одного збудника, між філогенетично близькими мікроорганізмами, між вакцинальними та польовими штамми;
- для мінімізації: використання високоспецифічних антигенів або моноклональних антитіл, застосування підтверджувальних тестів, урахування епізоотичної ситуації.

6. Якість зразка:

- гемоліз: сильний гемоліз може інтерферувати з результатами, особливо при використанні HRP;
- ліпемія: висока концентрація ліпідів може призводити до підвищення фонового сигналу;
- бактеріальна контамінація: мікробне забруднення зразків може спричинити деградацію білків та неправильні результати;
- повторне заморожування-розморожування: призводить до деградації антитіл та зниження їх виявлюваності.

Практичні рекомендації щодо інтерпретації результатів

1. Завжди враховуйте клінічний контекст: результати серологічних тестів повинні інтерпретуватися у поєднанні з клінічними ознаками, патологоанатомічними змінами, епізоотичними даними та анамнезом щодо вакцинації.

2. Використовуйте парні сироватки для діагностики гострих інфекцій: відбір першої сироватки в гострій фазі та другої через 14-21 день дозволяє документувати сероконверсію (4-кратне і більше зростання титру) як достовірне підтвердження інфекції.

3. Повторюйте сумнівні результати: зразки, що потрапляють у «сіру зону», необхідно повторно тестувати через 2-3 тижні або підтверджувати іншим методом.

4. Враховуйте обмеження методу: серологічні тести виявляють імунну відповідь, а не безпосередньо збудника. Негативний результат не виключає інфекції в ранній період (діагностичне вікно) або при імуносупресії.

5. Дотримуйтесь вікових обмежень: для уникнення інтерференції з материнськими антитілами дотримуйтесь мінімального віку тестування, рекомендованого виробником тест-системи (зазвичай 4-6 місяців для ВРХ, 3-4 місяці для свиней).

6. Документуйте все: ретельно записуйте дату відбору зразків, дату вакцинації, клінічний статус, попередні результати тестування. Ця інформація критично важлива для правильної інтерпретації.

7. Комбінуйте методи при необхідності: для остаточного діагнозу складних випадків комбінуйте серологію з методами прямого виявлення збудника (ПЛР, виділення культури, гістопатологія).

8. Знайте обмеження вашої тест-системи: ознайомтесь з валідаційними даними набору: діагностична чутливість (DSe), діагностична специфічність (DSp), можливі перехресні реакції, видова специфічність.

3.2. Імунохроматографічний аналіз

Імунохроматографічний аналіз (IXA), також відомий як **lateral flow assay (LFA)** або **rapid test**, являє собою простий, швидкий і недорогий метод якісного або напівкількісного виявлення антигенів або антитіл у біологічних зразках. Завдяки можливості отримання результату протягом 5-20 хвилин без потреби в складному обладнанні, IXA став незамінним інструментом для польової діагностики, скринінгових досліджень та експрес-тестування в умовах ветеринарної практики.

Метод базується на принципі капілярної міграції рідкого зразка вздовж пористої мембрани, де відбувається специфічне зв'язування аналіту з міченими антитілами, що призводить до утворення видимої кольорової лінії. Простота використання (часто описується як «занурити і прочитати») робить IXA доступним для використання персоналом без спеціальної лабораторної підготовки безпосередньо на фермах, у ветеринарних клініках, на кордонах та в польових умовах.

Історія розвитку методу імунохроматографічного аналізу. Концепція імунохроматографії виникла в 1960-х роках як продовження досліджень паперової хроматографії та іммобілізації білків на різних носіях. Однак перші практичні застосування методу з'явилися значно пізніше, коли

були розроблені відповідні мембранні матеріали та стабільні мічені кон'югати.

Перший комерційний імунохроматографічний тест був розроблений у 1980-х роках компанією Unilever для виявлення хоріонічного гонадотропіну людини у сечі – це був знаменитий домашній тест на вагітність Clearblue, який з'явився на ринку в 1985 році. Успіх цього продукту продемонстрував комерційний потенціал технології та стимулював інтенсивний розвиток галузі.

Протягом 1990-х років технологія швидко еволюціонувала: були удосконалені нітроцелюлозні мембрани з контрольованим розміром пор, розроблені стабільні кон'югати колоїдного золота з високою видимістю, створені ефективні системи блокування неспецифічного зв'язування, впроваджені методи масового виробництва для зниження вартості.

У ветеринарній медицині перші ІХА-тести з'явилися наприкінці 1990-х – початку 2000-х років. Спочатку вони використовувалися переважно для діагностики інфекційних захворювань дрібних тварин у клінічній практиці: парвовірусний ентерит собак, панлейкопенія котів, вірус лейкемії котів (FeLV), вірус імунодефіциту котів (FIV). Ці тести швидко набули популярності завдяки можливості отримання результату безпосередньо під час прийому, що дозволяло негайно розпочати відповідне лікування.

З середини 2000-х років сфера застосування ІХА у ветеринарії значно розширилася. Були розроблені тести для продуктивних тварин: мастит корів (соматичні клітини, патогени), діарея телят (ротавірус, коронавірус, криптоспоридії), респіраторні інфекції свиней, грип птахів. Особливо важливим стало використання ІХА у програмах контролю трансграничних інфекційних захворювань, таких як ящур, африканська чума свиней, сказ.

Сучасний етап розвитку (2010-ті роки – теперішній час) характеризується впровадженням нових технологій: мультиплексні тести для одночасного виявлення кількох аналітів, флуоресцентні та магнітні мітки замість колоїдного золота для підвищення чутливості, цифрові зчитувальні пристрої для об'єктивної кількісної інтерпретації, інтеграція з мобільними додатками для документування та передачі результатів, розробка стабільних формулювань для тропічних умов.

Пандемія COVID-19 у 2020-2021 роках стала потужним стимулом для подальшого розвитку технології швидкого тестування, що позитивно вплинуло і на ветеринарну діагностику через масштабування виробництва, зниження вартості компонентів та покращення регуляторних процедур реєстрації.

3.2.1. Принципи роботи імунохроматографічних експрес-тестів

Імунохроматографічний тест являє собою багат шарову систему, де кожен компонент виконує специфічну функцію у процесі аналізу. Розуміння структури та принципів роботи кожного елементу допоможе у правильному використанні тестів та інтерпретації результатів.

Структурні компоненти імунохроматографічного тесту. Типовий ІХА-тест складається з п'яти основних функціональних зон, розташованих послідовно на пластиковій підложці: зона нанесення зразка, кон'югатна зона, реакційна зона, абсорбуюча зона, підложка та корпус. Крім того тести ІХА можуть бути у вигляді смужки на основі нітроцелюльозної мембрани без пластикової касети як на Рисунку 3.1. Принцип роботи обох видів ІХА-тестів однаковий.

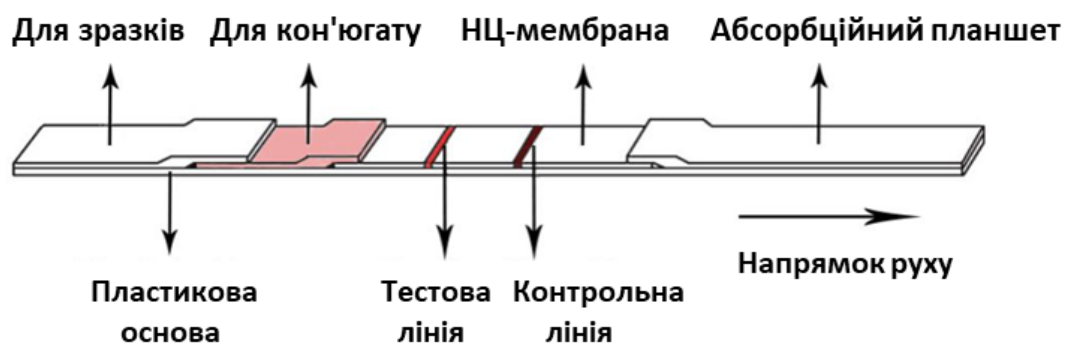


Рис. 3.1. Схематична будова смужки ІХА-тесту

1. Зона нанесення зразка

Це перша зона контакту з біологічним матеріалом, виготовлена з пористого матеріалу (зазвичай целюлозний або скловолоконний фільтр). Основні функції: первинна фільтрація грубих частинок та клітинних елементів, рівномірний розподіл зразка по ширині тест-смужки, попереднє розведення зразка та створення оптимального рН і іонної сили, абсорбція надлишкової рідини для контролю швидкості потоку.

Зона нанесення часто імпрегнована буферними солями та детергентами, які створюють оптимальні умови для імунної реакції. У деяких тестах ця зона може містити лізуючі агенти для руйнування клітин та вивільнення внутрішньоклітинних антигенів.

2. Кон'югатна зона

Це важлива зона, де зберігаються мічені детекційні антитіла у висушеному стані. Мітки зазвичай представлені частинками колоїдного золота (найпоширеніший варіант, 20-40 нм діаметром, червоно-пурпурового кольору), латексними частинками (різні кольори, можливість мультиплексування), флуоресцентними мітками (для високочутливих тестів

з приладним зчитуванням), магнітними наночастинками (для магнітних латеральних тестів).

При проходженні зразка через цю зону мічені антитіла солюбілізуються (розчиняються) та зв'язуються з цільовим аналітом, якщо він присутній у зразку. Формуються мобільні імунні комплекси «аналіт-мічене антитіло», які продовжують мігрувати далі вздовж тест-смужки разом із фронтом рідини.

3. Реакційна мембрана

Це основа тест-системи, виготовлена з нітроцелюлозної мембрани з контрольованим розміром пор (зазвичай 5-15 мкм). Саме тут відбувається специфічне зв'язування та візуалізація результату. На мембрані іммобілізовані дві або більше ліній антитіл: тестова лінія (Test line, T) містить захоплюючі антитіла до цільового аналіту, контрольна лінія (Control line, C) містить антитіла, що зв'язують мічені детекційні антитіла незалежно від наявності аналіту.

Характеристики мембрани впливають на чутливість тесту: розмір пор визначає швидкість капілярного потоку, щільність іммобілізації антитіл впливає на інтенсивність сигналу, гідрофобність поверхні контролює неспецифічне зв'язування.

4. Абсорбуюча зона

Кінцева зона, виготовлена з високоабсорбуючого целюлозного матеріалу. Функції: створення капілярної тяги для забезпечення безперервного потоку рідини, абсорбція надлишкової рідини (зазвичай може утримувати 300-500 мкл), запобігання зворотному потоку та розмивання сигналу. Ємність абсорбента повинна перевищувати об'єм зразка та всіх проміжних буферів.

5. Підложка та корпус

Всі функціональні зони закріплені на жорсткій пластиковій підложці (зазвичай поліетилентерефталат або полістирол), яка забезпечує структурну цілісність тест-смужки. Тест поміщається в пластиковий касетний корпус з віконцями для нанесення зразка та зчитування результату. Корпус захищає мембрану від механічних пошкоджень та контамінації, забезпечує ергономічність використання.

Механізм роботи та формування сигналу. Робота імунохроматографічного тесту базується на капілярній міграції рідини вздовж пористих мембран та специфічному зв'язуванні антигену з антитілами. Розглянемо детально процес для двох основних форматів.

Формат для виявлення антигенів (сендвіч-метод). Цей формат використовується для виявлення великих антигенів з множинними епітопами (віруси, бактерії, білкові токсини).

Послідовність дій:

Крок 1. Нанесення зразка: зразок (сироватка, цільна кров, сеча, слина, фекалії тощо) наноситься на зону нанесення зразка. Рідина починає мігрувати вздовж тест-смужки завдяки капілярним силам.

Крок 2. Солюбілізація кон'югату: рідкий зразок досягає кон'югатної зони, де розчиняє висушені мічені антитіла (наприклад, моноклональні антитіла до антигену X, кон'юговані з колоїдним золотом). Якщо в зразку присутній цільовий антиген, він негайно зв'язується з міченими антитілами, формуючи комплекси «антиген-мічене антитіло».

Крок 3. Міграція до тестової лінії: рідина з розчиненими компонентами продовжує мігрувати до аналітичної мембрани. Комплекси «антиген-мічене антитіло» разом із вільними міченими антитілами (що не зв'язались) рухаються вздовж мембрани.

Крок 4. Захоплення на тестовій лінії: на тестовій лінії (Т) іммобілізовані інші антитіла до того самого антигену, але до іншого епітопу (поліклональні антитіла або моноклональні до іншої детермінанти). Коли комплекси «антиген-мічене антитіло» досягають тестової лінії, антиген зв'язується з іммобілізованими антитілами, утворюючи «сендвіч»: іммобілізоване антитіло – антиген – мічене антитіло. Накопичення мічених частинок (колоїдного золота) на тестовій лінії створює видиму червону лінію.

Крок 5. Контрольна лінія: вільні мічені антитіла (які не зв'язались з антигеном) та комплекси продовжують рухатись далі та досягають контрольної лінії (С). На контрольній лінії іммобілізовані антивидові антитіла (наприклад, козячі антитіла проти мишачих IgG, якщо детекційні антитіла мишачі). Ці антивидові антитіла зв'язують будь-які мічені антитіла незалежно від наявності антигену, формуючи видиму контрольну лінію. Контрольна лінія підтверджує, що тест виконаний правильно і реагенти працюють.

Крок 6. Абсорбція надлишку: надлишкова рідина та незв'язані компоненти абсорбуються абсорбуючою зоною, зупиняючи міграцію після проходження контрольної лінії.

Інтерпретація для сендвіч-формату:

- дві лінії (Т + С) = ПОЗИТИВНИЙ результат (антиген присутній)
- одна лінія (тільки С) = НЕГАТИВНИЙ результат (антиген відсутній)
- немає жодної лінії або тільки Т = НЕДІЙСНИЙ тест (потрібно повторити) (Рисунок 3.2.).

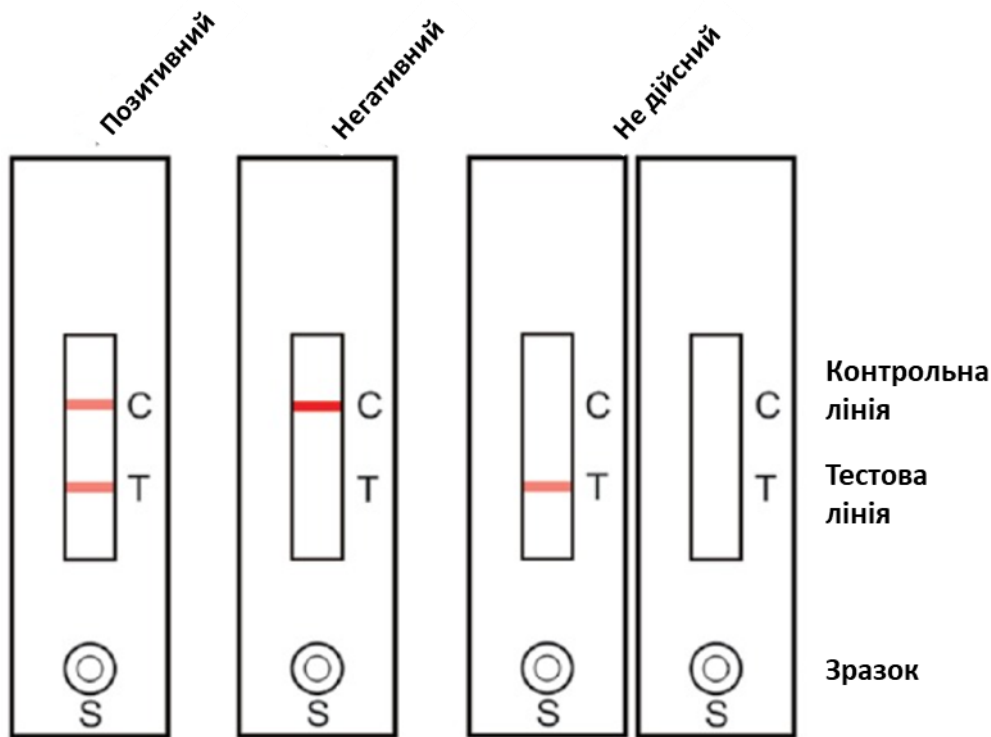


Рис. 3.2. Приклади інтерпретації результатів ІХА

Формат для виявлення антитіл (конкурентний метод). Цей формат використовується для виявлення специфічних антитіл у сироватці крові тварин.

Послідовність дій:

Крок 1-2: аналогічно сендвіч-формату – нанесення зразка та солюбілізація кон'югату. У кон'югатній зоні містяться мічені антигени (наприклад, вірусний антиген, кон'югований з колоїдним золотом). Якщо в сироватці присутні специфічні антитіла, вони зв'язуються з міченим антигеном.

Крок 3-4. Тестова лінія: на тестовій лінії іммобілізований той самий антиген (немічений). Вільні мічені антигени (які не зв'язались з антитілами зразка) захоплюються іммобілізованими антитілами сироватки на тестовій лінії, формуючи видиму лінію. Комплекси «антитіло зразка – мічений антиген» проходять повз тестову лінію, оскільки центри зв'язування антитіл вже зайняті. Важливо: чим більше антитіл у зразку, тим менше вільних мічених антигенів залишається для захоплення на тестовій лінії, тим слабша або відсутня тестова лінія.

Крок 5. Контрольна лінія: на контрольній лінії іммобілізовані антитіла, які зв'язують мічений антиген або антивидові антитіла. Завжди формується видима лінія незалежно від наявності антитіл у зразку.

Інтерпретація для конкурентного формату:

- тільки С (немає Т) = ПОЗИТИВНИЙ результат (антитіла присутні)
- дві лінії (Т + С) = НЕГАТИВНИЙ результат (антитіла відсутні або низький рівень)
- слабка Т + С = можливо сумнівний/низький рівень антитіл
- немає С = НЕДІЙСНИЙ тест

Технічні характеристики та обмеження методу.

Аналітична чутливість: ІХА-тести мають помірну аналітичну чутливість, зазвичай на 1-2 порядки нижчу, ніж ІФА або ПЛР. Типові межі виявлення: для антигенів – 10^3 - 10^6 колонієутворюючих одиниць/мл або інфекційних одиниць/мл; для антитіл – розведення сироватки приблизно 1:10 – 1:100 дає позитивний результат. Низька чутливість може призводити до хибнонегативних результатів при низьких концентраціях аналіту.

Специфічність: при правильному дизайні ІХА-тести можуть досягати високої специфічності (>95-99%), особливо при використанні моноклональних антитіл. Однак можливі перехресні реакції зі спорідненими антигенами або неспецифічне зв'язування компонентів зразка.

Час виконання: одна з головних переваг – швидкість. Типовий час від нанесення зразка до зчитування результату: 5-10 хвилин для більшості тестів на антигени, 10-20 хвилин для тестів на антитіла, до 30 хвилин для деяких високочутливих форматів. Результат слід зчитувати в межах рекомендованого часового вікна (зазвичай 10-30 хвилин); результати, прочитані пізніше, можуть бути недостовірними через неспецифічне зв'язування або висихання.

Якісний/напівкількісний характер: стандартні ІХА дають якісний результат (позитивний/негативний). Інтенсивність тестової лінії приблизно корелює з концентрацією аналіту, що дозволяє напівкількісну оцінку (слабко позитивний, помірно позитивний, сильно позитивний), але точна кількісна оцінка неможлива без спеціального обладнання.

Умови зберігання та стабільність: більшість ІХА-тестів стабільні при кімнатній температурі (2-30°C) протягом 12-24 місяців. Термін придатності може скорочуватися при зберіганні у вологих або жарких умовах. Деякі тести вимагають зберігання при 2-8°C. Заморожування зазвичай руйнує тест через кристалізацію та пошкодження мембран.

Вартість: ІХА-тести є значно дешевшими у виробництві та використанні порівняно з лабораторними методами. Вартість одного тесту зазвичай становить 2-20 доларів США залежно від складності та виробника. Не потрібні витрати на обладнання, реагенти, електроенергію.

Сфера застосування імунохроматографічних тестів у ветеринарній практиці. Імунохроматографічні тести знайшли широке застосування в різних галузях ветеринарної медицини завдяки своїй універсальності, простоті використання та можливості отримання швидких результатів без лабораторної інфраструктури.

Використання в польових умовах на фермах та ветеринарних клініках

1. **Польова діагностика** є однією з найважливіших сфер застосування ІХА-тестів, оскільки вони дозволяють проводити дослідження безпосередньо на місці утримання тварин без необхідності транспортування зразків до лабораторії.

Переваги польового застосування:

- негайне прийняття рішень: результат отримують за 10-20 хвилин безпосередньо біля тварини, що дозволяє негайно розпочати лікування, ізоляцію або інші протиепізоотичні заходи.
- зменшення стресу для тварин: мінімізація транспортування та повторних маніпуляцій.
- економія часу та коштів: відсутність витрат на доставку зразків, швидке отримання результату економить робочий час.
- можливість масового скринінгу: тестування великої кількості тварин за короткий час при спалахах захворювань.
- робота в умовах без електропостачання: не потрібне обладнання, що працює від електромережі.

Типові сценарії польового використання:

Діагностика респіраторних інфекцій великої рогатої худоби: при спалахах респіраторних захворювань у стаді ветеринар може взяти назальні змиви від хворих тварин та протестувати їх безпосередньо на фермі на наявність основних респіраторних патогенів (вірус інфекційного ринотрахеїту, вірус парагрипу-3, респіраторно-синцитіальний вірус, *Mannheimia haemolytica*). Це дозволяє негайно визначити етіологію та призначити специфічне лікування.

Скринінг на мастит у молочному стаді: експрес-тести дозволяють виявити субклінічний мастит під час доїння, визначити рівень соматичних клітин у молоці окремих корів або виявити специфічні патогени (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*). Інфіковані тварини можуть бути негайно ізольовані від основного стада.

Діагностика діареї у телят та поросят: при спалахах діареї фермер або ветеринар можуть взяти фекальні зразки та протестувати на основні кишкові патогени (ротавірус, коронавірус, *E. coli* K99, *Cryptosporidium*,

Clostridium perfringens). Швидке визначення етіології допомагає вибрати правильну терапію та запобігти поширенню інфекції.

Контроль транскордонних захворювань: при підозрі на ящур, африканську чуму свиней, класичну чуму свиней або грип птахів експрес-тести дозволяють швидко підтвердити або виключити діагноз безпосередньо на місці спалаху. Це критично важливо для негайного впровадження карантинних заходів та запобігання розповсюдженню інфекції.

Обмеження польового використання:

- умови навколишнього середовища: екстремальні температури (нижче 0°C або вище 35°C) можуть вплинути на роботу тесту; висока вологість може призвести до конденсації в касеті; пил та бруд можуть контамінувати зразок або тест.
- якість зразка: у польових умовах складніше дотриматися правил відбору та підготовки зразків; контамінація зразків ґрунтом, кормом або іншими забрудниками може призвести до хибних результатів.
- інтерпретація: недостатня освітленість може ускладнити зчитування слабких ліній; суб'єктивність інтерпретації збільшується без лабораторного контролю.
- документування: складніше належним чином задокументувати результати тестування.

2. Застосування в ветеринарних клініках

У ветеринарних клініках ІХА-тести є невід'ємною частиною діагностичного процесу, особливо для дрібних домашніх тварин та екзотичних видів.

Наприклад, інфекційні захворювання собак:

- парвовірусний ентерит – експрес-тест на парвовірус у фекаліях дозволяє негайно підтвердити діагноз у цуценят з гострою діареєю;
- чума собак – виявлення антигену вірусу чуми в кон'юнктивальних змивах або носових виділеннях;
- лептоспіроз – швидке виявлення антитіл або антигену *Leptospira* у сироватці або сечі;
- дірофіляріоз – скринінг на *Dirofilaria immitis* у сироватці крові (виявлення антигену дорослих гельмінтів);
- бореліоз (хвороба Лайма), анаплазмоз, ерліхіоз – комбіновані тести для виявлення множинних трансмісивних інфекцій.

Інфекційні захворювання котів:

- вірус лейкемії котів (FeLV) – скринінг на антиген р27 у сироватці або цільній крові;
- вірус імунодефіциту котів (FIV) – виявлення антитіл у сироватці;
- панлейкопенія – експрес-діагностика парвовірусу котів у фекаліях;

- коронавірусний інфекційний перитоніт (FIP) – допоміжна діагностика через виявлення антитіл або антигену;
- токсоплазмоз – виявлення антитіл IgM/IgG у сироватці.

Клінічні переваги: негайне підтвердження діагнозу під час прийому дозволяє розпочати лікування без затримки; швидке тестування знижує тривогу власника, який отримує відповідь одразу; можливість проведення тестів у присутності власника підвищує довіру та розуміння; економія коштів власника на повторні візити для отримання результатів.

Особливості інтерпретації результатів імунохроматографічних тестів. Правильна інтерпретація результатів ІХА вимагає розуміння принципів роботи тесту, можливих джерел помилок та обмежень методу. На відміну від кількісних лабораторних методів, ІХА дає якісний або напівкількісний результат, що вимагає особливого підходу до інтерпретації.

Базові принципи зчитування результату

Час зчитування результату:

Результат необхідно зчитувати строго в часовому вікні, вказаному виробником (зазвичай 10-20 хвилин після нанесення зразка). Занадто раннє зчитування: лінії можуть бути не повністю сформовані, що призводить до хибнонегативних результатів. Занадто пізнє зчитування (>30 хвилин): можливе появлення неспецифічних слабких ліній через висихання, накопичення фонового сигналу або міграцію компонентів зразка.

Важливо: більшість виробників не рекомендують інтерпретувати результати після 30 хвилин, оскільки вони можуть бути недостовірними.

Умови зчитування:

- достатнє освітлення: природне денне світло або яскраве штучне освітлення (уникати прямих сонячних променів);
- плоска поверхня: тест повинен лежати на рівній поверхні;
- кут огляду: дивитися на тест перпендикулярно, не під кутом;
- чисті руки/рукавички: уникати забруднення оглядового вікна.

Фактори, що впливають на результати та можливі помилки:

1. Якість та тип зразка

Гемоліз: сильний гемоліз може призвести до фонового забарвлення мембрани (червоно-рожевий колір), що ускладнює візуалізацію ліній, особливо слабких. Рекомендація: використовувати негемолізовані зразки; якщо гемоліз неминучий, попередньо центрифугувати зразок.

Ліпемія: молочна (білувата) сироватка з високим вмістом ліпідів може блокувати мембрану, уповільнювати міграцію та призводити до слабких або відсутніх ліній. Рекомендація: відібрати зразок після голодування тварини; центрифугувати для осадження ліпідів.

Згустки фібрину: наявність згустків може блокувати міграцію рідини. Рекомендація: використовувати чисту сироватку або плазму з антикоагулянтом; центрифугувати перед використанням.

В'язкість зразка: дуже в'язкі зразки (наприклад, слиз, гнійні виділення) можуть погано мігрувати. Рекомендація: розвести зразок буфером згідно з інструкціями; використовувати лише рідку фракцію.

2. Техніка виконання

Недостатній об'єм зразка: якщо нанесено менше рекомендованого об'єму, рідина може не досягти контрольної лінії або міграція буде неповною. Результат: відсутність контрольної лінії (недійсний тест) або слабкі лінії.

Надмірний об'єм зразка: надлишкова рідина може переповнити абсорбент, призвести до зворотного потоку та розмивання ліній. Результат: нечіткі або розмиті лінії, фоновий колір.

Контамінація зони нанесення: дотик пальцями, забруднення олією, кремом може перешкодити міграції. Завжди використовувати чисту піпетку або аплікатор.

Порушення цілісності касети: механічні пошкодження, тріщини можуть призвести до неправильної роботи тесту.

3. Умови зберігання та термін придатності

Закінчений термін придатності: деградація реагентів призводить до втрати чутливості. Контрольна лінія може бути слабкою або відсутньою. Завжди перевіряти дату на упаковці.

Неправильне зберігання: вплив високих температур (>30°C) прискорює деградацію білків та кон'югатів; заморожування може зруйнувати мембрани; висока вологість може призвести до передчасної солюбілізації кон'югату. Зберігати тести при рекомендованій температурі в герметичній упаковці.

Використання після розкриття упаковки: після розкриття фольгової упаковки тест повинен бути використаний протягом 1 години (поглинання вологості з повітря може вплинути на роботу). Не використовувати тести з пошкодженою упаковкою.

4. Температура виконання тесту. Більшість ІХА-тестів оптимально працюють при температурі 18-25°C (кімнатна температура).

Низька температура (<15°C): уповільнення міграції рідини, зниження швидкості імунної реакції, можливі хибнонегативні результати через неповне зв'язування. Рекомендація: витримати тест та зразки при кімнатній температурі перед використанням.

Висока температура (>30°C): прискорення міграції може призвести до неповного зв'язування, денатурація білків при екстремальних температурах (>40°C), можливе розмивання ліній. Рекомендація: проводити тест у прохолодному приміщенні або в тіні; уникати прямого впливу сонячних променів.

Причини хибнопозитивних та хибнонегативних результатів

Хибнопозитивні результати (тест показує позитивний при відсутності інфекції):

- перехресні реакції: антитіла до споріднених мікроорганізмів можуть зв'язуватися з антигеном тесту;
- неспецифічне зв'язування: високі концентрації білків, ревматоїдний фактор, гетерофільні антитіла можуть давати фоновий сигнал;
- контамінація: забруднення зразка або тест-касети під час виконання;
- недавня вакцинація: поствакцинальні антитіла можуть давати позитивний результат у серологічних тестах;
- дефектний тест: виробничий брак або неправильне зберігання.

Хибнонегативні результати (тест показує негативний при наявності інфекції):

- рання стадія інфекції: концентрація антигену нижче межі виявлення (перші 3-5 днів), антитіла ще не виробилися (діагностичне вікно);
- низька чутливість тесту: ІХА менш чутливі за ІФА або ПЛР;
- імуносупресія: ослаблена імунна відповідь не виробляє достатньо антитіл;
- неправильний відбір зразка: зразок взятий з неправильного матеріалу або в неправильний час;
- деградація зразка: неправильне зберігання або транспортування зразків;
- ефект прозони: надзвичайно високі концентрації антигену можуть насичувати систему і призводити до слабких або відсутніх ліній;
- варіабельність штамів: деякі штами збудника можуть мати антигенні варіації, не розпізнавані тестом.

Практичні рекомендації щодо використання та інтерпретації ІХА-тестів

- 1. Завжди читайте інструкцію виробника** перед використанням кожного нового тесту, навіть якщо ви маєте досвід роботи з подібними тестами. Різні виробники можуть мати різні протоколи, особливості інтерпретації та специфічні застереження.
- 2. Дотримуйтесь правил відбору зразків:** використовуйте правильний тип зразка (сироватка, цільна кров, фекалії тощо) згідно з інструкцією; відбирайте зразки в оптимальний час відносно початку захворювання; дотримуйтесь правил зберігання зразків до тестування.

3. **Використовуйте позитивні та негативні контролі** коли це можливо для валідації роботи партії тестів, особливо при масових дослідженнях або у важливих випадках.
4. **Документуйте результати негайно:** фотографуйте тест-касету з результатом (використовуйте смартфон з датою та часом); записуйте інтенсивність ліній (слабка/помірна/сильна); зберігайте інформацію про партію тесту, термін придатності, умови виконання.
5. **Інтерпретуйте результати в клінічному контексті:** враховуйте клінічні ознаки, епізоотичну ситуацію, анамнез вакцинації; позитивний результат швидкого тесту – це індикація для дії, але не остаточний діагноз; негативний результат не виключає захворювання, особливо на ранніх стадіях.
6. **Використовуйте підтверджувальні тести при необхідності:** для офіційних діагнозів трансграничних захворювань, для вирішення сумнівних результатів, перед прийняттям критичних рішень (евтаназія, карантин стада).
7. **Розумійте обмеження методу:** ІХА-тести є скринінговими інструментами, а не остаточними діагностичними методами; вони мають нижчу чутливість порівняно з лабораторними методами; результати можуть бути помилковими через різні фактори.
8. **Навчайте персонал:** забезпечте належну підготовку всіх осіб, які виконують тести; проводьте регулярні тренінги з правильної техніки та інтерпретації; створіть стандартні операційні процедури (СОП) для вашої установи.

Імунохроматографічний аналіз став невід'ємною частиною сучасної ветеринарної діагностики завдяки своїй швидкості, простоті та універсальності. Хоча ІХА-тести мають нижчу аналітичну чутливість порівняно з лабораторними методами, їхня здатність надавати результати протягом 10-20 хвилин безпосередньо на місці робить їх незамінними для невідкладної діагностики, польового скринінгу та прийняття швидких клінічних рішень.

Правильне використання ІХА-тестів вимагає розуміння принципів їх роботи, обмежень методу та факторів, що можуть впливати на результати. Ключем до успішного застосування є дотримання інструкцій виробника, контроль якості зразків, правильна техніка виконання та критична інтерпретація результатів у контексті клінічної картини та епізоотичної ситуації.

У майбутньому очікується подальший розвиток технології імунохроматографії: впровадження цифрових зчитувальних пристроїв для

об'єктивної кількісної оцінки, розробка мультиплексних тестів для одночасного виявлення множинних аналітів, інтеграція з мобільними додатками для автоматичного документування та передачі результатів, створення більш чутливих форматів на основі нових типів міток. Ці удосконалення розширяють можливості застосування ІХА та підвищують його діагностичну цінність у ветеринарній практиці.

3.3. Реакція імунофлуоресценції

Реакція імунофлуоресценції (РІФ), або імунофлуоресцентний аналіз, є високочутливим і специфічним методом виявлення та локалізації антигенів або антитіл за допомогою флуоресцентних міток. Метод базується на здатності деяких речовин (флуорохромів) поглинати світло однієї довжини хвилі та випромінювати світло іншої, більшої довжини хвилі, що створює характерне яскраве світіння при спостереженні в люмінесцентний мікроскоп.

РІФ займає особливе місце у ветеринарній діагностиці завдяки унікальній можливості візуалізувати локалізацію антигенів безпосередньо в тканинах, клітинах або мазках, що робить метод незамінним для топічної діагностики, виявлення збудників у патологічному матеріалі та диференціації інфікованих клітин від неінфікованих. Крім того, РІФ дозволяє не тільки виявити наявність антигену, а й оцінити його кількість та локалізацію всередині клітини, що має важливе значення для розуміння патогенезу інфекційних захворювань.

Історія розвитку методу імунофлуоресценції. Витоки методу сягають 1930-х років, коли німецькі дослідники вперше описали явище флуоресценції деяких органічних сполук. Однак справжнім народженням імунофлуоресценції як діагностичного методу вважається 1941 рік, коли американський імунолог Albert Coons та його колеги в Гарвардському університеті вперше успішно кон'югували антитіла з флуоресцеїн-ізоціанатом (FITC) та використали їх для візуалізації пневмококових антигенів у тканинах мишей.

Робота Кунса стала революційною, оскільки вперше продемонструвала можливість «побачити» імунологічну реакцію під мікроскопом. У своїй оригінальній публікації в *Journal of Immunology* він описав принцип прямої імунофлуоресценції, де мічені антитіла безпосередньо зв'язуються з антигеном у тканині, створюючи специфічне зелене світіння.

У 1950-х роках метод був значно удосконалений: 1950 – Coons розробив метод непрямой імунофлуоресценції, який значно підвищив чутливість та гнучкість методу. У 1952 р. – розроблені більш стабільні флуорохроми з

покращеними спектральними характеристиками. У 1957 р. – впроваджені перші комерційні люмінесцентні мікроскопи з відповідними світлофільтрами. У 1958 р. – метод почав активно використовуватися для діагностики інфекційних захворювань людини.

У ветеринарній медицині РІФ почала застосовуватися з 1960-х років. Першими успішними застосуваннями стали: діагностика сказу (виявлення антигену вірусу в мозковій тканині за методом Гольдвассера-Кісслінга, 1958, адаптованим для ветеринарії в 1962-1963 роках), діагностика респіраторних вірусних інфекцій ВРХ, виявлення хламідій у вагінальних мазках. Метод швидко довів свою цінність завдяки можливості швидкого посмертного підтвердження діагнозу сказу безпосередньо в відбитках мозку, що було критично важливим для прийняття рішень щодо постекспозиційної профілактики у людей.

Протягом 1970-1980-х років відбувся бурхливий розвиток методу: синтезовані нові флуорохроми (родамін, фікоеритрин, алофікоціанін), розроблені методи подвійного та потрійного мічення для одночасного виявлення кількох антигенів, впроваджена конфокальна лазерна скануюча мікроскопія, створені автоматизовані системи аналізу флуоресцентних зображень.

Сучасний етап (1990-ті роки – теперішній час) характеризується інтеграцією РІФ з молекулярними методами: поєднання РІФ з *in situ* гібридизацією (FISH), розробка квантових точок як надяскравих флуоресцентних міток, впровадження цифрової мікроскопії та комп'ютерного аналізу зображень, створення автоматизованих систем для високопродуктивного скринінгу.

У 1984 році Albert Coons був нагороджений премією Ласкера – однією з найпрестижніших нагород у медицині – за розробку методу імунофлуоресценції, який продовжує залишатися одним з основних інструментів діагностики та наукових досліджень.

Фізико-хімічні основи флуоресценції. Розуміння фізичних принципів флуоресценції є важливим для правильного використання методу та інтерпретації результатів.

Механізм флуоресценції. Флуоресценція – це явище випромінювання світла речовиною при поверненні електронів із збудженого стану в основний. Процес відбувається в кілька етапів:

1. **Збудження:** флуорохром поглинає фотон світла певної довжини хвилі (збуджуюче світло), електрон переходить на вищий енергетичний рівень, молекула переходить у збуджений стан.

2. *Релаксація*: частина енергії розсіюється у вигляді тепла, електрон переходить на нижчий збуджений рівень. Цей процес відбувається дуже швидко (10^{-12} секунди).
3. *Емісія*: електрон повертається в основний стан, енергія випромінюється у вигляді фотона світла більшої довжини хвилі (емісійне світло). Тривалість флуоресценції (час життя) становить 10^{-9} – 10^{-8} секунди (Рисунок 3.3.).

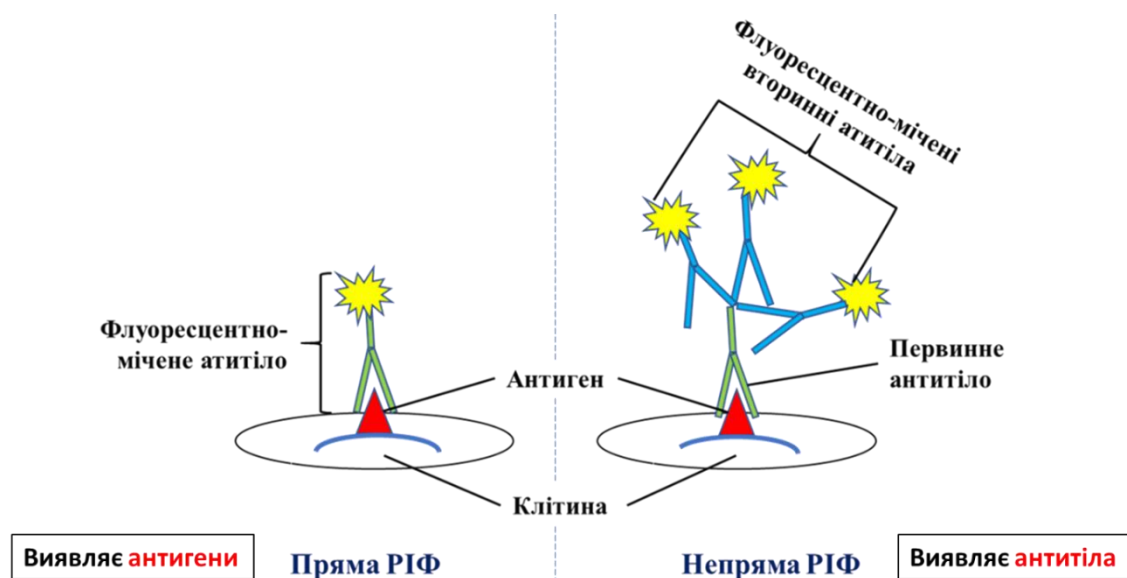


Рис. 3.3. Схема прямої та непрямой реакції імунофлуоресценції

Стоксів зсув – різниця між довжиною хвилі збуджуючого та емісійного світла. Наприклад, FITC має максимум збудження при 495 нм (синє світло) та максимум емісії при 519 нм (зелене світло). Стоксів зсув становить 24 нм. Саме завдяки Стоксовому зсуву можна відділити емісійне світло від збуджуючого за допомогою відповідних світлофільтрів, що дозволяє бачити тільки флуоресценцію без фонового світла.

Квантовий вихід – ефективність перетворення поглиненого світла у флуоресценцію. Виражається як відношення кількості випромінених фотонів до кількості поглинених. Ідеальні флуорохроми мають квантовий вихід близький до 1 (100%), практично використовувані флуорохроми – 0,5-0,9 (50-90%).

Фотознебарвлення – необоротна втрата флуоресценції при тривалому або інтенсивному опроміненні. Відбувається через фотохімічне руйнування флуорохрому під дією кисню та вільних радикалів. Важливо мінімізувати фотознебарвлення: використовувати мінімально необхідну інтенсивність збуджуючого світла, швидко фотографувати препарат, застосовувати антифейд-реагенти (речовини, що зменшують фотознебарвлення).

Флуоресцентні мітки (флуорохроми). Флуорохроми – це речовини, здатні флуоресцювати при опроміненні світлом певної довжини хвилі. Для імунофлуоресценції використовуються флуорохроми, які можуть бути ковалентно зв'язані з антитілами без втрати їх імунологічної активності.

Основні флуорохроми, що використовуються в РІФ:

Флуорохром	Збудження (нм)	Емісія (нм)	Колір	Особливості
FITC (флуоресцеїн)	495	519	Зелений	Найпоширеніший, яскравий, рН-чутливий
TRITC (родамін)	550	570	Червоний	Стійкий до знебарвлення
Texas Red	595	615	Червоний	Дуже яскравий, стійкий
Alexa Fluor 488	495	519	Зелений	Більш стійкий аналог FITC
Alexa Fluor 594	590	617	Червоний	Високий квантовий вихід
DAPI	358	461	Синій	Зв'язується з ДНК, для ядер
Cy3	550	570	Помаранчевий	Серія ціанінових барвників
Cy5	649	670	Далекий червоний	Низька автофлуоресценція

Вибір флуорохрому залежить від:

- доступного обладнання: джерел збудження (ртутна лампа, LED, лазери) та набору світлофільтрів;
- необхідності мультиплексного аналізу: для одночасного виявлення кількох антигенів використовують флуорохроми з різними спектрами емісії;
- автофлуоресценції тканини: деякі тканини мають природну автофлуоресценцію, особливо в зеленій області спектру;
- стійкості до фотознебарвлення: для тривалих досліджень або архівування препаратів;
- вартості: деякі сучасні флуорохроми (Alexa Fluor, Cy-барвники) значно дорожчі за класичні (FITC, TRITC).

3.3.1. Варіанти реакції імунофлуоресценції

Існує два основні варіанти РІФ, які відрізняються способом зв'язування флуоресцентної мітки з імунним комплексом: пряма та непряма імунофлуоресценція. Кожен метод має свої переваги, обмеження та оптимальні сфери застосування.

Пряма реакція імунофлуоресценції.

Принцип методу. При прямій імунофлуоресценції специфічні антитіла, безпосередньо мічені флуорохромом, зв'язуються з відповідним антигеном у препараті. Це найпростіший та найшвидший варіант РІФ, який включає тільки один етап інкубації.

Етапи виконання прямої РІФ:

1. Підготовка препарату: фіксація тканинних зрізів, мазків або клітинних культур на предметних скельцях.

2. Промивання: відмивання залишків фіксатора фосфатно-сольовим буфером (PBS).

3. Нанесення мічених антитіл: інкубація з флуоресцентно-міченими специфічними антитілами (зазвичай 30-60 хвилин при 37°C або кімнатній температурі).

4. Промивання: ретельне відмивання незв'язаних антитіл (3-4 цикли по 5 хвилин у PBS).

5. Заключення: нанесення монтуючого середовища та покривного скельця.

6. Мікроскопія: дослідження в люмінесцентному мікроскопі.

Схематично: Антиген (у препараті) + Мічене антитіло → Комплекс антиген-мічене антитіло (флуоресцентний).

Переваги прямої РІФ:

- швидкість: тільки один етап інкубації, результат можна отримати за 1-2 години;
- простота: менше етапів означає менше можливостей для помилок;
- відсутність перехресних реакцій: немає вторинних антитіл, які можуть неспецифічно зв'язуватися;
- мультиплексування: легко використовувати кілька мічених антитіл з різними флуорохромами для одночасного виявлення кількох антигенів;

Недоліки прямої РІФ:

- низька чутливість: відсутність ампліфікації сигналу, одне антитіло несе одну мітку;
- висока вартість: необхідно мітити кожне специфічне антитіло окремо, що дорого та трудомістко;
- обмежена гнучкість: для кожного нового антигену потрібен новий препарат мічених антитіл;
- можливе зниження афінності: процес мічення може частково пошкодити антитіла та знизити їх здатність зв'язуватися з антигеном;

Застосування прямої РІФ у ветеринарії. *Діагностика сказу:* виявлення антигену вірусу сказу в мозковій тканині (метод Гольдвассера-Кісслінга) залишається золотим стандартом посмертної діагностики. Використовують FITC-мічені антитіла проти нуклеокапсидного білка вірусу сказу. Препарат готують з відбитків мозкової тканини (переважно з аммонова рогу та мозочка). Позитивний результат – характерне яскраво-зелене цитоплазматичне світіння нейронів у вигляді включень (тільця Негрі) (Рисунок 3.4.). Метод дає результат за 2-4 години, на відміну від біопробы на мишах, яка триває 2-3 тижні.



Рис. 3.4. Інтерпритація результатів прямої РІФ.

Примітки: зліва - позитивний результат прямої РІФ (вірус сказу присутній у тканинах мозку хворої тварини); зправа – негативний результат прямої РІФ на вірус сказу у тканинах мозку

Виявлення вірусних антигенів: швидка діагностика респіраторних вірусів у назальних мазках або змивах, виявлення парвовірусів у фекальних мазках, виявлення герпесвірусів у тканинних біопсіях. **Типування клітин:** ідентифікація клітинних популяцій за допомогою CD-маркерів у дослідженнях імунної системи, фенотипування лімфом та лейкоцитів.

Непряма реакція імунофлуоресценції

Принцип методу. Непряма імунофлуоресценція використовує дворівневу систему виявлення: немічені первинні антитіла зв'язуються з антигеном, після чого флуоресцентно-мічені вторинні антитіла (зазвичай антивидові) зв'язуються з первинними антитілами. Це найпоширеніший варіант РІФ завдяки вищій чутливості та гнучкості.

Етапи виконання непрямої РІФ:

1. Підготовка препарату: фіксація тканинних зрізів, мазків або клітинних культур.

2. Блокування: інкубація з блокуючим розчином (5-10% нормальна сироватка, BSA 1-3%) протягом 30-60 хвилин для зниження неспецифічного зв'язування.

3. Нанесення первинних антитіл: інкубація з неміченими специфічними антитілами (60-120 хвилин при 37°C або ніч при 4°C).

4. Промивання №1: відмивання незв'язаних первинних антитіл (3-4 цикли по 5 хвилин у PBS).

5. Нанесення вторинних мічених антитіл: інкубація з флуоресцентно-міченими антивидовими антитілами (30-60 хвилин при 37°C або кімнатній температурі).

6. Промивання №2: відмивання незв'язаних вторинних антитіл (3-4 цикли по 5 хвилин у PBS).

7. Контрастування ядер (опційно): інкубація з DAPI або Hoechst для візуалізації ядер (1-5 хвилин).

8. Заключення: нанесення монтуючого середовища з антифейд-реагентами та покривного скельця.

9. Мікроскопія: дослідження в люмінесцентному мікроскопі.

Схематично: Антиген + Первинне антитіло → Комплекс → + Мічене вторинне антитіло → Флуоресцентний комплекс.

Переваги непрямої РІФ:

- підвищена чутливість (ампліфікація сигналу): кілька молекул вторинних антитіл можуть зв'язатися з одним первинним антитілом, що підсилює флуоресцентний сигнал у 5-20 разів
- економічність: один препарат мічених вторинних антитіл можна використовувати з різними первинними антитілами; не потрібно мітити кожне нове специфічне антитіло
- гнучкість: легко змінювати флуорохром, просто використовуючи інші вторинні антитіла; можна використовувати одні й ті самі первинні антитіла з різними системами виявлення
- збереження афінності: первинні антитіла не модифіковані, що зберігає їх повну здатність зв'язуватися з антигеном
- комерційна доступність: широкий вибір готових мічених вторинних антитіл проти різних видів з різними флуорохромами

Недоліки непрямої РІФ:

- більша тривалість: два етапи інкубації замість одного, зазвичай 3-4 години загалом
- складніша процедура: більше етапів означає більше можливостей для помилок
- можливе неспецифічне зв'язування: вторинні антитіла можуть неспецифічно зв'язуватися з fс-рецепторами на клітинах або з ендогенними імуноглобулінами у тканині

- обмеження для мультиплексування: якщо первинні антитіла з одного виду, важко використовувати кілька первинних антитіл одночасно (вторинні антитіла не зможуть розрізнити їх)

Застосування непрямой РІФ у ветеринарії.

Серологічна діагностика (виявлення антитіл у сироватці): сироватку тварини наносять на зрізи тканин або клітинні культури, що містять відповідний антиген. Якщо у сироватці є специфічні антитіла, вони зв'язуються з антигеном. Потім додають флуоресцентно-мічені антитіла проти імуноглобулінів досліджуваного виду. Цей метод широко використовується для діагностики токсоплазмозу, неоспорозу, аутоімунних захворювань.

Гістопатологія та імуногістохімія: виявлення специфічних білків або патогенів у тканинних зрізах, локалізація експресії білків у різних типах клітин, дослідження розподілу антигенів у патологічно змінених тканинах.

Дослідження клітинних культур: виявлення вірусних антигенів в інфікованих культурах клітин, вивчення внутрішньоклітинної локалізації білків, дослідження цитоскелету та органел клітин.

Типування пухлин: визначення походження пухлинних клітин за допомогою специфічних маркерів, диференціальна діагностика новоутворень, прогностичне значення експресії певних білків.

Техніка виконання реакції імунофлуоресценції

Успішне виконання РІФ вимагає дотримання суворого протоколу на всіх етапах, від підготовки матеріалу до мікроскопічного дослідження. Кожен етап критично важливий для отримання надійних та інтерпретабельних результатів.

Підготовка препаратів для РІФ

1. Мазки-відбитки. Використовуються для швидкої діагностики, особливо в посмертних дослідженнях.

Техніка приготування:

1. Свіже знежирене предметне скельце легко торкається до свіжозрізаної поверхні органу (наприклад, мозку при підозрі на сказ).
2. Робиться кілька відбитків (5-10) на одному скельці з різних ділянок.
3. Препарат підсушується на повітрі (5-10 хвилин).
4. Фіксація: холодний ацетон (-20°C) протягом 10-20 хвилин або суміш ацетон:метанол (1:1) протягом 10 хвилин.

Переваги: швидкість (препарат готовий за 15-20 хвилин), збереження морфології клітин, мінімальна автофлуоресценція.

Застосування: діагностика сказу (відбитки мозку), виявлення вірусних антигенів у легенях, печінці.

2. Тканинні зрізи. Використовуються для детального вивчення локалізації антигенів у тканинній архітектурі.

Типи зрізів:

Кріозрізи: свіжу тканину заморожують у рідкому азоті або на сухому льоду, зрізи товщиною 5-10 мкм виготовляють на кріостаті при -20°C , зрізи наносять на адгезивні скельця (poly-L-lysine або silane-coated), підсушують та фіксують холодним ацетоном або метанолом. Переваги: найкраще збереження антигенності, швидкість (без парафінової проводки), мінімальна автофлуоресценція. Недоліки: потребує кріостату, гірша морфологія порівняно з парафіновими зрізами, обмежений термін зберігання замороженої тканини.

Парафінові зрізи: тканину фіксують у формаліні (10%, нейтральний буферний), проводять через спирти та ксилол, заливають у парафін, виготовляють зрізи товщиною 3-5 мкм, зрізи депарафінізують (ксилол \rightarrow спирти \rightarrow вода), проводять демаскування антигенів (heat-induced epitope retrieval). Переваги: відмінна морфологія, можливість тривалого зберігання блоків, стандартна гістологічна техніка. Недоліки: фіксація може пошкодити деякі антигени, потребує демаскування антигенів, вища автофлуоресценція.

3. Клітинні препарати

Мазки з виділень: назальні, вагінальні, кон'юнктивальні змиви наносять тонким шаром на скельце, підсушують, фіксують ацетоном або метанолом.

Культури клітин: клітини вирощують на покривних скельцях або камерних слайдах, після інфікування/обробки фіксують 4% параформальдегідом або холодним метанолом, промивають PBS.

Цитоцентрифужні препарати: клітинну суспензію центрифугують на скельце (cytocentrifuge), отримують моношар клітин, фіксують та використовують для РІФ.

Фіксація препаратів

Фіксація є критичним етапом, який визначає збереження як морфології, так і антигенності структур. Вибір фіксатора залежить від типу досліджуваного антигену та препарату.

Основні типи фіксаторів:

Холодний ацетон (-20°C , 10-20 хв): найпоширеніший для РІФ, добре зберігає більшість вірусних та бактеріальних антигенів, швидкий та простий, створює пермеабілізацію мембран. Недоліки: може розчиняти ліпіди, не підходить для деяких ліпідних антигенів.

Метанол (100%, -20°C, 10 хв): альтернатива ацетону, краще зберігає морфологію клітин, менше екстракція білків. Недоліки: довше висихає, може пошкодити деякі епітопи.

Параформальдегід (4% у PBS, 10-20 хв, кімнатна температура): краще зберігає структуру клітин та тканин, використовується для внутрішньоклітинних антигенів, потребує наступної пермеабілізації (Triton X-100 0,1-0,5%, 10 хв). Недоліки: може маскувати деякі епітопи, створює автофлуоресценцію.

Суміш ацетон:метанол (1:1, -20°C, 10 хв): компромісний варіант, поєднує переваги обох розчинників.

Правила фіксації:

- не перевищувати час фіксації: надмірна фіксація може маскувати епітопи;
- не висушувати: препарати після фіксації не повинні висихати до промивання;
- використовувати свіжі фіксатори: старі фіксатори можуть втратити ефективність;
- дотримуватися температури: для ацетону та метанолу критично важлива низька температура.

3.3.3. Люмінесцентна мікроскопія та оцінка результатів

Мікроскопічна оцінка РІФ вимагає спеціального обладнання та розуміння принципів інтерпретації флуоресцентних сигналів.

Люмінесцентний мікроскоп та його компоненти

Джерела збуджуючого світла. Ртутна лампа високого тиску (НВО 50-100W): традиційне джерело, широкий спектр від УФ до видимого світла, висока інтенсивність, відносно недорого. Недоліки: обмежений термін служби (200-300 годин), нерівномірність освітлення, потребує вирівнювання, нагрівається.

Металогалогенна лампа: більш рівномірне освітлення, довший термін служби (2000 годин), стабільніша інтенсивність. Недоліки: дорожча за ртутну, слабша в УФ-діапазоні.

LED (світлодіоди): сучасна альтернатива, дуже довгий термін служби (>20000 годин), миттєве вмикання/вимикання, низьке енергоспоживання, відсутність нагрівання, можливість швидкого перемикавання довжин хвиль. Недоліки: вища початкова вартість, обмежені довжини хвиль (доступні тільки певні піки).

Система світлофільтрів. Кожен набір світлофільтрів складається з трьох компонентів:

1. Збуджуючий фільтр: пропускає тільки світло потрібної довжини хвилі для збудження флуорохрому.

2. Дихроїчне дзеркало: відбиває коротко хвильове світло (збуджуюче) до препарату, пропускає довго хвильове світло (емісійне) до ока/камери.

3. Емісійний (бар'єрний) фільтр: блокує залишки збуджуючого світла, пропускає тільки флуоресцентне світло.

Стандартні набори фільтрів:

- синій набір (для FITC, Alexa 488): збудження 450-490 нм, емісія 515-565 нм → зелена флуоресценція;
- зелений набір (для TRITC, Texas Red, Alexa 594): збудження 540-580 нм, емісія 600-660 нм → червона флуоресценція;
- УФ набір (для DAPI, Hoechst): збудження 330-385 нм, емісія 420-470 нм → синя флуоресценція.

Об'єктиви. Для РІФ використовують високоапертурні об'єктиви для максимального збору флуоресцентного світла:

- планapoхроматичні об'єктиви: найкраща корекція аберацій, рівномірність поля;
- високі числові апертури (NA): 40x/0.75, 63x/1.4, 100x/1.4 (масляна імерсія);
- спеціальні флуоресцентні об'єктиви з мінімальною автофлуоресценцією.

Критерії оцінки та інтерпретації результатів

Позитивний результат:

1. Яскраве специфічне світіння відповідного кольору (зелене для FITC (Флуоресцеїн ізотіоціанат), червоне для TRITC (ізотіоціанат тетраметилпродаміну)).

2. Світіння локалізоване у відповідних структурах (цитоплазма, ядро, мембрана, включення).

3. Чіткі контури флуоресцентних структур.

4. Відсутність або мінімальне фонове світіння.

5. Характерна морфологія для даного збудника (наприклад, цитоплазматичні включення при сказі).

Інтенсивність флуоресценції оцінюють напівкількісно:

- (-) немає флуоресценції
- (+) слабка флуоресценція, видима тільки при великому збільшенні
- (++) помірна флуоресценція, чітко видима
- (+++) яскрава флуоресценція, видима при малому збільшенні
- (++++) дуже яскрава флуоресценція

Негативний результат:

1. Повна відсутність специфічного світіння.

2. Можлива слабка неспецифічна автофлуоресценція тканини (жовтувато-зелене дифузне світіння).

3. Контрольні (негативні та позитивні) препарати повинні показувати очікувані результати.

Артефакти та неспецифічне світіння

Автофлуоресценція: природна флуоресценція деяких тканинних компонентів. Еритроцити (червона автофлуоресценція), колаген та еластин (синьо-зелена автофлуоресценція), ліпофусцин (жовто-коричнева автофлуоресценція), кератин (зелена автофлуоресценція). Зменшення: використовувати червоні флуорохроми (менша автофлуоресценція), обробка Суданом чорним або трипановим синім для гасіння автофлуоресценції.

Неспецифічне зв'язування: зв'язування антитіл з Fc-рецепторами, зв'язування з колагеном або іншими фібрилярними білками, зв'язування з ендogenousними імуноглобулінами у тканині. Зменшення: ретельне блокування (BSA, нормальна сироватка), використання Fab-фрагментів замість цільних антитіл, блокування Fc-рецепторів.

Преципітати барвника: агрегати флуорохрому, видимі як яскраві крапки неправильної форми. Запобігання: центрифугувати розчини антитіл перед використанням, фільтрувати через 0,22 мкм фільтр.

Пил та бруд на препараті: видимі як темні плями або яскраві точки на фоні. Запобігання: працювати в чистих умовах, використовувати чисті скельця, закривати препарати під час інкубацій.

3.4. Реакції преципітації та аглютинації

Реакції преципітації та аглютинації належать до класичних серологічних методів, які базуються на видимому утворенні імунних комплексів при взаємодії антигену з відповідними антитілами. Ці реакції є одними з найстаріших імунологічних методів, проте завдяки простоті виконання, доступності та інформативності вони продовжують широко використовуватися в сучасній ветеринарній діагностиці, особливо в умовах обмеженого доступу до складного обладнання.

Відмінність між преципітацією та аглютинацією полягає у фізичному стані антигену: преципітація відбувається з розчинними антигенами і призводить до утворення нерозчинних преципітатів, тоді як аглютинація включає корпускулярні (частинкові) антигени, які при зв'язуванні з антитілами утворюють видимі агрегати (аглютинати). Обидва типи реакцій підкоряються загальним імунологічним закономірностям та вимагають

оптимального співвідношення антигену та антитіла для максимального прояву реакції.

Історичний розвиток методів преципітації та аглютинації. Реакція преципітації була вперше описана у 1897 році Rudolf Kraus, австрійським бактеріологом, який виявив утворення преципітату при змішуванні сироватки імунізованих тварин з фільтратом культури відповідних бактерій. Це відкриття заклало основу серопреципітації та продемонструвало специфічність імунної відповіді на розчинні антигени.

Реакція аглютинації була незалежно відкрита ще раніше, у 1896 році, одразу двома дослідниками: Gruber та Durham, які описали аглютинацію бактерій під дією специфічних антисироваток. У тому ж році Georges Widal застосував реакцію аглютинації для діагностики черевного тифу, розробивши тест, який використовується досі (реакція Відаля). Це стало першим клінічним застосуванням серологічної діагностики в медицині.

1900-1920-ті роки ознаменувалися бурхливим розвитком серологічних методів: 1901 р. – Karl Landsteiner відкрив групи крові, використовуючи реакцію аглютинації еритроцитів (це відкриття принесло йому Нобелівську премію в 1930 році). У 1906 р. – August von Wassermann розробив реакцію зв'язування комплекменту для діагностики сифілісу. У 1917 р. – Felix d'Hérelle описав феномен інгібування аглютинації фагами. В 1920-ті – розвиток методів кількісної преципітації (Michael Heidelberger та Oswald Avery).

Револьюційним моментом стала розробка методів дифузії в гелі. У 1946 році Jacques Oudin у Франції розробив метод простої радіальної імунодифузії. У 1948 році Örjan Ouchterlony у Швеції незалежно розробив метод подвійної імунодифузії в агарі, який дозволяв виявляти множинні антигени та оцінювати їх ідентичність. Ці методи стали основою сучасної імунодифузії.

1950-1960-ті роки принесли подальші удосконалення: у 1953 р. – Pierre Grabar та Curtis Williams розробили імуноелектрофорез, поєднавши електрофорез з імунодифузією. У 1963 р. – Giovanni Mancini розробив радіальну імунодифузію для кількісного визначення імуноглобулінів. В 1965 р. – Coombs та Mourant розробили непрямий антиглобуліновий тест. В 1960-ті – впровадження пасивної гемаглютинації (РНГА) для виявлення антитіл до розчинних антигенів.

У ветеринарній медицині реакції преципітації та аглютинації почали широко застосовуватися з 1920-1930-х років для діагностики бактеріальних інфекцій (бруцельоз, сальмонельоз, пуллороз птиці). Реакція Райта для діагностики бруцельозу, розроблена в 1897 році, залишається офіційно визнаним методом діагностики в багатьох країнах досі. Реакція

кільцепреципітації в молоці для діагностики бруцельозу ВРХ була стандартизована в 1930-х роках і використовувалася в масових програмах контролю.

Сучасний етап характеризується поєднанням класичних методів з новими технологіями: автоматизація зчитування та інтерпретації реакцій аглютинації, використання латексних частинок з контрольованим розміром та поверхневими властивостями, розробка швидких форматів для польової діагностики, інтеграція з цифровою обробкою зображень. Хоча методи преципітації та аглютинації значною мірою витіснені більш чутливими методами (ІФА, ПЛР), вони продовжують використовуватися завдяки простоті, низькій вартості та можливості виконання без складного обладнання.

3.4.1. Імунодифузія в агарі

Імунодифузія в агарі (гелева преципітація) базується на дифузії антигену та антитіла через пористе середовище (агаровий гель), де вони зустрічаються та утворюють видимі лінії преципітації в зоні оптимального співвідношення. Метод дозволяє виявляти та характеризувати множинні антигени в складних сумішах, оцінювати їх ідентичність або відмінність, а також проводити напівкількісну оцінку концентрації антигенів або антитіл.

Принципи гелевої преципітації

Закон оптимальних пропорцій (зона еквівалентності). Видима преципітація відбувається тільки при оптимальному співвідношенні антигену та антитіла. При надлишку антигену (зона постантигенного інгібування) або надлишку антитіла (зона проантитільного інгібування) преципітація не відбувається або преципітат розчиняється. Тільки в зоні еквівалентності, де співвідношення антигену та антитіла оптимальне, утворюються великі нерозчинні імунні комплекси, видимі як лінії преципітації.

Механізм дифузії в агарі. Агаровий гель (зазвичай 0,8-1,5%) створює тривимірну сітку полісахаридних волокон з порами розміром 100-200 нм, через які вільно дифундують молекули білків. Швидкість дифузії залежить від: розміру молекули (менші молекули дифундують швидше), концентрації (вищі концентрації створюють крутіший градієнт), температури (вищі температури прискорюють дифузію), характеристик гелю (щільність, пористість).

Антиген та антитіло дифундують назустріч один одному від своїх джерел (лунок). Коли вони зустрічаються в оптимальному співвідношенні, утворюється лінія преципітації, яка стає видимою як біла

непрозора смуга в гелі. Положення лінії преципітації визначається відносними концентраціями та коефіцієнтами дифузії антигену та антитіла (Рисунок 3.5).

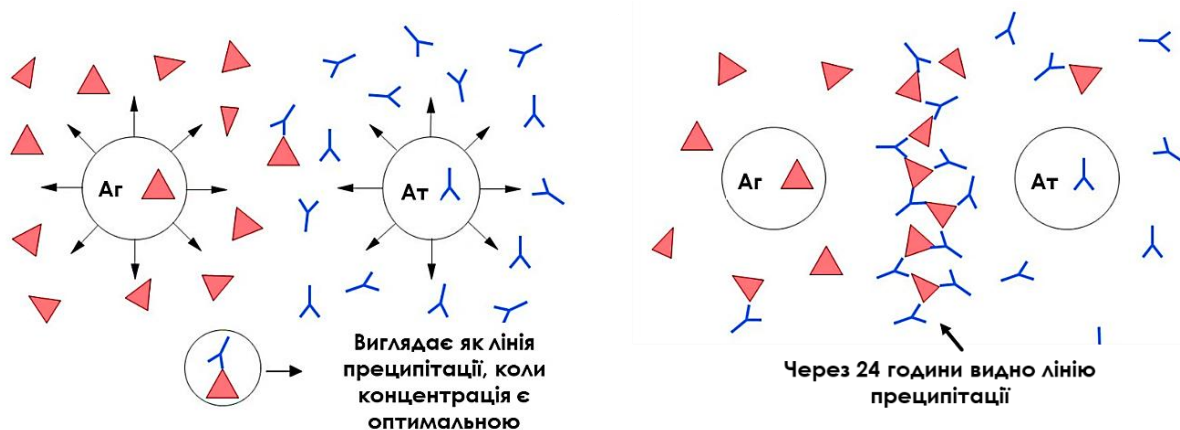


Рис. 3.5. Схематична ілюстрація дифузії антитіла (Ат) та антигену (Аг) та утворення лінії преципітації в агаровому гелі

Подвійна радіальна імунодифузія за Оухтерлоні (РДП)

Принцип методу. Антиген та антитіло розміщують у окремих лунках, вирізаних в агаровому гелі на певній відстані одна від одної. Обидві речовини дифундують радіально у всіх напрямках від своїх лунок. У точці зустрічання, де концентрації оптимальні, утворюється лінія преципітації між лунками.

Методика виконання:

1. Підготовка агару: розчинити 1-1,5% агару в фосфатно-сольовому буфері (PBS, рН 7,2-7,4), нагріти до розчинення, охолодити до 55-60°C.
2. Заливка планшетів: залити агар у чашки Петрі (10-15 мл на чашку діаметром 90 мм) або на скляні пластинки, товщина шару 2-3 мм, дати застигнути при кімнатній температурі.
3. Вирізування лунок: за допомогою шаблону або спеціального пробійника вирізати лунки діаметром 3-5 мм, типова схема: центральна лунка для антисироватки, оточена 6 периферичними лунками для антигенів на відстані 5-7 мм, видалити агар з лунок (Рисунок 3.6).

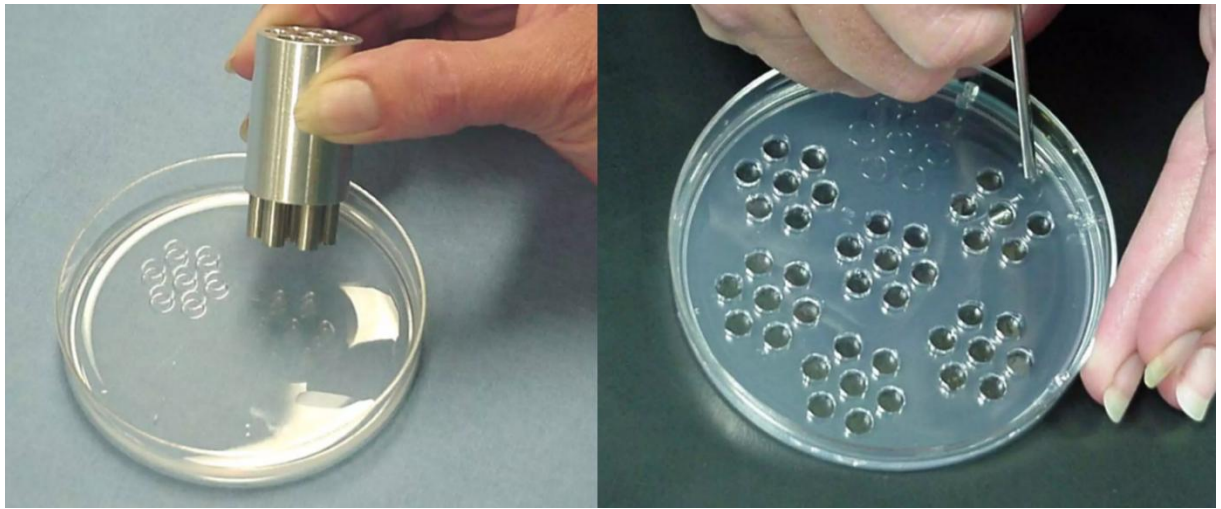


Рис. 3.6. Формування лунок в агаровому гелі

4. Заповнення лунок: внести антисироватку в центральну лунку (20-50 мкл), внести досліджувані антигени та контролі в периферичні лунки, уникати переповнення та перетікання між лунками. Правильні та помилкові прийоми заповнення лунок в агаровому гелі показані на Рисунку 3.7.

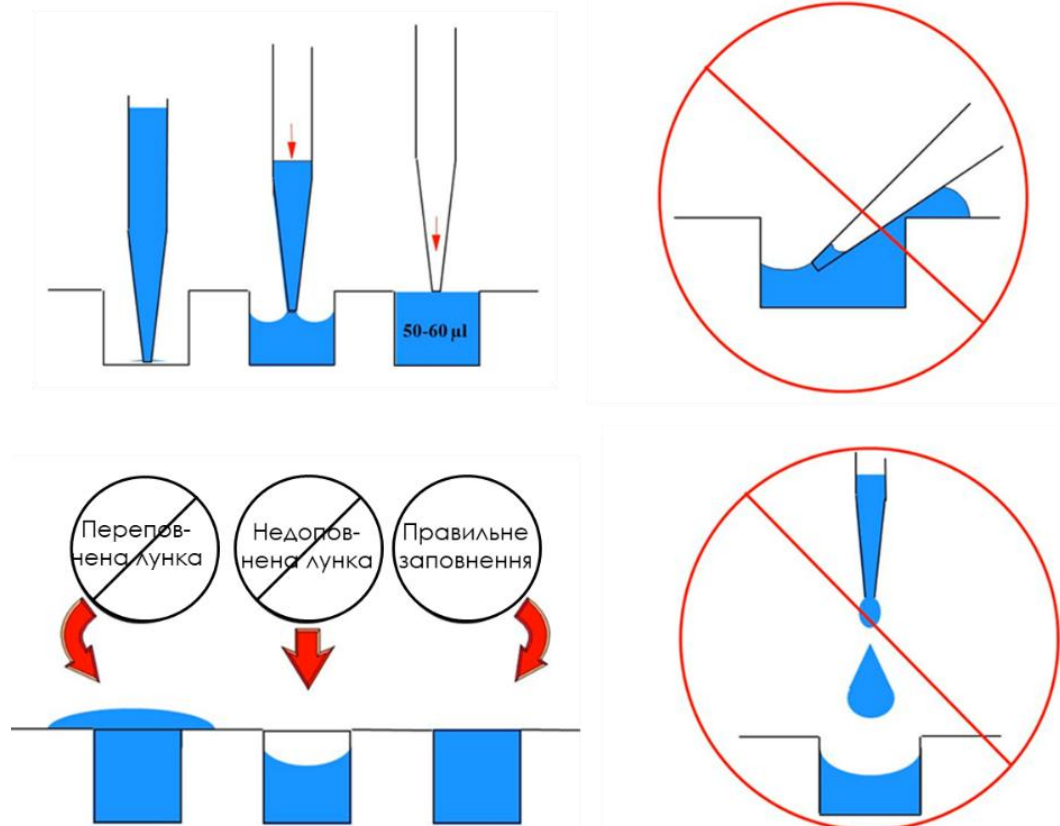


Рис. 3.7. Правильне та неправильне внесення реагентів у лунки

5. Інкубація: інкубувати в вологій камері при кімнатній температурі або 37°C протягом 24-72 годин, регулярно перевіряти появу ліній преципітації.

6. Промивання (опційно): після завершення реакції промити гель фізіологічним розчином для видалення нев'язаних білків, висушити гель для підвищення контрастності ліній.

7. Фарбування: зафарбувати білок барвниками (Кумасі синій, амідочорний) для постійного зберігання.

Інтерпретація результатів (типи ліній преципітації):

Реакція ідентичності (позитивна реакція): відбувається імунопреципітація внаслідок зв'язування антигену (Аг, центральна лунка) і антитіл у позитивних контролях (К+) і зразках (1, 2 і 3). На Рисунку 3.8 три зразки (1, 2 і 3) є позитивними, тому в усіх лунках можна побачити лінію, яка виглядає як шестикутник.

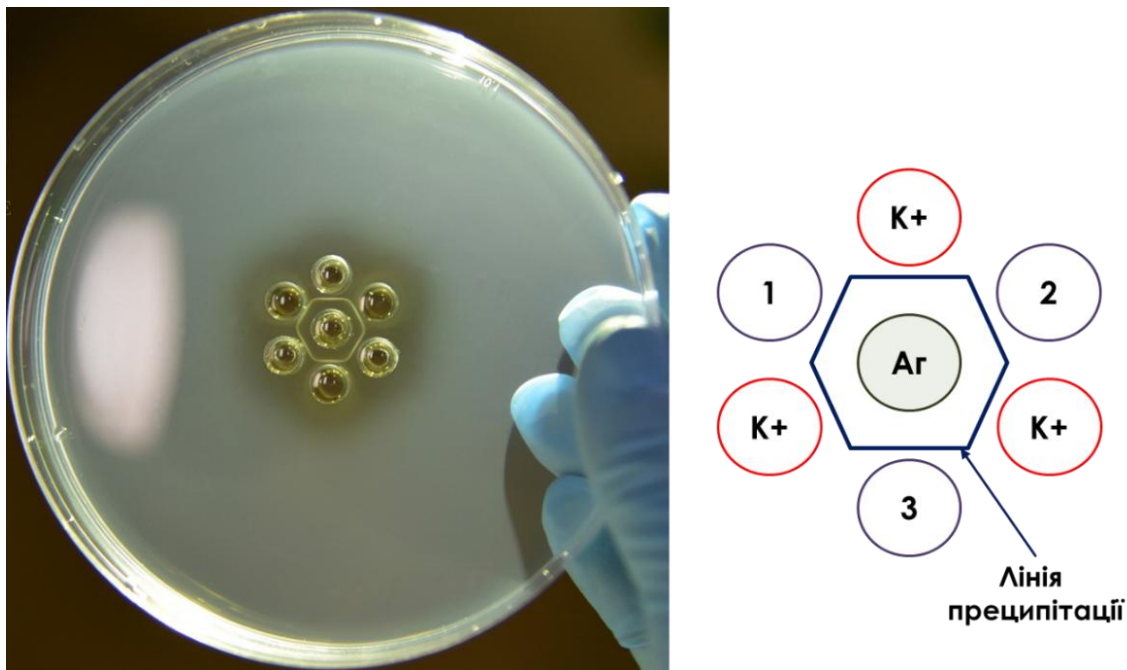


Рис. 3.8. Позитивний результат реакції імунопреципітації в агаровому гелі.

Примітки: Аг – антиген, центральна лунка; К+ – позитивні контрольні сироватки; 1, 2 і 3 – зразки сироватки, що досліджуються

Реакція неідентичності (негативна реакція): відбувається імунопреципітація внаслідок зв'язування антигену (центральна лунка) і антитіла у позитивних контролях (К+), але імунопреципітації не відбувається у зразках (1, 2 і 3). На Рисунку 3.9 три зразки (1, 2 і 3) є негативними, тому лінію можна побачити лише в лунках, що містять позитивні контролі, що створює вигляд трикутника.

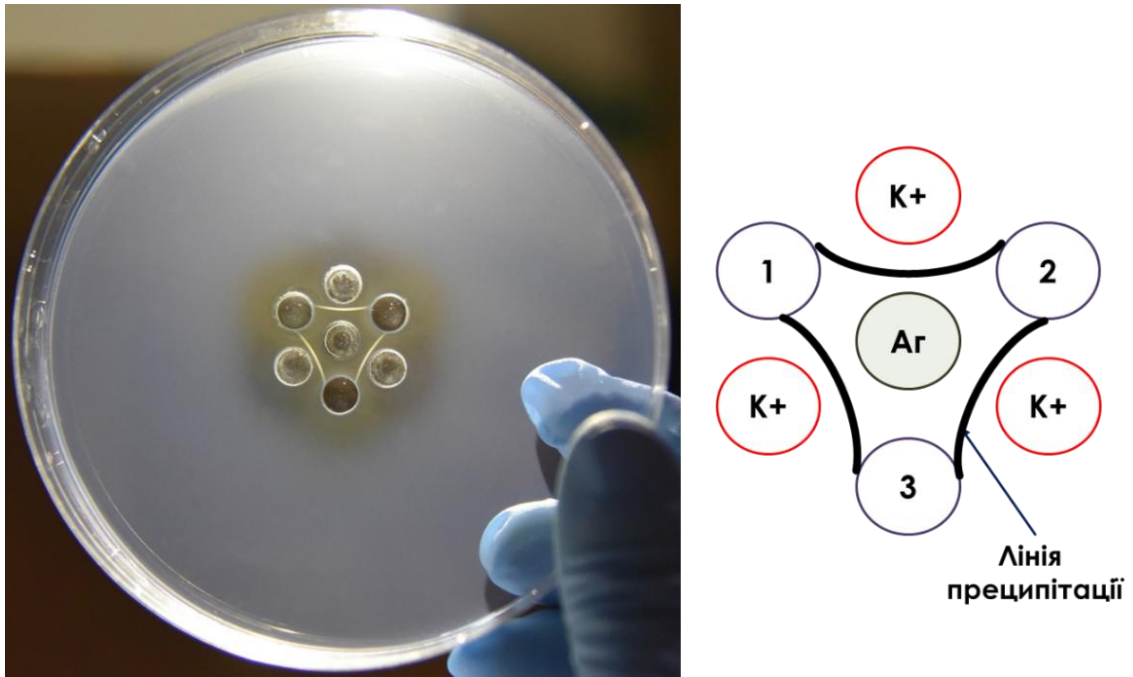


Рис. 3.9. Негативний результат реакції імунопреципітації в агаровому гелі.

Примітки: Ag – антиген, центральна лунка; K+ – позитивні контрольні сироватки; 1, 2 і 3 – зразки сироватки, що досліджуються

Неспецифічні реакції імунопреципітації в агаровому гелі можуть виникати внаслідок порушення оптимального співвідношення Ag–Ат, недостатньої чистоти реагентів, дифузії неспоріднених білкових компонентів або фізико-хімічних особливостей гелю. Такі реакції проявляються у вигляді неспецифічних ліній преципітації, їх розгалуження, викривлення, розмитості або неповного формування преципітатних дуг. У деяких випадках лінії преципітації можуть з'являтися між контрольними лунками або не досягати зони еквівалентності, що ускладнює інтерпретацію результатів дослідження. Приклади неспецифічних реакцій імунопреципітації в агаровому гелі показано на Рисунку 3.10.

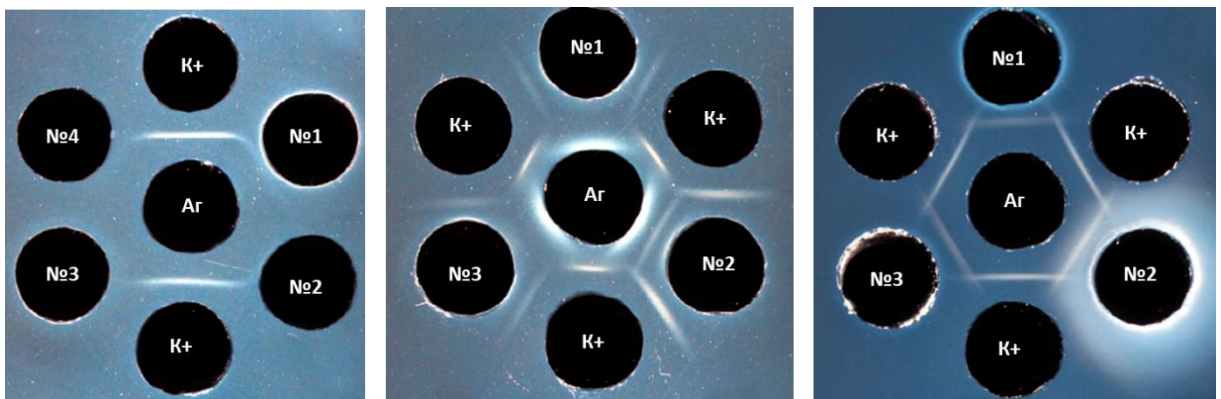


Рис. 3.10. Приклади неспецифічних ліній преципітації та неповне формування лінії преципітації в агаровому гелі

Застосування РДП у ветеринарії. Діагностика інфекційної анемії коней: золотий стандарт діагностики, виявлення антитіл до вірусу ІАК в сироватці коней. Метод затверджений Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (WOAH) та є обов'язковим для міжнародного переміщення коней. Тест виконується в атестованих лабораторіях, результат готовий за 24-48 годин. Діагностика мікоплазмозів: виявлення антитіл до *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* у птиці, диференціація різних серотипів мікоплазм. Типування мікроорганізмів: визначення серологічної ідентичності бактеріальних або вірусних ізолятів, вивчення антигенних відносин між штамми. Контроль якості біопрепаратів: перевірка ідентичності антигенів у вакцинах, виявлення домішок або контамінантів.

Проста (одинарна) радіальна імунодифузія за Манчіні (РІД)

Принцип методу. Антитіла рівномірно розподілені в агаровому гелі. Антиген вносять у лунку та він дифундує радіально в усіх напрямках. По мірі дифузії концентрація антигену знижується. На певній відстані від лунки досягається зона еквівалентності, де утворюється кільце преципітації. Діаметр кільця пропорційний концентрації антигену в зразку.

Методика виконання:

1. Підготовка гелю з антитілами: розплавити 1% агар у буфері, охолодити до 55°C, додати специфічні антисироватки в певній концентрації (зазвичай 1-5%), ретельно перемішати, залити в планшети, дати застигнути
 2. Вирізування лунок: вирізати лунки діаметром 2-3 мм на відстані 15-20 мм одна від одної
 3. Нанесення зразків: внести досліджувані зразки антигену (5-10 мкл) у лунки, одночасно внести стандартні зразки відомої концентрації для побудови калібрувальної кривої
 4. Інкубація: інкубувати у вологій камері при кімнатній температурі 24-72 години, кільця преципітації з'являються та збільшуються з часом
 5. Вимірювання: після завершення дифузії (коли діаметри кілець перестають збільшуватися) виміряти діаметр кожного кільця, використовувати штангенциркуль або лінійку
 6. Розрахунок концентрації: побудувати калібрувальну криву (діаметр² від концентрації стандартів), визначити концентрацію антигену в досліджуваних зразках за калібрувальною кривою
- Існує лінійна залежність між квадратом діаметра кільця преципітації (d^2) та концентрацією антигену (C).

Розраховується як:

$$d^2 = K \times C + b,$$

де K – константа, що залежить від умов реакції, b – вільний член. Ця залежність є основою для кількісного визначення.

Застосування РІД у ветеринарії. Кількісне визначення імуноглобулінів: визначення концентрації IgG, IgM, IgA у сироватці крові тварин, оцінка пасивного переносу материнського імунітету у новонароджених (особливо важливо для телят, лоша́т, поросят), діагностика імунодефіцитів. Кількісне визначення білків сироватки: визначення альбуміну, трансферину, церулоплазміну, оцінка білкового статусу тварин. *Контроль імунного статусу стад:* моніторинг рівня специфічних антитіл у вакцинованих тварин, оцінка колективного імунітету. *Контроль якості молозива:* визначення концентрації IgG у молозиві корів для забезпечення адекватного пасивного імунітету телят. Мінімальна прийнятна концентрація IgG у молозиві – 50 г/л.

3.4.2. Імуноелектрофорез

Імуноелектрофорез (ІЕФ) – це комбінований метод, який поєднує електрофоретичне розділення білків за зарядом та наступне імунологічне виявлення окремих компонентів за допомогою імунодифузії. Метод дозволяє аналізувати складні суміші антигенів, виявляти та ідентифікувати окремі компоненти, оцінювати їх імунологічну ідентичність та виявляти аномалії у складі білків сироватки.

Принцип методу імуноелектрофорезу

Метод виконується у два етапи:

Етап 1. Електрофоретичне розділення: суміш білків (зазвичай сироватка крові) вносять у лунку в агаровому гелі, прикладають електричне поле (постійний струм), білки мігрують в електричному полі відповідно до їх заряду та молекулярної маси, протягом 30-90 хвилин білки розділяються на окремі фракції вздовж гелю. Альбуміни (найбільш негативно заряджені) мігрують найдалі до анода, глобуліни залишаються ближче до старту через менший негативний заряд або позитивний заряд.

Етап 2. Імунодифузія: після електрофорезу вирізають жолобок (траншею) паралельно напрямку електрофорезу, заповнюють жолобок антисироваткою проти білків сироватки, антисироватка дифундує назустріч розділеним білковим фракціям, у місцях зустрічання антигенів з відповідними антитілами утворюються дугоподібні лінії преципітації.

Кожна лінія відповідає окремому білку або групі споріднених білків. Положення, форма та інтенсивність ліній дають інформацію про склад та концентрацію білків.

Методика виконання імуноелектрофорезу:

1. Підготовка агарових пластин: розплавити 1% агар у буфері (барбітуровий або веронал-ацетатний, рН 8,6), залити на скляні пластинки (85×120 мм) товщиною 1-2 мм, дати застигнути

2. Вирізування лунок для зразків: вирізати лунки діаметром 2-3 мм на відстані 15-20 мм від краю пластинки, зазвичай 4-6 лунок на одній пластинці

3. Нанесення зразків: внести сироватку або інші білкові зразки (5-10 мкл) у лунки

4. Електрофорез: помістити пластинку в електрофоретичну камеру, з'єднати гель з буферними резервуарами за допомогою фільтрувального паперу, прикласти напругу 10-15 В/см протягом 45-90 хвилин, спостерігати за міграцією барвника-маркера (бромфеноловий синій)

5. Вирізування жолобків: після завершення електрофорезу вирізати жолобок шириною 2-3 мм паралельно напрямку електрофорезу, відстань від лунки до жолобка 3-5 мм, видалити агар з жолобка

6. Заповнення жолобка антисироваткою: заповнити жолобок антисироваткою проти білків сироватки (100-200 мкл), уникати утворення бульбашок

7. Інкубація: інкубувати у вологій камері при кімнатній температурі 24-48 годин, лінії преципітації з'являються протягом перших 12-24 годин

8. Промивання та фарбування: промити гель фізіологічним розчином, висушити, зафарбувати білок (Кумасі синій, амідочорний)

Інтерпретація результатів. Нормальна сироватка дає характерну картину з множинними дугоподібними лініями преципітації, що відповідають різним білковим фракціям:

- Альбумін – дуга найближче до анода, найінтенсивніша;
- α_1 -глобуліни – слабка дуга між альбуміном та α_2 ;
- α_2 -глобуліни – чітка дуга (гаптоглобін, α_2 -макроглобулін);
- β -глобуліни – дуга середньої інтенсивності (трансферин, С3 комплементу);
- γ -глобуліни – широка дуга найближче до катода (імуноглобуліни).

Патологічні зміни:

Моноклональна гаммапатія: вузька інтенсивна дуга в зоні γ -глобулінів (множинна мієлома, плазмоцитома).

Гіпогаммаглобулінемія: відсутність або зменшення інтенсивності дуги γ -глобулінів (імунодефіцити).

Гіпоальбумінемія: зменшення або відсутність дуги альбуміну (хвороби печінки, нефротичний синдром).

Підвищення білків гострої фази: посилення дуг α_1 та α_2 -глобулінів (гострі запальні процеси).

Застосування імуоелектрофорезу у ветеринарії:

- діагностика парaprотейнемії у дрібних тварин (лімфоми, множинна мієлома);
- оцінка імунного статусу (виявлення дефіциту імуноглобулінів);
- дослідження білкового складу біологічних рідин (сироватка, ліквор, синовіальна рідина);
- контроль якості біопрепаратів та діагностикумів;
- наукові дослідження білкового складу різних видів тварин.

3.4.3. Реакції аглютинації

Реакції аглютинації базуються на здатності антитіл зв'язувати корпускулярні антигени (бактерії, еритроцити, латексні частинки) у видимі агрегати (аглютинати). Це одні з найстаріших та найпростіших серологічних методів, які продовжують широко використовуватися завдяки швидкості виконання, простоті інтерпретації та можливості кількісної оцінки через титрування.

Принципи реакції аглютинації

Механізм утворення аглютинатів. Аглютинація відбувається у два етапи:

- 1. Специфічне зв'язування (адсорбція):** антитіла зв'язуються з антигенними детермінантами на поверхні корпускул. Цей етап відбувається дуже швидко (хвилини) і є специфічним. Залежить від афінності антитіл, щільності антигенів на поверхні, температури (зазвичай 37°C).
- 2. Утворення агрегатів (решітки):** молекули антитіл (особливо IgM з 10 центрами зв'язування) утворюють містки між різними корпускулами. Формуються тривимірні решітки з множинних перехресних зв'язків. Агрегати стають видимими неозброєним оком або під малим збільшенням мікроскопа. Цей етап повільніший (30-120 хвилин) і залежить від фізико-хімічних умов.

Фактори, що впливають на аглютинацію:

Клас імуноглобулінів: IgM (пентамер) найефективніший аглютинатор завдяки 10 центрам зв'язування та великому розміру, IgG (мономер) менш ефективний, потребує вищих концентрацій, IgA зазвичай не викликає видимої аглютинації.

Іонна сила середовища: високі концентрації солей зменшують електростатичне відштовхування між частинками, полегшуючи агрегацію. Оптимум зазвичай при фізіологічній концентрації солей (0,9% NaCl).

pH середовища: оптимальний pH для більшості реакцій аглютинації 6,5-7,5. Відхилення від оптимуму може змінювати заряд частинок та антитіл.

Температура: більшість реакцій оптимальні при 37°C. Деякі «холодові» антитіла краще аглютинують при 4-15°C.

Концентрація корпускул: занадто висока концентрація може давати феномен прозони (інгібування аглютинації через надлишок антигену). Оптимум зазвичай 2-5% суспензія для бактерій, 0,5-2% для еритроцитів.

При поставці реакції аглютинації варто мати на увазі можливість прояву ефекту прозони: при надлишку антитіл аглютинація відсутня, а при розведенні сироватки – з'являється; надлишок антитіл виключає утворення аглютинатів, як на Рисунку 3.11 показано Ряд 6, розведення $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$.

Зразок №	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	K+	K-	титр
1	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	64
2	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	↓ 2
5	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
6	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	●	○	128
7	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	4

Еквімолярна зона

Рис. 3.11. Схема кількісного тесту гемаглютинації

У зоні еквівалентності відбувається правильна пропорція антитіла до антигену, в результаті чого утворюється видимий шар, утворений зшиванням комплексу Аг-Ат.

Ефект прозони. При дослідженні сироватки з високим титром антитіл, наприклад, від пацієнта з гострим бруцельозом, аглютинація може спостерігатися лише у високих розведеннях (тобто понад 1 до 8 і до 1 до 128). Це називається прозоною реакцією або феноменом. Вважається, що це пов'язано з високим рівнем Ig A (блокуючих антитіл), неспецифічними інгібіторними факторами або надлишком антитіл. Відповідне розведення сироватки може вирішити цю проблему.

Ефект прозони і пост-зони в реакції аглютинації

Розведення сироватки крові	Результат реакції аглютинації	Ефект співвідношення Ат-Аг
1:2	-	Прозона
1:4	-	Прозона
1:8	++	Еквімолярна зона
1:16	++++	Еквімолярна зона
1:32	++++	Еквімолярна зона
1:64	++++	Еквімолярна зона
1:128	++	Еквімолярна зона
1:256	-	Пост-зона

Примітка: при дослідженні сироватки на антитіла до видів бруцел також можливо, що антитіла класу Ig G, присутні в сироватці, з'єднуються з антигеном, але не викликають видимої аглютинації. Приєднання антитіла до антигену можна виявити за допомогою антивидового глобуліну, який аглютинуює комплекси антитіло-антиген.

Пряма реакція аглютинації (РА). Принцип: антитіла безпосередньо аглютинують корпускули, що несуть відповідний антиген на своїй поверхні (бактерії, найпростіші, еритроцити).

Існує два основні варіанти постановки:

1. Якісна реакція на склі:

Методика: на чисте знежирене скло нанести краплю досліджуваної сироватки (20-30 мкл), поруч нанести краплю суспензії антигену (бактерій, 2-5%), змішати краплі скляною паличкою, обережно похитувати скло протягом 2-5 хвилин, спостерігати за появою аглютинації

Інтерпретація: позитивна реакція – поява видимих пластівців або зерен аглютинації, освітлення рідини; негативна реакція – рівномірна каламутна суспензія без аглютинації

Застосування: швидке орієнтовне дослідження, попередня оцінка перед розгорнутою реакцією, ідентифікація бактеріальних культур

2. Розгорнута (кількісна) реакція в пробірках:

Методика:

- приготувати ряд дворазових розведень сироватки: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 і т.д.
- у кожну пробірку внести по 0,5 мл розведення сироватки
- додати по 0,5 мл суспензії антигену (2-5% для бактерій)
- ретельно перемішати
- інкубувати при 37°C протягом 2-18 годин (залежно від виду мікроорганізму)

- паралельно поставити контролі: позитивний (відома позитивна сироватка), негативний (негативна сироватка), контроль антигену (фізрозчин + антиген)

Облік результатів (візуальна оцінка):

- +++ або ++++ (різко позитивна) – великі пластівці аглютинату, повне освітлення рідини
- ++ (позитивна) – середні пластівці, значне освітлення
- + (слабко позитивна) – дрібні пластівці, часткове освітлення
- ± (сумнівна) – ледь помітна зернистість
- (негативна) – рівномірна каламутність без аглютинації

Титр аглютинації – це найбільше розведення сироватки, при якому ще спостерігається позитивна реакція (зазвичай ++). Наприклад, титр 1:400 означає, що аглютинація спостерігається до розведення 1:400 включно.

Діагностичне значення. Кожна інфекція має свій діагностичний титр – мінімальне розведення, при якому результат вважається діагностично значущим. *Наприклад:*

- Бруцельоз ВРХ (реакція Райта) – діагностичний титр 1:100 (100 МО)
- Пуллороз птиці – діагностичний титр 1:50-1:100
- Сальмонельоз – титр >1:200 вважається позитивним

Важливо: для діагностики гострих інфекцій рекомендується досліджувати парні сироватки (гостра фаза та через 2-3 тижні). 4-кратне і більше наростання титру вважається підтвердженням активної інфекції.

Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА)

Принцип методу: РНГА використовує еритроцити як носії для розчинних антигенів або антитіл. Антиген або антитіло хімічно адсорбуються або ковалентно зв'язуються з поверхнею еритроцитів. Сенсibilізовані еритроцити набувають здатності аглютинуватися при додаванні відповідних антитіл або антигенів. Це значно підвищує чутливість методу порівняно з прямою аглютинацією.

Методи сенсibilізації еритроцитів:

Адсорбційний метод: найпростіший, базується на фізичній адсорбції антигену на поверхні еритроцитів. Підходить для полісахаридних антигенів та деяких білків. Процес: інкубація еритроцитів з антигеном при 37°C протягом 1-2 годин.

Таніновий метод: еритроцити попередньо оброблені таніном (дубильна кислота), що підвищує їх здатність адсорбувати білки. Процес: обробка

еритроцитів 1:20000 розчином таніну 10 хв при 37°C, промивання, інкубація з антигеном 30-60 хв.

Хлоридний метод (CrCl_3): використання хлориду хрому для ковалентного зв'язування білкових антигенів. Найстабільніші препарати, можливе тривале зберігання.

Глутаральдегідний метод: ковалентне зв'язування через альдегідні групи. Дуже стабільні препарати.

Методика виконання РНГА (мікрометод у планшетах):

1. Використовують спеціальні 96-лункові планшети з U- або V-подібним дном.
2. Готують дворазові розведення досліджуваної сироватки (25 мкл на лунку): 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 і т.д.
3. У кожен лунку додають 25 мкл 1% суспензії сенсibiliзованих еритроцитів
4. Обережно перемішують шляхом легкого постукування.
5. Інкують при кімнатній температурі 45-120 хвилин (залежно від протоколу).
6. Зберігають планшети нерухомо на горизонтальній поверхні. Принцип РНГА показано на Рисунку 3.12.

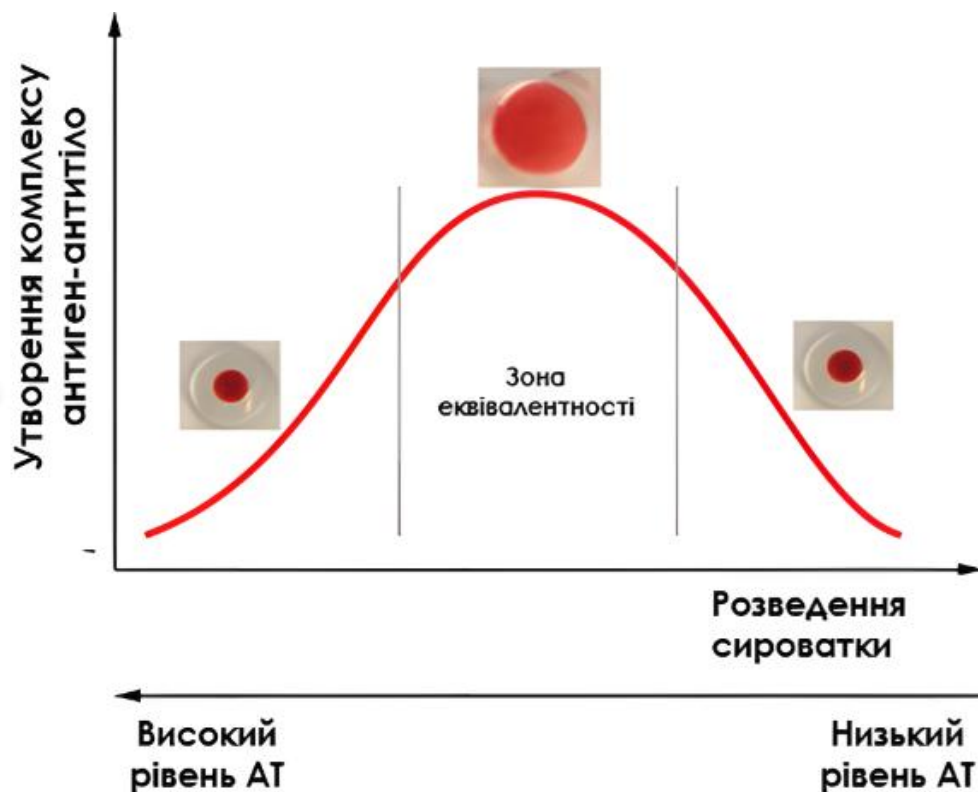


Рис. 3.12. Принцип непрямої (пасивної) реакції гемаглютинації

Облік результатів:

Позитивна реакція: еритроцити рівномірно вкривають дно лунки у вигляді «парасольки» або «килимка». Це відбувається через утворення решітки з аглютинованих еритроцитів, яка перешкоджає їх осіданню.

Негативна реакція: еритроцити осідають на дно у вигляді компактного «гудзика» або «кільця» (залежно від форми дна лунки). Неаглютиновані еритроцити скочуються вниз під дією гравітації (Рисунок 3.13).

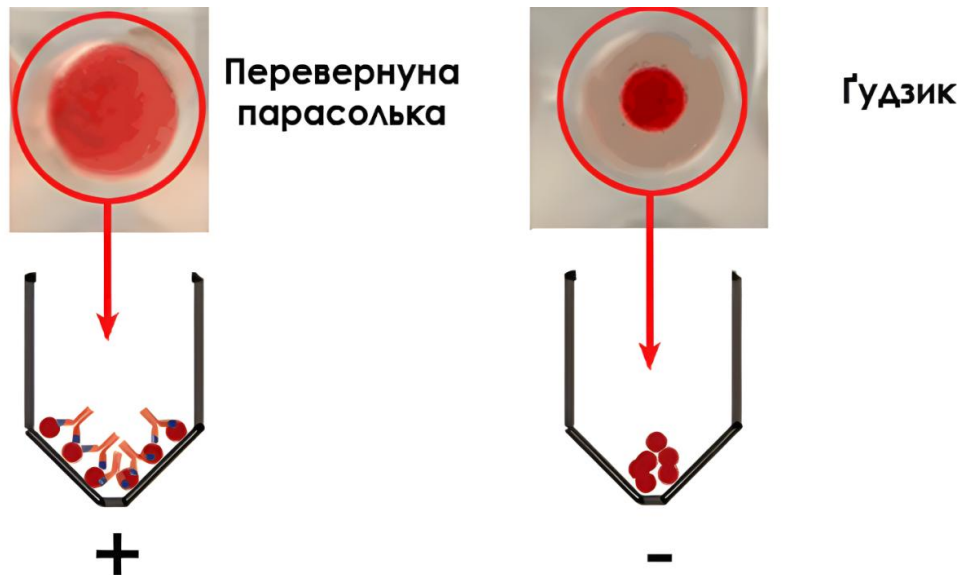


Рис. 3.13. Ілюстрація позитивної (+) «переввернута парасолька» та негативної (-) «гудзик» реакції пасивної гемаглютинації

Сумнівна реакція: часткове осідання з нерівномірним розподілом. Такі результати слід повторити.

Переваги РНГА:

- висока чутливість: у 100-1000 разів чутливіша за пряму аглютинацію
- універсальність: можна виявляти антитіла до будь-яких розчинних антигенів
- економічність: мікрометод потребує малих об'ємів реагентів
- швидкість: результат за 1-2 години
- простота обліку: візуальна оцінка без приладів

Застосування РНГА у ветеринарії: токсоплазмоз (виявлення антитіл до *Toxoplasma gondii*); трихінельоз (антитіла до *Trichinella spiralis*); лептоспіроз; вірусні інфекції (грип, парагрип, інфекційний бронхіт птиці); мікоплазмози птиці

Латекс-аглютинація

Принцип методу: замість еритроцитів використовуються синтетичні латексні частинки (полістирол) діаметром 0,8-3 мкм. Латексні частинки мають ряд переваг: хімічна інертність, можливість стандартизації розміру,

стабільність при зберіганні, легкість сенсibilізації, відсутність біологічної варіабельності.

Антигени або антитіла адсорбуються на поверхні латексних частинок фізичним шляхом або через ковалентне зв'язування. При додаванні зразка, що містить відповідний аналіт, відбувається аглютинація латексних частинок, видима як утворення конгломератів.

Методика виконання (експрес-тест на картці):

1. На чисту картку або скло нанести краплю досліджуваного зразка (20-50 мкл)
2. Додати краплю суспензії сенсibilізованих латексних частинок
3. Ретельно перемішати скляною паличкою
4. Обережно похитувати картку протягом 2-5 хвилин
5. Спостерігати за появою аглютинації на білому фоні

Інтерпретація: позитивна – поява видимих білих конгломератів (аглютинатів), освітлення суспензії; негативна – рівномірна каламутна суспензія без аглютинації

Застосування латекс-аглютинації у ветеринарії: швидка діагностика маститів (виявлення *Staphylococcus aureus* безпосередньо в молоці); експрес-діагностика інфекційних захворювань (парвовірус собак, коронавірус, криптоспоридіоз); виявлення С-реактивного білка (маркер запалення); ідентифікація бактеріальних культур (стрептококи, стафілококи); виявлення ендотоксинів

Реакції преципітації та аглютинації продовжують залишатися важливими методами ветеринарної діагностики. Їхня простота, доступність та можливість виконання без складного обладнання роблять їх незамінними в умовах обмежених ресурсів та первинній ветеринарній ланці.

Кожен метод має свою оптимальну нішу застосування: імунодифузія незамінна для аналізу складних антигенних сумішей та вивчення антигенних відносин, реакція аглютинації залишається основним методом діагностики багатьох бактеріальних інфекцій, РНГА забезпечує високу чутливість при виявленні антитіл до розчинних антигенів, латекс-аглютинація дозволяє проводити швидку діагностику безпосередньо біля тварини.

Розуміння принципів цих методів, їх переваг та обмежень є важливим для правильного вибору діагностичного підходу та коректної інтерпретації результатів у ветеринарній практиці.

3.5. Реакція зв'язування комплементу

Реакція зв'язування комплементу (РЗК) є класичним високоспецифічним серологічним методом, який базується на здатності комплексу антиген-антитіло активувати та зв'язувати комплемент. Незважаючи на технічну складність виконання та довгу тривалість аналізу, РЗК залишається референтним методом для діагностики ряду інфекційних захворювань завдяки високій специфічності та можливості виявлення як антитіл, так і антигенів. Метод офіційно визнаний Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (WOAH) для діагностики багатьох особливо небезпечних захворювань.

Унікальність РЗК полягає в тому, що це непрямая реакція: про наявність імунних комплексів судять не безпосередньо, а за витрачанням комплементу, який використовується в реакції. Для візуалізації результату застосовується спеціальна індикаторна система (гемолітична система), яка робить невидиму реакцію антиген-антитіло-комплемент видимою для спостереження. Ця складність є одночасно і недоліком (трудомісткість), і перевагою (висока специфічність через множинні етапи контролю).

Історія розвитку реакції зв'язування комплементу. Відкриття комплементу та розробка РЗК тісно пов'язані з формуванням імунології як науки. Комплемент був вперше описаний у 1889 році бельгійським бактеріологом Jules Bordet (Жуль Борде), який працював в Інституті Пастера в Парижі. Борде виявив, що сироватка крові містить термолабільний фактор, який необхідний для бактерицидної дії антитіл. Він назвав цей фактор «алексином» (від грецького *alexein* – захищати). Пізніше цей фактор був перейменований на «комплемент» Паулем Ерліхом, який розглядав його як систему, що «доповнює» (*complement*) дію антитіл.

У 1901 році Jules Bordet та його учень Octave Gengou розробили реакцію зв'язування комплементу як діагностичний метод. Вони продемонстрували, що комплекси антиген-антитіло можуть зв'язувати комплемент, і що це зв'язування можна виявити за допомогою індикаторної гемолітичної системи. Їхня оригінальна робота була опублікована в *Annales de l'Institut Pasteur* і заклала основу для широкого застосування методу.

Перше масштабне клінічне застосування РЗК відбулося в 1906 році, коли німецький бактеріолог August von Wassermann разом з Albert Neisser та Carl Bruck адаптували метод Борде-Женгу для діагностики сифілісу. Реакція Вассермана стала першим надійним лабораторним тестом для виявлення цієї хвороби і революціонізувала венерологію. Протягом наступних 70 років

(до впровадження ІФА в 1980-х) реакція Вассермана залишалася основним методом серологічної діагностики сифілісу в усьому світі.

У 1919 році Jules Bordet був нагороджений Нобелівською премією з фізіології та медицини «за відкриття в галузі імунітету», зокрема за відкриття комплементу та розробку реакції зв'язування комплементу.

У ветеринарній медицині РЗК почала активно застосовуватися з 1920-х років:

- 1920-ті роки – впровадження РЗК для діагностики збудливої хвороби коней (*Trypanosoma equiperdum*);
- 1930-ті роки – стандартизація РЗК для діагностики бруцельозу ВРХ та дрібної рогатої худоби;
- 1940-1950-ті роки – широке впровадження для діагностики класичної чуми свиней, інфекційної анемії коней;
- 1960-ті роки – розробка мікрометодів РЗК, що дозволили зменшити обсяги реагентів;
- 1970-ті роки – автоматизація окремих етапів постановки РЗК;
- із 1980-х років почалося поступове витіснення РЗК більш простими та швидкими методами (ІФА, ПЛР). Однак РЗК продовжує використовуватися як референтний метод для підтвердження позитивних результатів інших тестів, у випадках, коли потрібна максимальна специфічність, в офіційних програмах контролю та ерадикації захворювань, затверджених міжнародними організаціями.

Класифікація реакцій зв'язування комплементу

РЗК має кілька модифікацій, які відрізняються за призначенням, типом антигену та технічним виконанням. Вибір конкретного варіанту РЗК залежить від діагностичних завдань, характеристик збудника та доступних ресурсів лабораторії.

За принципом виявлення компонентів імунної реакції:

Пряма РЗК – використовується для виявлення антитіл у досліджуваній сироватці. У цьому варіанті відомий (діагностичний) антиген змішується з досліджуваною сироваткою та комплементом. Якщо в сироватці присутні специфічні антитіла до даного антигену, утворюється імунний комплекс, який зв'язує комплемент. Це найпоширеніший варіант РЗК, який застосовується для серологічної діагностики інфекційних захворювань та оцінки імунного статусу тварин.

Приклади застосування: діагностика бруцельозу великої рогатої худоби, інфекційної анемії коней, класичної та африканської чуми свиней, хвороби Ауєскі, вірусної діареї ВРХ.

Непряма РЗК – застосовується для виявлення антигену в досліджуваному матеріалі. Відомі антитіла (діагностична антисироватка) змішуються з досліджуваним матеріалом, що містить потенційний антиген, та комплементом. Якщо в матеріалі присутній шуканий антиген, він зв'язується з антитілами, утворюється імунний комплекс, який фіксує комплемент. Цей варіант використовується рідше, оскільки вимагає високоспецифічних антисироваток та ретельного контролю якості.

Приклади застосування: ідентифікація збудників у патологічному матеріалі, виявлення вірусних антигенів у культурах клітин, контроль якості вакцинних препаратів.

За фізико-хімічним станом антигену:

РЗК з розчинним антигеном – використовується для діагностики захворювань, де антиген знаходиться в розчинній формі. Такі антигени можуть бути отримані з вірусів, внутрішньоклітинних бактерій або екстрактів тканин. Розчинні антигени забезпечують однорідну реакцію та сприяють стандартизації методу. Цей варіант найчастіше застосовується при вірусних інфекціях, оскільки вірусні антигени зазвичай представлені в розчинній формі після руйнування вірусних частинок.

Приклади застосування: діагностика вірусних інфекцій (класична чума свиней, інфекційний ринотрахеїт ВРХ, грип коней), виявлення антитіл до екзотоксинів, діагностика мікоплазмозів.

РЗК з корпускулярним антигеном – застосовується для діагностики бактеріальних інфекцій, де цілі бактеріальні клітини або їх великі фрагменти виступають як антиген. Корпускулярні антигени містять множинні антигенні детермінанти на поверхні, що може підвищувати чутливість реакції. Однак використання корпускулярних антигенів вимагає ретельної стандартизації концентрації та може призводити до неспецифічних реакцій через наявність спільних антигенів.

Приклади застосування: діагностика бруцельозу, туберкульозу (як додатковий метод), сальмонельозу, колібактеріозу.

За технічним виконанням:

Класична (в пробірках) РЗК – виконується в стандартних серологічних пробірках об'ємом 1-2 мл. Кожна проба вимагає відносно більших обсягів реагентів (0,25-0,5 мл кожного компонента). Цей варіант забезпечує найкращу візуалізацію результатів та зручний для навчальних цілей, але економічно не вигідний при масових дослідженнях.

Мікрометод РЗК – модифікація стандартної РЗК з використанням мікрооб'ємів реагентів, що виконується в мікропланшетах на 96 лунок. Об'єм кожного компонента реакції зменшений до 25-50 мкл, що дозволяє значно економити реагенти (у 10-20 разів порівняно з класичною РЗК).

Мікрометод забезпечує можливість одночасного тестування великої кількості зразків, частково піддається автоматизації та є методом вибору для масових досліджень у великих діагностичних лабораторіях.

Переваги мікрометоду: економія реагентів, можливість тестування до 80-90 зразків на одному планшеті, зручність документування результатів, зменшення впливу людського фактора при використанні автоматичних дозаторів.

Обмеження мікрометоду: потребує мікропланшетного обладнання та прецизійних дозаторів, результати можуть бути складнішими для інтерпретації через малий об'єм, вища чутливість до помилок при дозуванні.

Вибір конкретної модифікації РЗК визначається діагностичною метою, характером досліджуваного матеріалу, доступністю реагентів та обладнання, а також кількістю зразків, що підлягають дослідженню. У сучасній практиці найчастіше використовується пряма РЗК у мікробаріанті для серологічної діагностики інфекційних захворювань, оскільки це забезпечує оптимальне співвідношення економічності, продуктивності та діагностичної точності.

Система комплементу та її роль в імунній відповіді. Для розуміння РЗК необхідно знати основні властивості системи комплементу, оскільки саме її активація є центральним механізмом реакції.

Комплемент – це каскадна система з понад 30 розчинних та мембранозв'язаних білків плазми крові, які діють послідовно для елімінації патогенів та регуляції запальної відповіді. Більшість компонентів комплементу синтезуються в печінці, хоча деякі можуть продукуватися макрофагами та іншими клітинами.

Основні компоненти комплементу позначаються літерою С з цифрами: С1, С2, С3, С4, С5, С6, С7, С8, С9. Послідовність нумерації відображає не порядок активації, а історичний порядок відкриття компонентів. Активовані фрагменти компонентів позначаються малими літерами: С3а, С3б, С4а, С4б.

Ключові властивості комплементу для РЗК:

Термолабільність: більшість компонентів комплементу інактивуються при нагріванні до 56°C протягом 30 хвилин. Це використовується для інактивації комплементу в досліджуваних сироватках (щоб він не інтерферував з реакцією).

Видова специфічність: комплемент одного виду може активуватися комплексами антиген-антитіло інших видів. Тому для РЗК зазвичай використовують комплемент морської свинки, який добре активується антитілами багатьох видів тварин.

Лабільність при зберіганні: активність комплементу швидко знижується при зберіганні. Свіжа сироватка морської свинки зберігає активність 2-3 дні при 4°C. Для тривалого зберігання комплемент потрібно заморожувати при -70°C або ліофілізувати.

Антикомплементарність: деякі речовини можуть неспецифічно активувати або інгібувати комплемент (бактеріальні ендотоксини, продукти гемолізу, деякі білки гострої фази). Це може призводити до хибних результатів РЗК.

Шляхи активації комплементу. Комплемент може активуватися трьома основними шляхами, але для РЗК найважливіший класичний шлях:

Класичний шлях активації (використовується в РЗК):

- ініціація: комплекс антиген-антитіло (IgM або IgG) зв'язує компонент C1, що складається з трьох субкомпонентів: C1q (розпізнає Fc-фрагмент антитіла), C1r та C1s (ферменти)
- активація C1 призводить до активації C4 та C2, утворюючи комплекс C4b2a (C3-конвертаза класичного шляху)
- C3-конвертаза розщеплює C3 на C3a (анафілатоксин) та C3b (опсонін)
- C3b приєднується до C4b2a, утворюючи C5-конвертазу (C4b2a3b)
- C5-конвертаза розщеплює C5 на C5a та C5b
- C5b ініціює утворення мембраноатакуючого комплексу (МАК): C5b + C6 + C7 + C8 + полімеризація C9
- МАК вбудовується в клітинну мембрану, утворюючи пору, що призводить до осмотичного лізису клітини

Важливо: якщо всі компоненти комплементу зв'язуються в основній реакції (антиген + антитіло + комплемент), вони стають недоступними для індикаторної системи. Якщо антиген-антитільна реакція не відбувається, комплемент залишається вільним і може лізувати сенсibilізовані еритроцити індикаторної системи.

Принцип двоетапної реакції зв'язування комплементу. РЗК складається з двох послідовних етапів (двох реакцій), що відбуваються в одній пробірці. Обидва етапи є обов'язковими, і результат інтерпретується за підсумком обох реакцій.

Перший етап: основна (специфічна) реакція

Компоненти основної реакції:

- антиген (Ag) – досліджуванний або діагностичний антиген;
- антитіло (Ab) – досліджувана сироватка (при виявленні антитіл) або діагностична антисироватка (при виявленні антигену);
- комплемент (C') – сироватка морської свинки як джерело комплементу.

На першому етапі змішують всі три компоненти в пробірці та інкубують при оптимальних умовах (зазвичай 37°C або в термостаті-холодильнику при 4°C протягом ночі, залежно від протоколу).

Варіант А: антиген та антитіло є гомологічними (специфічно відповідають один одному): → утворюється імунний комплекс Ag-Ab → комплекс активує класичний шлях комплементу → всі компоненти комплементу зв'язуються з імунним комплексом → комплемент «фіксується» і стає неактивним → у розчині НЕ залишається вільного активного комплементу.

Варіант Б: антиген та антитіло не є гомологічними (не відповідають один одному): → імунний комплекс НЕ утворюється → комплемент НЕ активується → комплемент залишається вільним та активним у розчині. На цьому етапі візуально неможливо визначити, чи відбулася реакція, оскільки розчин залишається прозорим в обох випадках. Саме тому потрібен другий етап – індикаторна система.

Другий етап: індикаторна (гемолітична) реакція

Компоненти індикаторної системи:

- еритроцити барана (ЕБ) – 3-5% суспензія, використовуються як індикатор через високу чутливість до комплемент-опосередкованого лізису;
- гемолітична сироватка (ГС) – антитіла кроля проти еритроцитів барана, отримані шляхом імунізації. Ці антитіла сенсibiliзують еритроцити, роблячи їх чутливими до дії комплементу.

Разом ЕБ + ГС утворюють гемолітичну систему (ГС), яку також називають *сенсibiliзованими еритроцитами*.

На другому етапі до суміші отриманої після першого етапу додають гемолітичну систему та додатково інкубують (зазвичай 30-60 хвилин при 37°C).

Варіант А: якщо на першому етапі комплемент зв'язався (позитивна основна реакція): → вільного активного комплементу немає → сенсibiliзовані еритроцити НЕ лізуються → еритроцити залишаються інтактними → суспензія залишається КАЛАМУТНОЮ (червонуватого кольору) → це ПОЗИТИВНА РЗК (+)

Варіант Б: якщо на першому етапі комплемент НЕ зв'язався (негативна основна реакція): → вільний активний комплемент присутній → комплемент зв'язується з сенсibiliзованими еритроцитами → активується класичний шлях → утворюється мембраноатакуючий комплекс → еритроцити ЛІЗУЮТЬСЯ → гемоглобін виходить в розчин → суспензія стає ПРОЗОРОЮ («лаковою»), червоного кольору → це НЕГАТИВНА РЗК (-) (Рисунок 3.14).

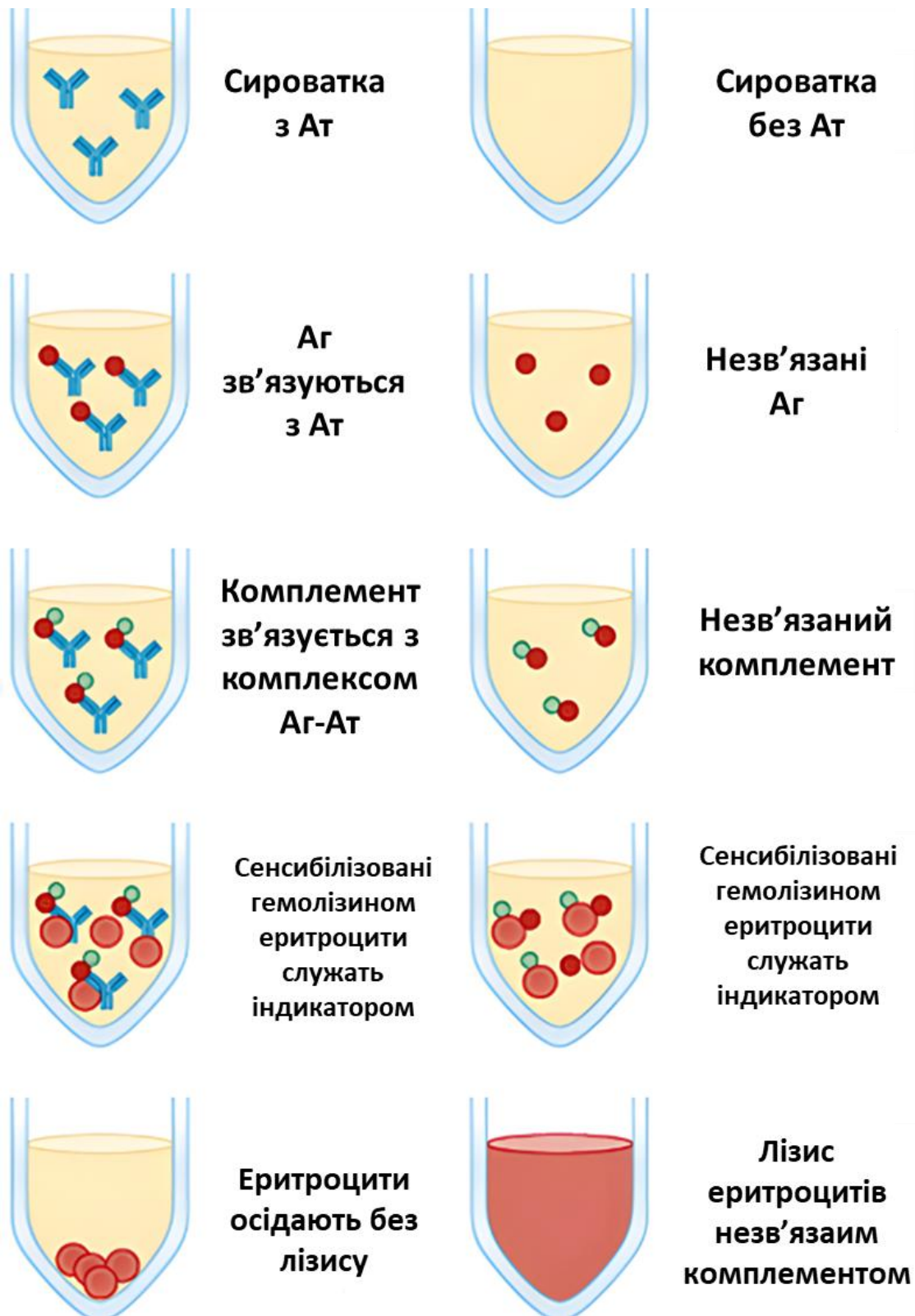


Рис. 3.14. Схематичне представлення результатів РЗК

Індикаторна (гемолітична) система: компоненти та підготовка. Індикаторна система є важливою частиною РЗК. Її якість безпосередньо впливає на чутливість та відтворюваність результатів. Підготовка компонентів індикаторної системи вимагає точності та дотримання стандартів.

Еритроцити барана (ЕБ)

Отримання еритроцитів:

- кров відбирають від здорових баранів стерильно з яремної вени;
- використовують антикоагулянт: 3,8% розчин цитрату натрію (1:9 до крові) або стерильний розчин Алсевера;
- свіжа кров барана придатна до 10 днів при зберіганні при 4°C;
- перед використанням еритроцити тричі промивають фізіологічним розчином (центрифугування 1500 об/хв, 10 хв).

Приготування робочої суспензії:

- після промивання відібрати осад еритроцитів
- приготувати 3% суспензію: 0,3 мл осаду еритроцитів + 9,7 мл фізрозчину
- або 5% суспензію для деяких модифікацій методу
- свіжоприготовлена суспензія використовується в день приготування

Важливо: еритроцити повинні бути вільними від гемолізу. Навіть незначний гемоліз може спричинити хибні результати через антикомплементарну дію гемоглобіну.

Гемолітична сироватка (ГС)

Отримання гемолітичної сироватки. Гемолітична сироватка містить антитіла проти еритроцитів барана і виробляється шляхом гіперімунізації кролів:

- кролів імунізують еритроцитами барана (3-5% суспензія, 2-5 мл внутрішньовенно або підшкірно)
- імунізація проводиться 4-6 разів з інтервалом 5-7 днів
- через 7-10 днів після останньої імунізації відбирають кров від кролів
- отриману сироватку інактивують (56°C, 30 хв) для руйнування власного комплексу кроля
- зберігають при -20°C у вигляді невеликих аліквот

Титрування гемолітичної сироватки. Перед використанням необхідно визначити робоче розведення ГС. Титр ГС – це найбільше розведення, при якому ще відбувається повний гемоліз сенсibilізованих еритроцитів у присутності комплексу.

Методика титрування:

1. Готують дворазові розведення ГС: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000
2. До кожного розведення додають стандартну кількість ЕБ (3% суспензія)
3. Інкують 30 хвилин при кімнатній температурі (утворення сенсibilізованих еритроцитів)
4. Додають стандартну дозу комплексу
5. Інкують 30-60 хв при 37°C

6. Визначають останнє розведення з повним гемолізом – це і є титр ГС
Робоче розведення ГС для РЗК зазвичай становить 1/2 або 1/4 від титру. Наприклад, якщо титр ГС = 1:4000, робоче розведення буде 1:1000 або 1:2000. Використання такого розведення забезпечує оптимальну сенсibiliзацію еритроцитів з запасом активності.

Комплемент

Джерело комплементу. Для РЗК використовують комплемент морської свинки, оскільки він:

- активується імунними комплексами широкого спектру видів тварин
- має високу гемолітичну активність
- стандартизований та комерційно доступний
- добре вивчений та воспроизводимий

Отримання комплементу:

- кров відбирають від здорових неімунізованих морських свинок з серця під наркозом або шляхом декапітації
- дають крові згорнутися при кімнатній температурі (30-60 хв)
- відбирають сироватку, центрифугують для видалення клітин
- сироватку не інактивують! (інакше комплемент буде зруйнований)
- можна використовувати свіжу сироватку (2-3 дні при 4°C) або заморожену при -70°C (до 6 місяців)
- також використовують комерційний ліофілізований комплемент (стандартизований, зручний для зберігання)

Титрування комплементу. Це найважливіший етап підготовки до РЗК. Титр комплементу визначає мінімальну кількість комплементу, необхідну для повного гемолізу стандартної гемолітичної системи.

Методика титрування:

1. Готують дворазові розведення комплементу: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320
2. До кожного розведення додають стандартну гемолітичну систему (ЕБ + ГС у робочих розведеннях)
3. Інкують 30-60 хвилин при 37°C
4. Центрифугують та оцінюють ступінь гемолізу
5. Визначають останнє розведення з повним гемолізом – це 100% гемолітична доза ($ГД_{100}$)
6. Розведення, при якому відбувається 50% гемоліз, позначають як $ГД_{50}$

Робоча доза комплементу для РЗК. У більшості протоколів використовують подвійну або потрійну $ГД_{100}$ (тобто 2-3 × $ГД_{100}$), або 5 × $ГД_{50}$. Це забезпечує:

- достатню кількість комплементу для основної реакції

- надійний гемоліз у негативних зразках
- запас на можливу втрату активності
- компенсацію індивідуальної варіабельності зразків

Важливо: комплемент необхідно титрувати перед кожною серією досліджень, оскільки його активність може змінюватися при зберіганні. Повторне заморожування-розморозування різко знижує активність.

Особливості постановки реакції зв'язування комплементу. РЗК є найскладнішим з класичних серологічних методів і вимагає суворого дотримання протоколу, точного дозування реагентів та контролю багатьох параметрів.

Підготовка досліджуваних сироваток

Обов'язкова інактивація. Всі досліджувані сироватки повинні бути інактивовані для руйнування власного комплементу:

- нагрівання на водяній бані при 56°C протягом 30 хвилин
- контроль температури термометром (важливо не перегріти!)
- після інактивації швидко охолодити до кімнатної температури
- інактивовані сироватки зберігати при 4°C не більше тижня або заморожувати

Перевірка на антикомплементарність. Деякі сироватки можуть мати антикомплементарні властивості (неспецифічно інактивувати комплемент), що призводить до хибнопозитивних результатів. Тому необхідна попередня перевірка:

Постановка контролю сироватки (КС): Сироватка + Комплемент + ГС (без антигену) → Інкубація → Повинен бути повний гемоліз. Якщо гемоліз неповний або відсутній – сироватка антикомплементарна і не може бути досліджена без спеціальної обробки (додаткове розведення, адсорбція).

Розведення сироваток:

- для якісного аналізу: зазвичай основне розведення 1:5 або 1:10
- для кількісного аналізу (титрування): готують дворазові розведення від 1:5 до 1:640 або більше
- розведення проводять у фізіологічному розчині або спеціальному буфері (веронал-ацетатний)

Методика постановки РЗК

Класичний метод РЗК в пробірках (макрометод):

День 1. Основна реакція:

1. У серологічні пробірки (10×75 мм) послідовно вносять:

- 0,5 мл інактивованої досліджуваної сироватки (в робочому розведенні)

- 0,5 мл діагностичного антигену (в робочому розведенні)

- 0,5 мл комплекменту (робоча доза: $2-3 \times \text{ГД}_{100}$)

2. Ретельно перемішати

3. Інкубувати:

Варіант А: 30-60 хвилин при 37°C (короткий метод)

Варіант Б: 18-20 годин при 4°C (довгий метод, більш чутливий)

День 2 (або продовження в той самий день). Додавання гемолітичної системи:

4. До кожної пробірки додати 1,0 мл гемолітичної системи:

ГС = 0,5 мл сенсibiliзованих ЕБ + 0,5 мл ГС (у робочих розведеннях)

5. Ретельно перемішати

6. Інкубувати 30-60 хвилин при 37°C на водяній бані

7. Центрифугувати 5 хвилин при 1000 об/хв для осадження неліпованих еритроцитів

8. Облік результатів

Обов'язкові контролю. Для кожної серії необхідно ставити наступні контролю:

1. Контроль сироватки (КС): Сироватка + Комплекмент + ГС (без антигену). Має бути повний гемоліз. Контролює відсутність антикомплемента сироватки.

2. Контроль антигену (КАг): Антиген + Комплекмент + ГС (без сироватки). Має бути повний гемоліз. Контролює відсутність антикомплемента антигену.

3. Контроль гемолітичної системи (КГС): Комплекмент + ГС (без сироватки і антигену). Має бути повний гемоліз. Контролює активність комплекменту та ГС.

4. Контроль еритроцитів (КЕ): тільки ЕБ у фізрозчині (без всіх інших компонентів). Не повинно бути гемолізу. Контролює якість еритроцитів.

5. Позитивний контроль: відома позитивна сироватка + Антиген + Комплекмент + ГС. Не повинно бути гемолізу (затримка гемолізу).

6. Негативний контроль: відома негативна сироватка + Антиген + Комплекмент + ГС. Має бути повний гемоліз.

Важливо: результати досліджування враховуються тільки при правильних показниках усіх контролів. Якщо хоча б один контроль не дійсний, вся серія повинна бути переставлена.

Облік та інтерпретація результатів РЗК

Візуальна оцінка ступеня гемолізу. Результати оцінюють за наявністю або відсутністю гемолізу еритроцитів. Використовують шкалу від 0 до 4 хрестів:

++++ (чотири хрести) – повна затримка гемолізу. Надосадова рідина прозора і безбарвна, весь осад еритроцитів на дні. **Результат: позитивний (++++)**

+++ (три хрести) – майже повна затримка гемолізу (75-90%). Надосадова рідина ледь помітно забарвлена, великий осад еритроцитів. **Результат: позитивний (+++)**

++ (два хрести) – часткова затримка гемолізу (50-75%). Надосадова рідина слабо забарвлена в рожевий колір, помітний осад. **Результат: слабо позитивний (++)**

+ (один хрест) – слабка затримка гемолізу (25-50%). Надосадова рідина помірно забарвлена, невеликий осад. **Результат: сумнівний (±)**

0 (нуль) – повний гемоліз. Надосадова рідина «лакова», прозора, червоного кольору (від вільного гемоглобіну), осаду еритроцитів немає або ледь помітний. **Результат: негативний (-)**

Діагностична інтерпретація:

Позитивна РЗК (++++ або +++): наявність специфічних антитіл у досліджуваній сироватці (або антигену, якщо досліджується антиген)

Слабо позитивна РЗК (++): низький рівень антитіл, рання стадія інфекції або залишкові антитіла. Рекомендується повторне дослідження через 2-3 тижні

Сумнівна РЗК (+): неможливо однозначно інтерпретувати. Необхідне повторне дослідження з іншим розведенням сироватки або використання іншого методу

Негативна РЗК (0): відсутність специфічних антитіл або їх концентрація нижче порогу чутливості методу

Титрування в РЗК. Для кількісної оцінки рівня антитіл проводять титрування – постановку РЗК з серією дворазових розведень сироватки. Титр визначають як зворотне значення найбільшого розведення, при якому ще спостерігається затримка гемолізу на ++ або більше.

Приклад: якщо затримка гемолізу (++) спостерігається до розведення 1:160 включно, а при 1:320 вже повний гемоліз, то титр = 1:160 або 160.

Застосування РЗК у ветеринарній діагностиці. Незважаючи на складність та трудомісткість, РЗК залишається референтним методом для діагностики ряду важливих захворювань: збудлива хвороба коней (*Trypanosoma equiperdum*) РЗК є офіційно визнаним методом WOAH для

діагностики та сертифікації. Діагностичний титр $\geq 1:5$; класична чума свиней: РЗК використовується для підтвердження діагнозу та диференціації від інших геморагічних лихоманок. Високоспецифічний метод для виявлення антитіл; інфекційна анемія коней: хоча РІД більш поширена, РЗК також використовується як підтверджувальний тест; бруцельоз: РЗК використовувалася як підтверджувальний метод, хоча зараз значною мірою замінена ІФА; міксоматоз кролів: серологічна діагностика та епізоотологічний нагляд; деякі вірусні респіраторні інфекції: грип, парагрип, аденовірусні інфекції (переважно в науково-дослідній роботі).

Переваги РЗК:

- висока специфічність через множинні етапи та контролю
- можливість виявлення антитіл різних класів (IgM та IgG однаково активують комплемент)
- кількісна оцінка через титрування
- офіційне визнання міжнародними організаціями для ряду захворювань
- відсутність необхідності в складному обладнанні (тільки водяна баня та центрифуга)

Обмеження РЗК:

- висока трудомісткість та тривалість (1-2 дні)
- необхідність свіжих біологічних реагентів (комплемента, еритроцити)
- потреба в кваліфікованому персоналі для правильної постановки та інтерпретації
- багато можливостей для помилок на різних етапах
- можливість антикомплемента сироваток
- суб'єктивність візуальної оцінки результатів
- відносно низька чутливість порівняно з ІФА або ПЛР

Реакція зв'язування комплементу, незважаючи на свій столітній вік та появу більш сучасних методів, продовжує зберігати своє значення в ветеринарній діагностиці як високоспецифічний референтний метод. Її складність є одночасно недоліком (обмежує широке застосування) та перевагою (множинні контролю забезпечують високу надійність результатів).

Розуміння принципів РЗК важливе не тільки для практичного застосування методу, а й для загального розуміння механізмів імунної відповіді, ролі комплементу в імунітеті та принципів побудови серологічних діагностичних систем. Багато сучасних методів (наприклад, цитотоксичні тести, деякі варіанти ІФА) базуються на тих самих принципах активації комплементу, що і класична РЗК.

3.6. Імуноблотинг (Western blot)

Імуноблотинг, також відомий як Western blot (вестерн-блот), є надзвичайно специфічним та чутливим аналітичним методом, що використовується для виявлення та ідентифікації специфічних білків у складних білкових сумішах. Цей метод поєднує високу роздільну здатність електрофоретичного розділення білків з чутливістю та специфічністю імунологічного виявлення, що робить його незамінним інструментом у діагностиці інфекційних захворювань тварин, особливо коли потрібно підтвердити результати скринінгових тестів або детально охарактеризувати імунну відповідь.

Історія розвитку методів blot-аналізу. Розвиток блотингу є яскравим прикладом того, як поєднання різних технологій може створити потужний аналітичний інструмент. Історія методу тісно пов'язана з розвитком суміжних технік блотингу, кожна з яких отримала свою назву за аналогією з попередньою.

Southern blot для ДНК (1975). Перша техніка блотингу була розроблена британським біологом Едвіном Саузерном (Edwin Southern) у 1975 році в Единбурзькому університеті. Його метод дозволяв переносити фрагменти ДНК з агарозного гелю на нітроцелюлозну мембрану для подальшої гібридизації з радіоактивно міченими зондами. Цей метод, названий Southern blot на честь свого винахідника, став фундаментом для розвитку всіх наступних технік блотингу та революціонував молекулярну біологію. За свій внесок у розвиток науки професор Саузерн отримав престижну премію Ласкера у 2005 році.

Northern blot для РНК (1977). Адаптація методу Саузерна для аналізу РНК була здійснена Джеймсом Елвайном (James Alwine) та Джорджем Старком (George Stark) зі Стенфордського університету у 1977 році. Вони назвали свій метод Northern blot як жартівливу відсилку до Southern blot (північ проти півдня), хоча технічно це була адаптація того ж принципу для роботи з РНК замість ДНК. Цей метод став незамінним для вивчення експресії генів та аналізу транскриптів.

Western blot для білків (1979-1981). Майже одночасно і незалежно один від одного троє вчених розробили метод перенесення білків на мембрану після електрофоретичного розділення. У 1979 році Гаррі Таубін (Harry Towbin) та його колеги зі Швейцарії опублікували свою роботу, в якій описали електрофоретичне перенесення білків з гелю на нітроцелюлозні смужки з подальшим імунологічним виявленням. Незалежно від них, В. Ніл Бернет (W. Neal Burnette) з США розробив подібну техніку. Саме Бернет у

1981 році запропонував назву «Western blot», продовжуючи «географічну» традицію найменування, розпочату як Southern та Northern blot. Термін швидко прижився у науковій спільноті, хоча метод також відомий під назвами «імуноблотинг» або «protein blotting» (білковий блотинг). Альтернативна назва «immunoblotting» краще відображає суть методу – імунологічне виявлення білків, але назва Western blot залишається найбільш поширеною.

Впровадження у діагностику (1980-ті роки). Протягом 1980-х років метод швидко знайшов застосування в клінічній діагностиці. Особливо важливим стало впровадження імуноблотингу як підтверджуючого тесту для діагностики ВІЛ-інфекції у середині 1980-х років, коли стало зрозуміло, що скринінгові ІФА-тести можуть давати хибнопозитивні результати. Метод дозволяв виявляти антитіла до окремих вірусних білків, що значно підвищувало специфічність діагностики.

У ветеринарній медицині метод почав активно застосовуватися для діагностики таких важливих захворювань як лейкоз великої рогатої худоби, інфекційна анемія коней, вірусна діарея великої рогатої худоби та інші інфекції, що потребували точної та специфічної діагностики.

Подальший розвиток і модифікації. Базова технологія постійно вдосконалювалася. Були розроблені більш чутливі системи детекції (хемілюмінесцентна, флуоресцентна), покращені мембрани (PVDF замість нітроцелюлози для певних застосувань), автоматизовані системи для обробки та аналізу результатів. Сучасні цифрові системи візуалізації дозволяють проводити кількісний аналіз з високою точністю.

Eastern blot для посттрансляційних модифікацій білків. Для повноти картини варто згадати, що «географічну серію» завершив метод Eastern blot, розроблений для виявлення посттрансляційних модифікацій білків, зокрема глікозилювання, фосфорилування та ліпідних модифікацій. Цей метод можна розглядати як подальше розширення можливостей Western blot.

Сьогодні імуноблотинг залишається «золотим стандартом» для підтвердження серологічної діагностики багатьох інфекційних захворювань і широко використовується як у медицині, так і у ветеринарії. Метод став фундаментальною технікою клітинної біології, молекулярної біології, вірусології та інших галузей біомедичних наук.

3.6.2. Принципи методу імуноблотингу (Western blot)

Імуноблотинг заснований на комбінації трьох основних технологічних підходів: електрофоретичного розділення білків за молекулярною масою, перенесення розділених білків на твердофазну мембрану та імунохімічного виявлення специфічних білків за допомогою антитіл. Кожен з цих етапів

критично важливий для отримання достовірних та інформативних результатів.

Стадія 1: Підготовка зразків. Процес починається з ретельної підготовки біологічного матеріалу. Білкові зразки (антигени збудника, лізати клітин або тканин) змішують з буфером для нанесення, що містить детергент додецилсульфат натрію (SDS) та відновник дисульфідних зв'язків (β -меркаптоетанол або дитіотреїтол). SDS денатурує білки та надає їм рівномірний негативний заряд пропорційно до їхньої молекулярної маси, що забезпечує розділення білків виключно за розміром. Відновник розриває дисульфідні містки між цистеїновими залишками, повністю денатуруючи білкові молекули.

Стадія 2: Електрофоретичне розділення (SDS-PAGE). Підготовлені зразки наносять у лунки поліакриламідного гелю і проводять електрофорез у присутності SDS (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Гель зазвичай має градієнт концентрації акриламіду або складається з двох зон: концентруючого гелю з великим розміром пор (4-5% акриламід) та розділяючого гелю з меншими порами (8-15% акриламід залежно від розміру білків, що аналізуються).

Під дією електричного поля білки мігрують через гель від катода (негативного електрода) до анода (позитивного електрода). Швидкість міграції обернено пропорційна молекулярній масі білка: менші білки рухаються швидше і проходять більшу відстань, тоді як великі білки затримуються в порах гелю. В результаті білки розділяються на окремі смуги відповідно до їхньої молекулярної маси.

Паралельно з досліджуваними зразками завжди наносять маркери молекулярної маси – суміш білків з відомими розмірами, що дозволяє визначити молекулярну масу досліджуваних білків. Для імуноблотингу найчастіше використовують вертикальні електрофоретичні системи, оскільки вони забезпечують кращу роздільну здатність та більш рівномірне розділення білків.

Стадія 3: Перенесення білків на мембрану (блотинг). Після електрофоретичного розділення білки необхідно перенести з гелю на твердофазну мембрану, де вони стануть доступними для імунологічного виявлення. Цей процес називається блотингом. Найчастіше використовують два типи мембран:

1. *Нітроцелюлозні мембрани* - мають високу спорідненість до білків, забезпечують низький неспецифічний фон, але є крихкими та чутливими до механічних пошкоджень.

2. Полівінілденфторидні мембрани (PVDF) - більш міцні, витримують багаторазові цикли блокування та промивання, мають вищу білкозв'язуючу здатність, але потребують попередньої активації в метанолі.

Перенесення білків здійснюють методом електроблотингу. Гель розміщують безпосередньо на мембрані, цей «сандвіч» поміщають між фільтрувальним папером, змоченим у переносному буфері, та губками. Всю конструкцію стискають у касеті для блотингу та занурюють у переносний буфер у спеціальній камері. При прикладанні електричного поля перпендикулярно до площини гелю білки мігрують з гелю на мембрану, де міцно адсорбуються.

Існує два основних варіанти електроблотингу:

1. Вологий блотинг - класичний метод з повним зануренням у буфер, забезпечує найефективніше перенесення, але потребує більшого часу (1-2 години) та великого об'єму буфера.

2. Напівсухий блотинг - швидший метод (15-30 хвилин), використовує менше буфера, але може бути менш ефективним для великих білків (>100 кДа).

Стадія 4: Блокування неспецифічного зв'язування. Після перенесення білків на мембрані залишаються вільні сайти зв'язування, які можуть неспецифічно взаємодіяти з антитілами, створюючи високий фоновий сигнал. Щоб запобігти цьому, мембрану інкубують з блокуючим розчином. Найпоширеніші варіанти:

- 5% знежирене сухе молоко в PBS або TBS - найдешевший та найпоширеніший варіант, ефективний для більшості застосувань;
- 3-5% бичачий сироватковий альбумін (БСА) - використовують для виявлення фосфорильованих білків;
- комерційні блокуючі розчини - оптимізовані суміші для специфічних застосувань.

Блокування зазвичай проводять протягом 1-2 годин при кімнатній температурі або залишають на ніч при 4°C на орбітальному шейкері.

Стадія 5: Інкубація з досліджуваною сироваткою. Після блокування мембрану інкубують з досліджуваною сироваткою (при виявленні антитіл) або зі специфічними первинними антитілами (при виявленні антигенів). Сироватку розводять у блокуючому розчині з додаванням детергенту (0,05-0,1% Tween 20) для зменшення неспецифічного зв'язування. Інкубацію проводять 1-2 години при кімнатній температурі або залишають на ніч при 4°C для антитіл з низькою афінністю. Під час інкубації антитіла специфічно зв'язуються зі своїми епітопами на відповідних білках-антигенах, іммобілізованих на мембрані.

Стадія 6: Промивання. Після інкубації мембрану ретельно промивають, щоб видалити незв'язані та слабко зв'язані антитіла. Зазвичай проводять 3-5 циклів промивання по 5-10 хвилин кожне з використанням промивного буфера (PBS або TBS з 0,05-0,1% Tween 20). Ефективне промивання критично важливе для отримання чіткого специфічного сигналу з мінімальним фоном.

Стадія 7: Виявлення комплексів антиген-антитіло. Для візуалізації зв'язаних антитіл використовують вторинні антитіла, кон'юговані з репортерною молекулою. Вторинні антитіла спрямовані проти імуноглобулінів того виду тварин, від якого була отримана досліджувана сироватка. Найпоширеніші системи детекції:

Ферментна детекція:

- *пероксидаза хрому (HRP)* - найпопулярніший варіант. При додаванні хемілюмінесцентного субстрату фермент каталізує реакцію з утворенням світла, яке реєструється на рентгенівській плівці або CCD-камерою. Дозволяє досягти дуже високої чутливості.
- *лужна фосфатаза (AP)* - використовує хромогенні субстрати (BCIP/NBT), що утворюють кольорові продукти на мембрані. Менш чутлива, ніж HRP, але дозволяє довготривале зберігання результатів.

Флуоресцентна детекція: Вторинні антитіла, мічені флуоресцентними барвниками (Alexa Fluor, DyLight, IRDye), дозволяють одночасно виявляти декілька білків. Потребує спеціального обладнання, але забезпечує широкий динамічний діапазон та кількісний аналіз.

Стадія 8: Детекція сигналу та документування. Фінальним етапом є візуалізація та документування результатів. Метод візуалізації залежить від типу використаної системи детекції:

Для хемілюмінесцентної детекції: мембрану інкубують з хемілюмінесцентним субстратом (суміш люмінолу та перексиду водню). HRP каталізує окислення люмінолу, що супроводжується емісією світла. Світло реєструють експонуванням рентгенівської плівки або за допомогою CCD-камери. Час експозиції підбирають індивідуально (від кількох секунд до кількох хвилин).

Для колориметричної детекції: після інкубації з хромогенним субстратом на мембрані з'являються забарвлені смуги. Результат документують фотографуванням або скануванням. Забарвлення стабільне і мембрану можна зберігати тривалий час.

Для флуоресцентної детекції: мембрану сканують на флуоресцентному імідж-сканері при відповідних довжинах хвиль збудження та емісії. Дозволяє кількісний аналіз інтенсивності смуг.

3.6.3. Застосування для підтвердження результатів

Імуноблотинг займає особливе місце в діагностичному алгоритмі як підтверджуючий тест, що використовується після позитивних або сумнівних результатів скринінгових досліджень. Особлива цінність методу полягає в його здатності не просто виявити наявність антитіл у сироватці, але й визначити, проти яких саме білків збудника спрямовані ці антитіла.

Імуноблотинг у діагностиці ретровірусних інфекцій

Найвідомішим прикладом використання імуноблотингу як підтверджуючого тесту є діагностика ВІЛ-інфекції у людини та аналогічних ретровірусних інфекцій у тварин. У ветеринарній практиці імуноблотинг є обов'язковим підтверджуючим тестом для:

Вірусу лейкозу великої рогатої худоби (BLV) - імуноблотинг виявляє антитіла до специфічних білків BLV: gp51 (поверхневий глікопротеїн), p24 (капсидний білок) та інших структурних компонентів вірусу. Позитивним вважається результат при наявності смуг щонайменше до двох з цих білків.

Інфекційної анемії коней (ІНАН) - викликається вірусом, що належить до родини ретровірусів. Імуноблотинг підтверджує результати реакції Когінса (імунодифузії в агаровому гелі) та виявляє антитіла до p26, gp90, p15 та інших вірусних білків. Метод дозволяє підтвердити сумнівні результати скринінгових тестів.

Діагностичний алгоритм зазвичай включає: (1) Скринінг усіх зразків методом ІФА або реакцією Когінса - швидкі та економічні методи, але можуть давати хибнопозитивні результати; (2) Підтвердження всіх позитивних та сумнівних результатів скринінгу методом імуноблотингу; (3) Інтерпретація за встановленими критеріями - для кожної інфекції існують чіткі критерії позитивного результату, що базуються на наявності антитіл до специфічних вірусних білків.

Діагностика хвороби Лайма у собак та коней

Імуноблотинг традиційно використовувався для підтвердження діагнозу бореліозу (хвороби Лайма), викликаного бактеріями роду *Borrelia*. Ця інфекція має велике значення як для ветеринарії (собаки, коні), так і для охорони здоров'я людини через можливість зоонозної передачі.

Імуноблотинг виявляє антитіла до різних антигенних компонентів *Borrelia burgdorferi*:

- *раннє інфікування (IgM-відповідь)*: виявляються антитіла до поверхневих білків OspC (23-25 кДа) та білків 39 кДа. Позитивним вважається результат при наявності щонайменше 2 з 3 діагностичних смуг.
- *пізня інфекція (IgG-відповідь)*: з'являються антитіла до більш широкого спектра білків, включаючи 18, 21, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, та 93 кДа. Для

позитивного результату необхідна наявність щонайменше 5 з 10 специфічних смуг.

Імуноблотинг дозволяє диференціювати стадію захворювання за профілем антитіл, що важливо для вибору тактики лікування та прогнозу. Однак у сучасній ветеринарній практиці імуноблотинг для діагностики хвороби Лайма поступово замінюється більш сучасними методами, такими як мультиплексні аналізи на основі специфічних антигенів (OspA, OspC, OspF, C6), які забезпечують швидше та більш детальне визначення стадії інфекції та вакцинального статусу тварини.

Підтвердження діагнозу губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби

Імуноблотинг є однією з офіційно визнаних підтверджуючих методик для виявлення патологічної форми пріонного білка (PrP^{Sc}) у тканинах мозку при губчастоподібній енцефалопатії великої рогатої худоби (BSE). Метод дозволяє виявити характерний профіль розщеплення PrP^{Sc} після обробки протеїназою K, що відрізняє його від нормальної форми білка (PrP^C).

Стандартний протокол Western blot для BSE включає:

- гомогенізацію тканини довгастого мозку;
- обробку протеїназою K для видалення нормального PrP^C;
- ультрацентрифугування для концентрації PrP^{Sc};
- електрофоретичне розділення та перенесення на PVDF-мембрану;
- імунологічне виявлення з використанням специфічних моноклональних антитіл.

Імуноблотинг входить до переліку обов'язкових підтверджуючих тестів, рекомендованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (WOAH). Згідно з міжнародними протоколами, підтвердження діагнозу BSE вимагає використання щонайменше двох різних методів: зазвичай це комбінація імуногістохімії та імуноблотингу, або двох різних швидких тестів, один з яких має бути імуноблотингом.

Метод особливо цінний для диференціації атипичних форм BSE (L-типу та Н-типу) від класичної форми за характером глікозилування та молекулярною масою протеазорезистентного фрагменту PrP^{Sc}.

Переваги імуноблотингу як підтверджуючого тесту

Висока специфічність. Метод дозволяє ідентифікувати антитіла до окремих білків збудника, що практично виключає хибнопозитивні результати, спричинені перехресними реакціями з антигенами інших мікроорганізмів.

Можливість диференціації. Імуноблотинг дозволяє відрізнити справжньо позитивні результати від хибнопозитивних, що виникають при скринінгових дослідженнях через різні причини.

Визначення профілю імунної відповіді. Аналіз спектра виявлених смуг дає інформацію про те, які саме антигени викликають найсильнішу імунну відповідь, що може мати значення для розуміння стадії захворювання та прогнозу.

Стандартизація та міжнародне визнання. Для багатьох інфекцій існують чітко встановлені міжнародні критерії інтерпретації імуноблотингу, що забезпечує узгодженість результатів між різними лабораторіями та країнами.

Критерії інтерпретації результатів. Результати імуноблотингу інтерпретуються на основі наявності та інтенсивності специфічних смуг, що відповідають окремим білкам збудника. Загальні принципи інтерпретації:

Позитивний результат - наявність встановленого мінімального набору специфічних смуг.

Негативний результат - повна відсутність специфічних смуг або наявність лише фонового забарвлення.

Сумнівний результат - наявність деяких специфічних смуг, але їх кількість або комбінація не відповідають критеріям позитивного результату. Потребує повторного дослідження через 2-4 тижні.

3.6.4. Аналіз специфічності імунної відповіді

Імуноблотинг є потужним інструментом не тільки для діагностики інфекційних захворювань, але й для глибокого аналізу характеру та динаміки імунної відповіді організму тварини на збудника. Цей аспект особливо важливий для наукових досліджень, розробки вакцин та вивчення патогенезу інфекцій.

Ідентифікація імунодомінантних антигенів. При інфікуванні організм продукує антитіла до різних білків збудника, але інтенсивність імунної відповіді на окремі антигени може сильно варіювати. Імунодомінантні антигени - це ті компоненти збудника, які викликають найсильнішу та найбільш постійну імунну відповідь у більшості інфікованих тварин.

Імуноблотинг дозволяє визначити імунодомінантні антигени шляхом аналізу:

- частоти виявлення - антигени, до яких антитіла виявляються у 80-100% інфікованих тварин;
- інтенсивності сигналу - яскравість смуг корелює з концентрацією антитіл;

- часу появи - ранні антигени з'являються в перші тижні, пізні - через місяці після інфікування;
- стабільності відповіді - антитіла до імунодомінантних антигенів зберігаються найдовше.

Знання про імунодомінантні антигени критично важливе для розробки діагностичних тестів нового покоління з використанням рекомбінантних антигенів; створення субодиночних та рекомбінантних вакцин; розуміння патогенезу інфекцій та механізмів захисту та відбору найбільш інформативних антигенів для серологічного моніторингу.

Динаміка антитілоутворення. Послідовне дослідження парних сироваток, взятих у різні періоди після інфікування, за допомогою імуноблотингу дозволяє детально простежити розвиток імунної відповіді в часі. Це дає цінну інформацію про стадію інфекційного процесу та ефективність імунної відповіді.

Рання фаза (1-3 тижні):

- з'являються перші антитіла, зазвичай спрямовані проти найбільш імуногенних поверхневих білків збудника;
- на імуноблоті виявляється обмежена кількість смуг (1-3), часто слабкої інтенсивності;
- переважають антитіла класу IgM;
- результати можуть бути невизначеними згідно з діагностичними критеріями.

Гостра фаза (3-8 тижнів):

- швидке наростання титрів антитіл та розширення спектра розпізнаваних антигенів;
- з'являються антитіла до внутрішніх структурних білків збудника;
- переважають антитіла класу IgG;
- профіль смуг стає чітко позитивним.

Хронічна фаза (після 2-3 місяців):

- стабілізується характерний профіль антитіл;
- підтримуються високі титри IgG до імунодомінантних антигенів;
- деякі антитіла (особливо IgM) можуть знижуватися або зникати;
- при персистуючих інфекціях профіль залишається стабільним роками.

Ця інформація використовується для:

- визначення стадії інфекційного процесу при первинній діагностиці;
- моніторингу ефективності лікування (зниження інтенсивності смуг);
- прогнозування перебігу захворювання;
- епідеміологічних досліджень для встановлення часу інфікування в стадії.

Диференціація вакцинальних та постінфекційних антитіл. Одним з найважливіших застосувань імуноблотингу у ветеринарній практиці є можливість відрізнити тварин, вакцинованих проти певної інфекції, від тварин, які перенесли природну інфекцію. Це критично важливо для програм ерадикації захворювань та міжнародної торгівлі тваринами.

Принцип диференціації заснований на тому, що:

- вакцини містять обмежений набір антигенів - зазвичай тільки основні протективні білки або їх фрагменти;
- природна інфекція індукує антитіла до всіх білків збудника - включаючи неструктурні білки, білки реплікації та регуляторні білки.

Приклад: інфекційна анемія коней (ІНАН)

При вакцинації рекомбінантними вакцинами:

- на імуноблоті виявляються антитіла тільки до вакцинних антигенів (наприклад, gp90);
- відсутні антитіла до інших вірусних білків.

При природній інфекції:

- виявляються антитіла до широкого спектра вірусних білків: gp90, p26, p15, p11 та інші;
- профіль смуг значно багатший та включає внутрішні структурні білки.

Приклад: лейкоз великої рогатої худоби. Деякі експериментальні вакцини містять тільки глікопротеїн gp51:

- вакциновані тварини: антитіла тільки до gp51;
- інфіковані тварини: антитіла до gp51, p24, p15 та інших білків;
- наявність антитіл до внутрішніх білків (p24, p15) однозначно вказує на інфекцію.

Практичне значення DIVA-стратегії:

- можливість вакцинації без втрати можливості виявлення інфікованих тварин;
- підтримка міжнародної торгівлі тваринами з вакцинованих регіонів;
- реалізація програм ерадикації інфекцій при одночасній вакцинопрофілактиці;
- моніторинг циркуляції дикого вірусу у вакцинованих популяціях.

Оцінка перехресних реакцій. Імуноблотинг є незамінним інструментом для виявлення та аналізу перехресних імунологічних реакцій між антигенами різних, часто споріднених, збудників.

Механізм перехресних реакцій:

- близькоспоріднені мікроорганізми мають схожі або ідентичні епітопи;
- антитіла, утворені проти одного збудника, можуть розпізнавати білки іншого;

- це може призводити до хибнопозитивних результатів при серологічній діагностиці.

Аналіз перехресних реакцій методом імуноблотингу:

- виявлення перехресно-реагуючих білків за молекулярною масою;
- ідентифікація строго специфічних смуг, характерних лише для одного збудника;
- оцінка інтенсивності перехресних реакцій порівняно зі специфічними.

Моніторинг ефективності вакцинації. Імуноблотинг є цінним інструментом для оцінки імуногенності вакцин та контролю якості імунної відповіді після вакцинації. Метод дозволяє не просто визначити, чи сформувалися антитіла після вакцинації, але й детально охарактеризувати спектр та інтенсивність імунної відповіді на окремі компоненти вакцини.

Оцінка повноти імунної відповіді. Порівняння профілю антитіл після вакцинації з профілем після природної інфекції дозволяє оцінити, наскільки повно вакцина відтворює природну імунну відповідь:

- ідеальна вакцина повинна індукувати антитіла до всіх протективних антигенів збудника;
- імуноблотинг допомагає виявити «прогалини» в імунній відповіді;
- відсутність антитіл до важливих антигенів може вказувати на недостатню імуногенність вакцини.

Контроль якості вакцинних препаратів. При розробці та виробництві вакцин імуноблотинг використовується для:

- підтвердження наявності та стабільності антигенних компонентів у вакцинному препараті;
- контролю якості серій вакцини (постійність антигенного складу);
- виявлення деградації антигенів при порушенні умов зберігання;
- порівняння антигенного профілю різних серій або виробників.

Якщо сироватка імунізованих тварин не дає очікуваного профілю смуг, це може вказувати на проблеми з якістю або стабільністю вакцини (деградація антигенів, порушення технології виробництва).

Дослідження тривалості імунітету. Послідовний моніторинг вакцинованих тварин протягом тривалого часу дозволяє визначити, як довго зберігаються антитіла до різних компонентів вакцини:

- деякі антитіла можуть зникати швидше за інші;
- це допомагає визначити оптимальні інтервали ревакцинації;
- дозволяє оцінити, які антигени забезпечують довготривалий імунітет;
- важливо для розробки схем вакцинації та визначення тривалості захисту.

Виявлення різних класів імуноглобулінів. Використовуючи різні вторинні антитіла, специфічні до IgM, IgG, IgA або навіть субкласів IgG, можна окремо визначати ці класи антитіл до кожного антигену на імуноблоті. Це дає додаткову інформацію про характер і якість імунної відповіді:

- **IgM антитіла** вказують на ранню або первинну імунну відповідь; можуть свідчити про недавню інфекцію або вакцинацію;
- **IgG антитіла** свідчать про сформовану вторинну відповідь та імунологічну пам'ять; є основним маркером захисного імунітету;
- **IgA антитіла** важливі для оцінки мукозального імунітету, особливо при використанні інтраназальних або оральних вакцин;
- **співвідношення різних субкласів IgG (IgG1, IgG2 тощо)** може вказувати на тип імунної відповіді (Th1 або Th2), що важливо для оцінки механізму дії вакцини.

Практичне значення для ветеринарної медицини. Детальний аналіз специфічності імунної відповіді методом імуноблотингу має велике значення для розробки ефективних стратегій профілактики та контролю інфекційних захворювань у тваринництві. Метод дозволяє науковцям та практикам глибше розуміти взаємодію між патогеном та імунною системою хазяїна, що є основою для створення кращих діагностичних засобів та вакцин.

Імуноблотинг залишається незамінним методом як у рутинній діагностиці інфекційних захворювань тварин, так і в наукових дослідженнях. Незважаючи на появу нових молекулярних та імунологічних методів, імуноблотинг продовжує відігравати ключову роль як «золотий стандарт» для підтвердження серологічних досліджень завдяки своїй високій специфічності, надійності та можливості детального аналізу імунної відповіді. Подальший розвиток технології, включаючи автоматизацію та стандартизацію процедур, лише зміцнює позиції цього методу в арсеналі сучасної ветеринарної діагностики.

3.8. Реакція нейтралізації вірусів

Реакція нейтралізації вірусів (РН), також відома як тест на нейтралізацію вірусів (Virus Neutralization Test, VNT) або серонейтралізаційний тест (Serum Neutralization Test, SNT), є функціональним тестом, що оцінює здатність антитіл блокувати інфекційну активність вірусу. На відміну від більшості інших серологічних методів, які виявляють лише наявність антитіл до вірусних антигенів, реакція нейтралізації визначає функціональну активність антитіл – їхню здатність справді запобігати інфікуванню клітин вірусом.

Цей метод належить до групи тестів третинного зв'язування, оскільки оцінює не просто утворення комплексів антиген-антитіло, а їх біологічні

наслідки – здатність антитіл нейтралізувати патоген та захищати організм від інфекції. Саме тому РН вважається найбільш надійним показником протективного імунітету та «золотим стандартом» для багатьох вірусних інфекцій у ветеринарній практиці.

Історія розвитку методу. Реакція нейтралізації вірусів має довгу та багату історію, що тісно пов'язана з розвитком вірусології, імунології та культивування клітин. Цей метод еволюціонував від простих експериментів на тваринах до сучасних високотехнологічних систем на основі клітинних культур.

Ранні спостереження та відкриття (кінець XIX століття)

Початок - 1890-ті роки. Фундамент для розуміння феномену нейтралізації було закладено в останнє десятиліття XIX століття завдяки роботам з антитоксинів. Emil von Behring та Shibasaburo Kitasato у 1890 році продемонстрували, що сироватка імунізованих тварин може нейтралізувати дифтерійний та правцевий токсини. Хоча ці роботи стосувалися бактеріальних токсинів, а не вірусів, вони встановили фундаментальний принцип: специфічні антитіла в сироватці можуть блокувати біологічну активність патогенів або їх компонентів.

Перші експерименти з вірусами (1898-1901). Martinus Beijerinck у 1898 році описав вірус тютюнової мозаїки як «contagium vivum fluidum» (заразну живу рідину), що стало початком вірусології як науки. Незабаром після цього, на початку 1900-х років, дослідники почали експериментувати з передачею вірусних захворювань тваринам та виявили, що сироватка від одужавших тварин може запобігти захворюванню.

Експерименти на тваринах (1900-1940-ві роки)

Розвиток тестів нейтралізації на лабораторних тваринах. Протягом перших чотирьох десятиліть XX століття реакція нейтралізації виконувалася виключно на лабораторних тваринах. Досліджувану сироватку змішували з вірусом і вводили чутливим тваринам (найчастіше мишам, щурам, морським свинкам або кроликам). Якщо в сироватці були присутні нейтралізуючі антитіла, тварини не захворювали або захворювання протікало у легшій формі.

Тест нейтралізації вірусу сказу на мишах (1930-ті роки). Одним з найважливіших прикладів став розвиток методу нейтралізації для вірусу сказу. Оскільки сказ був і залишається смертельним захворюванням, визначення захисного рівня антитіл після вакцинації мало критичне значення. Метод Mouse Neutralization Test (MNT) став класичним підходом: суміш сироватка-вірус вводили внутрішньомозково мишам, і спостерігали за виживанням тварин протягом 14-21 дня. Цей підхід, хоча і точний, був

трудомістким, дорогим, потребував великої кількості тварин та піднімав етичні питання.

Тести нейтралізації для ящуру (1920-1930-ті роки). Valdemar Westergaard та інші дослідники в Данії та Німеччині розробили тести нейтралізації для вірусу ящуру на морських свинках та великій рогатій худобі. Ці методи стали основою для серотипування вірусу ящуру та оцінки ефективності вакцин. Однак використання великої рогатої худоби для тестування було надзвичайно дорогим та технічно складним.

Культури клітин (1940-1960-ті роки)

Перші спроби культивування клітин. Справжня революція в методології реакції нейтралізації почалася з розвитком технології культивування клітин. Alexis Carrel на початку ХХ століття розробив методи підтримання тканин поза організмом, за що отримав Нобелівську премію в 1912 році. Однак практичне застосування культур клітин для вірусологічних досліджень почалося набагато пізніше.

Справжнім проривом стала робота John F. Enders, Thomas H. Weller та Frederick C. Robbins, які в 1949 році успішно культивували вірус поліомієліту в клітинних культурах, отриманих з нервових тканин. Це відкриття, за яке троє вчених отримали Нобелівську премію в 1954 році, радикально змінило вірусологію та зробило можливим масштабне застосування реакції нейтралізації в клітинних культурах.

Розвиток стандартизованих клітинних ліній (1950-1960-ті роки). Протягом 1950-х та 1960-х років були розроблені та стандартизовані численні клітинні лінії для вірусологічних досліджень: клітини HeLa (перша безсмертна лінія людських клітин, отримана з пухлини Генрієтти Лакс у 1951 році), клітини Vero (з ниркової тканини африканської зеленої мавпи, 1962), клітини ВНК-21 (нирка сірійського хом'яка, 1961), клітини MDCK (нирка собаки, 1958) та багато інших. Кожна з цих ліній виявилася чутливою до певних вірусів, що зробило можливим специфічне культивування та нейтралізаційне тестування широкого спектра вірусних патогенів.

Метод бляшок (Plaque Assay) (1952-1953). Renato Dulbecco у 1952 році адаптував метод бляшок, розроблений для бактеріофагів, для тваринних вірусів. У цьому методі клітини вирощують у моношарі, інфікують вірусом, покривають напівтвердим агаровим або метилцелюлозним шаром, що обмежує розповсюдження вірусу. В результаті кожна вірусна частка утворює локалізований осередок інфікування (бляшку), який можна підрахувати. Додавання антитіл до вірусу перед інфікуванням зменшує кількість бляшок пропорційно до концентрації нейтралізуючих антитіл. Метод Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) став і залишається одним з найбільш точних методів визначення нейтралізуючих антитіл.

Модернізація та стандартизація (1970-1990-ті роки)

Мікрометоди та 96-лункові планшети. Впровадження мікропланшетів у 1970-х роках дозволило мініатюризувати реакцію нейтралізації, значно зменшивши витрати реагентів та часу. Розвиток мікротитраційних методів (Microtiter Neutralization Test) дозволив одночасно тестувати велику кількість зразків у стандартизованих умовах.

RFFIT для діагностики сказу (1973). George M. Smith та його колеги розробили Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) – модифікацію реакції нейтралізації для швидкого визначення антитіл до вірусу сказу. Замість тривалого спостереження за виживанням мишей, метод використовує флуоресцентне фарбування інфікованих клітин та мікроскопічний підрахунок флуоресцентних осередків вже через 20-24 години. RFFIT швидко став «золотим стандартом» для оцінки поствакцинального імунітету проти сказу і залишається таким досі.

FAVN тест (1998). Флуоресцентний тест нейтралізації антитіл до вірусу (Fluorescent Antibody Virus Neutralization test, FAVN) був розроблений як мікрометод, що поєднує переваги RFFIT з можливістю обробки великої кількості зразків. FAVN став обов'язковим тестом для міжнародного переміщення домашніх тварин (собак та котів) до країн, вільних від сказу.

Стандартизація міжнародних референс-сироваток. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) та Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (WOAH, раніше OIE) встановили міжнародні стандартні сироватки з відомою кількістю нейтралізуючих антитіл (виражених в міжнародних одиницях, IU). Це дозволило стандартизувати результати реакції нейтралізації між різними лабораторіями в усьому світі та встановити захисні рівні антитіл для різних інфекцій (наприклад, 0.5 IU/мл для сказу).

Сучасні розробки (2000-ні роки – сьогодні)

Автоматизація та цифрова візуалізація. Впровадження автоматизованих систем підрахунку клітин, флуоресцентної мікроскопії високого вмісту (High-Content Screening) та систем цифрової обробки зображень значно підвищило об'єктивність, відтворюваність та пропускну здатність реакції нейтралізації. Сучасні системи можуть автоматично підраховувати інфіковані клітини, визначати титри антитіл та генерувати звіти.

Псевдовіруси та химерні віруси. Для роботи з високопатогенними вірусами (наприклад, вірус Ебола, SARS-CoV-2) були розроблені тести нейтралізації на основі псевдовірусів – нереплікативних вірусних векторів, що несуть поверхневі білки патогенного вірусу. Це дозволяє проводити дослідження в лабораторіях з нижчим рівнем біобезпеки (BSL-2 замість BSL-3 або BSL-4).

Репортерні віруси з флуоресцентними та люмінесцентними маркерами. Створення рекомбінантних вірусів, що експресують репортерні гени (GFP, люциферазу), значно спростило та прискорило реакцію нейтралізації. Замість мікроскопічного підрахунку або імунофлуоресцентного фарбування, інфекцію можна виявити простим вимірюванням флуоресценції або люмінесценції. Наприклад, високопродуктивний тест нейтралізації сказу (HTNT) на основі рекомбінантного вірусу з GFP дозволяє автоматизовано обробляти сотні зразків на день.

Пандемія COVID-19 та масштабування методу (2020-2023). Пандемія COVID-19 стимулювала безпрецедентний розвиток та застосування тестів нейтралізації для оцінки імунітету проти SARS-CoV-2. Були розроблені численні високопродуктивні варіанти методу, включаючи псевдовірусні системи, live virus microneutralization assays та surrogate virus neutralization tests (sVNT), що не потребують культивування живого вірусу. Ці розробки мають велике значення і для ветеринарної вірусології, оскільки багато технологічних рішень можуть бути адаптовані для тварин.

Сьогодні реакція нейтралізації залишається незамінним методом у ветеринарній вірусології, поєднуючи вікові традиції з найсучаснішими технологіями. Від простих експериментів на мишах до автоматизованих високопродуктивних систем – цей метод пройшов довгий шлях еволюції, але його фундаментальний принцип залишається незмінним: виміряти функціональну здатність антитіл захищати організм від вірусної інфекції.

3.8.1. Типи реакцій нейтралізації

Існує кілька варіантів реакції нейтралізації, що відрізняються методологією виявлення інфекції, типом використовуваних клітин та способом визначення кінцевої точки. Вибір конкретного типу тесту залежить від вірусу, мети дослідження, доступного обладнання та рівня біобезпеки лабораторії.

Класичний тест нейтралізації на основі цитопатичної дії. Це найстаріший та найпростіший варіант реакції нейтралізації в клітинних культурах. Метод заснований на спостереженні за цитопатичною дією (ЦПД) вірусу – морфологічними змінами клітин, що виникають внаслідок вірусної інфекції.

Принцип методу:

- серійні розведення досліджуваної сироватки змішують зі стандартною дозою вірусу (зазвичай 100 TCID₅₀);
- після інкубації суміш вносять в лунки з моношаром чутливих клітин;

- через 3-7 діб (залежно від швидкості реплікації вірусу) оцінюють наявність ЦПД під світловим мікроскопом;
- титром вважається найвище розведення сироватки, яке повністю запобігає ЦПД.

Переваги:

- не потребує спеціального обладнання – достатньо інвертованого мікроскопа;
- низька вартість;
- можливість роботи з будь-якими вірусами, що викликають ЦПД.

Недоліки:

- тривалість (5-7 діб для повільних вірусів);
- суб'єктивність оцінки ЦПД;
- неможливість використання для вірусів, що не викликають виражену ЦПД;
- низька пропускна здатність.

Застосування у ветеринарії: діагностика ящуру, класичної чуми свиней, африканської чуми свиней, інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, вірусної діареї великої рогатої худоби.

Метод редукції бляшок (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT).

Вважається найбільш точним та кількісним методом визначення нейтралізуючих антитіл. Метод особливо корисний для вірусів, які утворюють чіткі бляшки в клітинних культурах.

Принцип методу:

- сироватку серійно розводять та змішують зі стандартною кількістю вірусу (зазвичай 50-100 PFU);
- суміш інокулюють на моношар клітин у 6- або 12-лункових планшетах;
- після адсорбції вірусу клітини покривають напівтвердим шаром (агар або метилцелюлоза), що обмежує дифузю вірусу;
- через 2-7 діб (залежно від вірусу) бляшки фіксують та фарбують (кристалвіолет, нейтральний червоний);
- підраховують кількість бляшок у кожному розведенні;
- PRNT₅₀ або PRNT₉₀ – розведення сироватки, яке зменшує кількість бляшок на 50% або 90% порівняно з контролем без сироватки;

Переваги:

- найвища точність та відтворюваність;
- кількісні результати (можна точно визначити титр);
- можливість диференціювати різні штами вірусу за профілем нейтралізації;
- «золотий стандарт» для багатьох арбовірусів та флавівірусів.

Недоліки:

- трудомісткість та висока вартість;

- потребує великої площі інкубаторів;
- низька пропускна здатність (максимум 20-30 зразків на день);
- не всі віруси утворюють чіткі бляшки.

Застосування у ветеринарії: Вірус Західного Нілу у коней, вірус блутангу у жуйних, пташиний грип, вірус чуми м'ясоїдних.

Флуоресцентні методи нейтралізації. Флуоресцентні методи значно прискорили реакцію нейтралізації завдяки можливості виявлення вірусних антигенів у клітинах через 18-48 годин після інфікування, задовго до появи ЦПД.

Експрес-тест фокус- флуоресцентного інгібування (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT). Розроблений спеціально для діагностики сказу, але принцип застосовний до інших вірусів.

Методологія:

- п'ятикратні серійні розведення сироватки змішують з 100 TCID₅₀ вірусу сказу (штам CVS-11 або Challenge Virus Standard);
- після 90-хвилинної інкубації при 37°C додають клітини (ВНК-21 або нейробластома);
- через 20-24 години клітини фіксують ацетоном та фарбують FITC-міченими антитілами проти рабічного нуклеопротеїну;
- підраховують флуоресцентні осередки (фокуси) під флуоресцентним мікроскопом;
- титр визначають методом Спірмена-Кербера та виражають в міжнародних одиницях (IU/мл) порівняно зі стандартною сироваткою.

Критерії оцінки:

- титр ≥ 0.5 IU/мл вважається захисним рівнем згідно з рекомендаціями ВООЗ та ВОАН;
- результат доступний через 24 години (порівняно з 14-21 днем для мишачого тесту);
- чутливість та специфічність > 98%.

Тест флуоресцентних віруснейтралізуючих антитіл (Fluorescent Antibody Virus Neutralization, FAVN). Мікрометод, що є адаптацією RFFIT для 96-лункових планшетів. Розроблений в 1998 році, схвалений ВОАН для міжнародної сертифікації тварин.

Відмінності від RFFIT:

- використовуються тризначні (1:3) розведення замість п'ятикратних;
- проводиться в 96-лункових планшетах, що дозволяє тестувати більше зразків;
- легше розрізнати негативні зразки від слабопозитивних (біля порогу 0.5 IU/мл);

- обов'язковий для міжнародного переміщення собак та котів до країн, вільних від сказу.

Високопродуктивні методи з репортерними вірусами. Сучасні методи використовують рекомбінантні віруси з вбудованими репортерними генами, що дозволяє автоматизувати виявлення інфекції.

GFP-базовані тести:

- використовують рекомбінантні віруси з геном зеленого флуоресцентного білка (GFP);
- інфіковані клітини флуоресціюють без додаткового фарбування;
- можливість автоматизованого підрахунку за допомогою флуоресцентних рідерів або систем high-content screening;
- приклад: HTNT (High Throughput Neutralization Test) для сказу на основі рекомбінантного вірусу ERA-GFP-NLS.

Тести з люциферазою:

- віруси експресують ферменти люциферази (firefly або Renilla);
- після інфікування додають субстрат люциферази, інтенсивність світіння пропорційна кількості інфікованих клітин;
- вимірювання проводиться на люмінометрі за лічені секунди;
- найвища пропускна здатність – до 384 зразків одночасно.

Переваги репортерних систем:

- об'єктивність (автоматизований підрахунок замість суб'єктивної мікроскопії);
- швидкість (результати за 18-24 години);
- висока пропускна здатність (сотні зразків на день);
- кількісні результати з широким динамічним діапазоном;
- можливість архівування зображень для подальшого аналізу.

Тести нейтралізації на псевдовірусні інфекції. Для роботи з високопатогенними вірусами (BSL-3/BSL-4) або вірусами, які складно культивувати, використовують псевдовіруси – нереплікативні вірусні вектори, що несуть поверхневі білки патогенного вірусу.

Принцип:

- створюють частки на основі лентівірусів (VSV, HIV) або ретровірусів (MLV), що містять ген люциферази або GFP;
- поверхню псевдовірусів прикрашають глікопротеїнами досліджуваного вірусу (наприклад, S-білок SARS-CoV-2, G-білок вірусу сказу);
- псевдовіруси можуть інфікувати клітини лише один раз (не реплікуються);
- нейтралізуючі антитіла блокують прикріплення псевдовірусів до клітин, зменшуючи люмінесценцію або флуоресценцію.

Переваги: безпека – не потребують BSL-3/BSL-4 лабораторій; швидкість та висока пропускна здатність; можливість швидко створювати псевдовіруси

для нових варіантів патогенів; стандартизація (псевдовіруси стабільніші за живі віруси).

Недоліки: результати можуть відрізнятися від тестів з живим вірусом; складність виробництва псевдовірусів; не завжди відображають усі аспекти нейтралізації живого вірусу.

3.7. Порівняльна характеристика імунологічних методів діагностики

Вибір оптимального методу діагностики залежить від багатьох факторів: мети дослідження, епідеміологічної ситуації, технічних можливостей лабораторії, кваліфікації персоналу та економічних міркувань. Кожен метод має свої переваги та обмеження, які необхідно враховувати при плануванні діагностичних досліджень. У практичній діагностиці часто застосовують комбінацію методів залежно від мети дослідження та епідеміологічної ситуації. Типовий алгоритм: спочатку скринінг за допомогою ІФА (висока чутливість), потім підтвердження позитивних результатів імуноблотингом або РЗК (висока специфічність). Така серійна стратегія тестування дозволяє оптимізувати співвідношення між точністю діагностики та економічними витратами. У таблиці наведено комплексне порівняння основних імунологічних методів, що дозволяє обрати найбільш підходящий підхід для конкретної діагностичної задачі.

Порівняльна характеристика імунологічних методів діагностики

Метод	Оптимальне застосування	Переваги	Недоліки	Практичний приклад
Імуно-ферментний аналіз (ІФА/ELISA)	– масовий скринінг – кількісне визначення антитіл – стандартизовані дослідження – висока пропускна здатність	– автоматизація процесу – об'єктивна оцінка результатів – кількісний аналіз – стандартизовані набори – 50–100 зразків за 3–4 год	– потребує обладнання – не для польових умов – високі початкові витрати	Скринінг дійного стада на лейкоз ВРХ – одночасне тестування 200–500 тварин
Імуно-блотинг (Western blot)	– підтвердження результатів ІФА – диференціація специфічних антитіл – виявлення антитіл до окремих білків	– висока специфічність – аналіз спектру антитіл – виявлення маркерних білків – диференціація інфекції/вакцинації	– технічно складний – дорогий – низька пропускна здатність – потребує кваліфікованого персоналу	Підтвердження діагнозу лейкозу ВРХ – виявлення антитіл до специфічних білків вірусу (gp51, p24)

	– арбітражні дослідження		– суб'єктивна інтерпретація	
Реакції нейтралізації (РН)	– оцінка протективного імунітету – ефективність вакцинації – диференціація вірусних штамів – «золотий стандарт» при валідації	– функціональна оцінка антитіл – висока специфічність – корелює з захисним імунітетом – можливість типування	– дуже трудомісткий – потребує культур клітин – вимагає біобезпеки – 3–7 днів на результат – висока вартість – 5–10 зразків/день	Оцінка поствакцинального імунітету проти сказу – титр нейтралізуючих антитіл як критерій ефективності
Імунохроматографічний аналіз (експрес-тести)	– швидка польова діагностика – індивідуальне тестування – попередня оцінка – скринінг при торгівлі	– результат за 5–15 хв – не потребує обладнання – простий у виконанні – мінімальна підготовка персоналу – на фермі	– нижча чутливість і специфічність – тільки якісний результат (+/-) – не для масового скринінгу – дорого при великих обсягах – потребує підтвердження	Експрес-діагностика бруцельозу при купівлі-продажу – швидка перевірка перед транспортуванням
Реакція імунофлуоресценції (РІФ)	– візуалізація збудника в тканинах – підтвердження діагнозу – типування мікроорганізмів – дослідницькі цілі	– висока специфічність – візуальна оцінка локалізації – можливість диференціації – швидкість (2–3 год)	– потребує флуоресцентний мікроскоп – суб'єктивна інтерпретація – вимагає досвіду – не для рутинної діагностики	Підтвердження діагнозу сказу – виявлення антигену вірусу в зрізах головного мозку

Кожен метод має свою сферу застосування. ІФА залишається основним методом для масового скринінгу завдяки поєднанню високої пропускну здатності, автоматизації та прийнятної вартості. Імуноблотинг та РН використовують як підтверджувальні методи, коли потрібна максимальна специфічність. ІХА тести незамінні для швидкої діагностики в польових умовах, незважаючи на нижчу точність.

РОЗДІЛ 4. ВАЛІДАЦІЯ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТІВ

4.1. Загальні принципи валідації

Валідація діагностичного тесту – це систематичний процес документування того, що тест відповідає встановленим критеріям якості та придатності для конкретного застосування. Цей процес є обов'язковою вимогою міжнародних стандартів (WOAH, ISO 17025) та національних нормативних документів. Валідований тест забезпечує надійну основу для прийняття рішень у ветеринарній медицині – від діагностики хвороб в окремих тварин до епідеміологічного нагляду за популяціями.

Мета та завдання валідації

Мета валідації – підтвердити, що діагностичний тест надійно виконує свою функцію в передбачуваних умовах використання.

Завдання валідації включають:

- встановлення аналітичних характеристик – визначення меж виявлення, специфічності до цільового аналіту, відтворюваності результатів;
- встановлення діагностичних характеристик – визначення діагностичної чутливості (DSe) та специфічності (DSp) на репрезентативних популяціях тварин;
- підтвердження відтворюваності – перевірка стабільності результатів при багаторазовому виконанні в одній лабораторії та при міжлабораторному порівнянні;
- визначення придатності для конкретного застосування – оцінка, чи відповідає тест вимогам для скринінгу, підтвердження, моніторингу або інших цілей;
- документування всіх аспектів – створення повної доказової бази, що підтверджує надійність тесту.

Валідація не є разовою процедурою. Тест потребує ревалідації при зміні призначення, переносі в іншу лабораторію, модифікації протоколу або зміні реагентів. Крім того, ефективність валідованого тесту необхідно постійно моніторити в процесі рутинного використання через систему контролю якості.

Етапи валідації. Згідно з рекомендаціями WOAH (Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин), валідаційний процес складається з чотирьох послідовних етапів. Кожен етап має чіткі цілі та критерії оцінки.

Етап 1: Аналітичні характеристики. На цьому етапі оцінюють технічні можливості методу незалежно від біологічного контексту. Визначають:

- аналітичну чутливість (ASe) – найнижча концентрація аналіту, яку може виявити тест (межа виявлення, LOD);
- аналітичну специфічність (ASp) – здатність тесту виявляти саме цільовий аналіт без перехресної реактивності з подібними речовинами;
- повторюваність (repeatability) – узгодженість результатів при повторних вимірюваннях одного зразка в межах одного циклу аналізу;
- внутрішньолабораторну відтворюваність – узгодженість результатів між різними циклами аналізу, виконаними в різний час одним оператором або різними операторами;
- лінійність – залежність сигналу від концентрації аналіту в робочому діапазоні;
- точність (accuracy) – близькість результату до справжнього значення.

Практичний приклад: для ІФА на антитіла до вірусу лейкозу ВРХ визначають, що межа виявлення становить 0,05 OD₄₅₀ (аналітична чутливість), тест не реагує з антитілами до вірусу імунодефіциту або інфекційного ринотрахеїту (аналітична специфічність), коефіцієнт варіації при повторних вимірюваннях не перевищує 10% (повторюваність).

Етап 2: Діагностичні характеристики. Найважливіший етап валідації – визначення здатності тесту правильно класифікувати тварин як інфікованих або неінфікованих. Встановлюють:

- діагностичну чутливість (DSe) – частка справді інфікованих тварин, які дають позитивний результат тесту (здатність виявляти хворих);
- діагностичну специфічність (DSp) – частка справді неінфікованих тварин, які дають негативний результат (здатність правильно визначати здорових);
- позитивну прогностичну цінність (PPV) – ймовірність того, що тварина з позитивним результатом дійсно інфікована;
- негативну прогностичну цінність (NPV) – ймовірність того, що тварина з негативним результатом дійсно здорова;
- відношення правдоподібності – додатковий показник, що поєднує чутливість та специфічність.

Діагностичні характеристики визначають на репрезентативних панелях зразків від тварин з відомим інфекційним статусом. Кількість зразків залежить від бажаного рівня достовірності оцінок. Наприклад, для встановлення DSe = 95% з довірчим інтервалом 95% та допустимою похибкою ±5% необхідно протестувати щонайменше 73 зразки від інфікованих тварин.

Етап 3: Міжлабораторна відтворюваність. Перевіряють, чи можна отримати однакові результати при виконанні тесту в різних лабораторіях. Це особливо важливо для:

- комерційних діагностичних наборів, які використовуються в багатьох лабораторіях;
- офіційних методів, що застосовуються в міжнародній торгівлі;
- референтних методів для порівняльних досліджень.

Організують порівняльні випробування (ring trials), в яких 5–10 лабораторій тестують ідентичні панелі зразків. Аналізують узгодженість результатів між лабораторіями за допомогою статистичних методів (коефіцієнт каппа Коена, інтракласовий коефіцієнт кореляції).

Етап 4: Впровадження та моніторинг. Після успішної валідації тест впроваджують в рутинну практику. На цьому етапі:

- розробляють стандартні операційні процедури (СОП);
- навчають персонал;
- впроваджують систему внутрішнього контролю якості (контрольні карти, контрольні зразки);
- беруть участь у програмах зовнішньої оцінки якості;
- періодично переоцінюють характеристики тесту на накопичених даних.

4.1.3. Документування валідації

Документування є невід'ємною частиною валідації. Без належної документації валідація не може вважатися завершеною. Документація повинна бути достатньо детальною, щоб інший кваліфікований фахівець міг відтворити всі етапи валідації.

Протокол валідації. Складається до початку валідаційних досліджень і включає:

- мету валідації – чітке формулювання призначення тесту та цільової популяції;
- опис методу – принцип тесту, формат, реагенти, обладнання;
- план валідаційних досліджень – які характеристики визначатимуться;
- критерії прийнятності – мінімальні значення DSe, DSp, CV;
- графік виконання робіт.

Звіт про валідацію. Складається після завершення валідаційних досліджень:

- опис виконаних досліджень – детальний опис методології;
- результати – первинні дані, таблиці, графіки, статистика;
- встановлені характеристики – DSe, DSp з довірчими інтервалами;
- обмеження методу – інтерференції, перехресні реакції;
- висновки – придатність для заявленого призначення;
- рекомендації щодо використання.

Супровідна документація:

- стандартна операційна процедура (СОП);

- специфікації реагентів та обладнання;
- характеристика референтних зразків;
- первинні записи – журнали, роздруківки.

Приклад: валідаційний звіт для ІФА на бруцельоз: протокол з планом на 150 позитивних і 300 негативних зразків, DSe = 98,0% (95% ДІ: 93,9–99,6%), DSp = 99,3% (95% ДІ: 97,6–99,9%), СОП, міжлабораторні випробування в інших лабораторіях ($\kappa = 0,89$).

4.1.1. Аналітичні характеристики

Аналітичні характеристики визначають технічні можливості тесту незалежно від біологічного контексту. Вони описують, наскільки добре метод може виміряти цільовий аналіт (антитіла) у зразку за ідеальних умов. Встановлення аналітичних характеристик є першим обов'язковим етапом валідації згідно з рекомендаціями WOAH.

Аналітична специфічність та чутливість

Аналітична специфічність (ASp) – це здатність тесту виявляти саме цільовий аналіт без перехресної реактивності з подібними речовинами або спорідненими збудниками. ASp відповідає на запитання: «Чи виявляє тест тільки те, що повинен виявляти?»

Визначення ASp проводять шляхом тестування сироваток від тварин, інфікованих спорідненими патогенами:

- тестують зразки від тварин, інфікованих спорідненими видами збудників (наприклад, при розробці тесту на бруцельоз перевіряють перехресну реакцію з *Yersinia enterocolitica* O:9);
- тестують зразки з високими титрами неспецифічних антитіл (ревматоїдний фактор, гетерофільні антитіла);
- перевіряють вплив екзогенних факторів – неспецифічне зв'язування сироватки з пластиком, стеричні перешкоди при блокуванні;
- для ІФА перевіряють мінімум 30 зразків від тварин, інфікованих спорідненими патогенами.

Практичний приклад: ІФА на антитіла до вірусу лейкозу ВРХ тестували на 50 зразках від корів, інфікованих вірусом імунодефіциту ВРХ, та 30 зразках від корів з високими титрами ревматоїдного фактору. ASp = 100% (жодної перехресної реакції).

Аналітична чутливість (ASe) є синонімом нижньої межі виявлення (LOD, Limit of Detection) – це найнижча концентрація аналіту, яку тест може надійно виявити. ASe відповідає на запитання: «Яка мінімальна кількість антитіл, яку може виявити тест?»

Різні типи імунологічних методів мають різні межі виявлення антитіл:

- радіальна імунодифузія – 1000 нг/мл;
- імунофлуоресценція – 100 нг/мл;
- ІФА – 1–10 нг/мл;
- хемілюмінесценція – 0,01 нг/мл.

Визначення LOD:

- готують серію розведень позитивного зразка (бажано 10 розведень у діапазоні \log_2);
- кожне розведення тестують у 10 повторях;
- LOD визначають як найнижчу концентрацію, при якій 95% реплікацій дають позитивний результат;
- альтернативно: LOD = середнє негативних зразків + 3SD.

Практичний приклад: Для ІФА на бруцельоз: середнє OD негативних зразків = 0,080, SD = 0,015. LOD = 0,080 + 3×0,015 = 0,125 OD₄₅₀.

Відтворюваність (повторюваність) – це узгодженість результатів при повторних вимірюваннях одного і того ж зразка в межах одного циклу аналізу одним оператором. Відповідає на запитання: «Наскільки близькі результати при багаторазовому тестуванні одного зразка?»

Визначення відтворюваності:

- відбирають 3–5 зразків, що охоплюють робочий діапазон тесту (низький позитивний, середній, високий);
- кожен зразок тестують у 10 повторях у межах одного циклу аналізу;
- розраховують середнє значення (mean), стандартне відхилення (SD) та коефіцієнт варіації (CV).

Розрахунок коефіцієнта варіації (CV):

$$CV (\%) = \frac{SD}{\text{середнє значення}} \times 100\%$$

Критерії прийнятності:

- CV < 10% – відмінна повторюваність;
- CV 10–15% – прийнятна повторюваність;
- CV > 15% – незадовільна повторюваність (за винятком дуже низьких позитивних зразків біля порогу виявлення).

Приклад: слабкий позитивний контроль ІФА на бруцельоз: 10 повторів дали OD = 0,285, 0,298, 0,276, 0,290, 0,282, 0,295, 0,288, 0,279, 0,291, 0,286. Середнє = 0,287, SD = 0,007, CV = 2,4% – відмінна повторюваність.

Внутрішньолабораторна відтворюваність – це узгодженість результатів між різними циклами аналізу, виконаними в різний час, різними операторами або з різними серіями реагентів у межах однієї лабораторії.

Відповідає на запитання: «Чи отримаємо ми однакові результати завтра, наступного тижня, з іншими реагентами?»

Визначення внутрішньолабораторної відтворюваності:

- відбирають 3–5 контрольних зразків (низький, середній, високий);
- тестують їх щонайменше в 20 різних циклах протягом 2–3 місяців;
- варіюють умови: різні оператори, час дня, серії реагентів;
- розраховують загальний CV між циклами (between-run CV);
- критерій прийнятності: CV між циклами < 15–20%.

Контрольні карти Шухарта. Для постійного моніторингу внутрішньолабораторної відтворюваності використовують контрольні карти Шухарта:

- будують графік значень контрольних зразків у часі (вісь X – номер циклу, вісь Y – виміряне значення);
- на основі перших 20–30 циклів визначають середню лінію (mean) та контрольні межі;
- попереджувальні межі: $\pm 2SD$ від середнього (95% довірчий інтервал);
- критичні межі: $\pm 3SD$ від середнього (99,7% довірчий інтервал);
- цикл аналізу відхиляють, якщо: (а) один контроль виходить за $\pm 3SD$, або (б) два контролю виходять за $\pm 2SD$, або (в) спостерігається тренд (6 послідовних точок зростають/спадають).

Приклад: слабкий позитивний контроль ІФА протягом 25 циклів: середнє = 0,285, SD = 0,015. Межі: $\pm 2SD$ (0,255–0,315), $\pm 3SD$ (0,240–0,330). У циклі №23 контроль показав 0,235 (нижче $-3SD$) → цикл відхилено, перевірено реагенти, виявлено проблему з промивним буфером.

Міжлабораторна відтворюваність. Це узгодженість результатів при виконанні тесту в різних лабораторіях з використанням ідентичних протоколів, реагентів та контролів. Відповідає на запитання: «Чи отримають інші лабораторії такі самі результати?»

Міжлабораторна відтворюваність є обов'язковою для:

- комерційних діагностичних наборів перед виходом на ринок;
- методів, що рекомендуються ВОАН для міжнародної торгівлі;
- референтних методів національних лабораторій;
- валідації методів для акредитації згідно ISO/IEC 17025.

Організація порівняльних випробувань:

- залучають 5–10 лабораторій (мінімум 5 для статистичної значущості);
- готують панель з 15–20 зразків, що охоплюють весь діапазон реактивності (негативні, слабкі позитивні, сильні позитивні);
- всі лабораторії отримують зразки з однієї серії, заморожені аліквоти;
- всі використовують однаковий протокол та реагенти (бажано з однієї серії);

- кожна лабораторія тестує панель мінімум у двох незалежних циклах;
- результати надсилають координатору для статистичного аналізу.

Статистичний аналіз міжлабораторних даних:

1. Для якісних результатів (позитивний/негативний): розраховують коефіцієнт каппа Коена (κ) для оцінки узгодженості між лабораторіями. Інтерпретація: $\kappa > 0,8$ – відмінна узгодженість, $0,6-0,8$ – добра, $0,4-0,6$ – помірна, $< 0,4$ – незадовільна.

2. Для кількісних результатів: розраховують міжлабораторний коефіцієнт варіації (between-laboratory CV) та інтракласовий коефіцієнт кореляції (ICC). Критерій прийнятності: міжлабораторний CV $< 20-25\%$, ICC $> 0,75$.

3. Виявляють лабораторії-викиди (outliers) за критеріями Кохрана або Граббса.

4. Аналізують джерела варіабельності (ANOVA): варіація між лабораторіями порівняно з варіацією між зразками.

Приклад: порівняльні випробування для ІФА на бруцельоз: 7 лабораторій, панель 18 зразків. Якісні результати: узгодженість 94,4% ($\kappa = 0,87$ – відмінна). Кількісні дані: міжлабораторний CV = 18,2%, ICC = 0,82. Одна лабораторія показала систематично завищені результати (виявлено викид за Граббсом) – після перевірки виявили помилку в калібруванні спектрофотометра.

Лінійність – це здатність тесту давати результати, які прямо пропорційні концентрації аналіту в заданому діапазоні. Ідеальна лінійна залежність означає: подвоєння концентрації антитіл дає подвоєння сигналу (OD, флуоресценція тощо).

Визначення лінійності:

- готують серію послідовних розведень високопозитивного зразка (7–10 розведень, наприклад: нерозведений, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64);
- кожне розведення тестують у трикратній повторності;
- будують графік залежності виміряного сигналу (Y) від очікуваної концентрації (X);
- проводять лінійний регресійний аналіз: $Y = a + bX$;
- розраховують коефіцієнт детермінації R^2 (показує, яка частка варіабельності Y пояснюється X);
- критерій прийнятності: $R^2 > 0,95$ (бажано $R^2 > 0,98$).

Важливо: для ІФА часто спостерігається нелінійність при дуже високих концентраціях (ефект насичення, «hook effect») і при дуже низьких (шум

перевищує сигнал). Тому лінійність визначають у робочому діапазоні, виключаючи крайні точки.

Робочий діапазон – це інтервал концентрацій аналіту, в межах якого тест дає точні та прецизійні результати з прийнятною лінійністю. Робочий діапазон обмежений:

- знизу – межею виявлення (LOD);
- зверху – точкою насичення або межею лінійності.

Для різних імунологічних методів робочий діапазон відрізняється. Радіальна імунодифузія – 1–1,5 логарифмічні одиниці (10-кратна різниця); ІФА – 2–3 логарифмічні одиниці (100–1000-кратна різниця); хемілюмінесценція – 4–5 логарифмічних одиниць (10000–100000-кратна різниця).

Приклад: непрямий ІФА на антитіла до бруцел. Високопозитивний зразок (OD = 2,450) розвели до 1:128. Побудували калібрувальну криву для розведень 1:2 – 1:64. Лінійна регресія: $Y = 0,085 + 1,952 \times \log(\text{розведення})$, $R^2 = 0,987$. Робочий діапазон: від порогу (OD = 0,250) до насичення (OD \approx 2,2), що відповідає діапазону концентрацій у 88 разів ($\log_2 \approx 6,5$).

Точність – це близькість результату вимірювання до справжнього (референтного) значення аналіту. Точність відповідає на запитання: «Наскільки правильно тест вимірює концентрацію антитіл?»

Точність включає дві компоненти:

- правильність (trueness) – відсутність систематичної похибки (bias). Показує, наскільки середнє значення багатьох вимірювань близьке до справжнього значення;
- прецизійність (precision) – відсутність випадкових похибок. Показує розкид результатів при повторних вимірюваннях (це те саме, що повторюваність).

Ідеальний тест має одночасно високу правильність (немає зміщення) та високу прецизійність (малий розкид).

Визначення точності

Метод 1: використання сертифікованих референтних матеріалів (CRM):

- тестують міжнародні або національні референтні стандарти з атестованою концентрацією антитіл;
- кожен стандарт вимірюють у 10 повторях;
- порівнюють виміряну концентрацію зі справжньою (атестованою);
- розраховують відсоток відновлення (recovery):

Відсоток відновлення (%) = (виміряне значення / справжнє значення) × 100%

Критерії прийнятності: відсоток відновлення 90–110% (відмінна точність), 80–120% (прийнятна точність).

Метод 2: експеримент з додаванням відомих концентрацій (spike recovery):

- до негативного зразка додають відому кількість позитивного стандарту;
- вимірюють концентрацію в суміші;
- порівнюють виміряне з очікуваним (сума базової концентрації + додана кількість);
- розраховують recovery для різних рівнів додавання (низький, середній, високий).

Метод 3: порівняння з референтним методом:

- тестують панель зразків ($n = 40-100$) паралельно новим методом та золотим стандартом;
- будують графік кореляції (regression plot): вісь X – референтний метод, вісь Y – новий метод;
- ідеальна лінія: $Y = X$ (slope = 1, intercept = 0);
- оцінюють slope (нахил) та intercept (зміщення): slope 0,9–1,1 і intercept близький до 0 свідчать про хорошу точність.

Практичний приклад: новий ІФА на бруцельоз порівняли з референтним ІФА WOAH. Тестували 50 зразків. Лінійна регресія: $Y(\text{новий}) = 0,05 + 0,98 \times X(\text{референтний})$, $R^2 = 0,94$. Slope = 0,98 (близько до 1), intercept = 0,05 (близько до 0) – хороша точність. Середній recovery = 102%, діапазон 95–108%.

Невизначеність вимірювання (Measurement Uncertainty, MU)

Згідно з міжнародним стандартом ISO/IEC 17025:2017, акредитовані випробувальні лабораторії повинні оцінювати та повідомляти невизначеність вимірювання для всіх кількісних тестів.

Невизначеність вимірювання – це параметр, що характеризує розкид значень, які можна обґрунтовано приписати вимірюваній величині. Простіше кажучи: це діапазон, у якому знаходиться справжнє значення аналіту з певною ймовірністю (зазвичай 95%).

Наприклад, результат вимірювання $OD = 0,285 \pm 0,030$ означає, що справжнє значення OD знаходиться в діапазоні 0,255–0,315 з ймовірністю 95%.

Джерела невизначеності

Невизначеність вимірювання накопичується з багатьох джерел:

- відбір проби – варіабельність між аліквотами одного зразка;
- зберігання – деградація аналіту при заморожуванні/розморожуванні;
- підготовка зразка – помилки розведення, піпетування;
- реагенти – варіабельність між серіями, нестабільність;
- обладнання – калібрування спектрофотометра, точність піпеток;
- умови середовища – температура, вологість;

- оператор – міжоператорна варіабельність;
- метод вимірювання – власна невизначеність методу.

Розрахунок MU: підхід «зверху вниз» (top-down)

Це найпростіший та найпоширеніший підхід для серологічних тестів. Він використовує дані з контрольних карт, які накопичуються в процесі рутинного використання тесту.

Покрокова процедура:

Крок 1. Вибір контрольного зразка: використовують слабкий позитивний контроль, значення якого знаходиться близько до порогу відсікання (cut-off). Чому саме біля порогу? Тому що саме в цій зоні невизначеність найбільш критична для інтерпретації результату (позитивний чи негативний).

Крок 2. Збір даних: тестують цей контроль щонайменше в 20–30 незалежних циклах аналізу протягом 2–3 місяців. Варіюють умови: різні дні, різні оператори, різні серії реагентів (у межах одного методу).

Крок 3. Розрахунок стандартного відхилення: розраховують середнє значення (mean) та стандартне відхилення (SD) для всіх вимірювань контрольного зразка.

Крок 4. Розрахунок розширеної невизначеності:

$$MU = k \times SD$$

де k – коефіцієнт охоплення. Для 95% довірчого інтервалу $k = 2$.

Крок 5. Вираження результату: результат вимірювання виражають як: виміряне значення \pm MU.

$$MU = 2 \times SD$$

Приклад: ІФА на бруцельоз. Слабкий позитивний контроль тестували в 25 циклах протягом 3 місяців. Дані OD₄₅₀: 0,285, 0,298, 0,276, 0,290, 0,282, 0,295, 0,288, 0,279, 0,291, 0,286, ... (25 значень). Середнє = 0,285, SD = 0,015. MU = 2 × 0,015 = 0,030. Результат виражають як: 0,285 ± 0,030 OD (діапазон 0,255–0,315).

Інтерпретація з урахуванням MU:

Припустимо, поріг відсікання (cut-off) = 0,250 OD. Як інтерпретувати зразок з результатом 0,270 ± 0,030?

Нижня межа: 0,270 - 0,030 = 0,240 (нижче порогу) → можливий негативний;

Верхня межа: 0,270 + 0,030 = 0,300 (вище порогу) → можливий позитивний;

Висновок: результат неоднозначний (сумнівний), потрібне повторне тестування або підтвердження іншим методом.

А якщо результат $0,320 \pm 0,030$? Нижня межа $0,290$ все одно вище порогу $0,250 \rightarrow$ однозначно позитивний навіть з урахуванням невизначеності.

Оцінка MU важлива для:

- зразків, що знаходяться близько до порогу відсікання – саме тут невизначеність критична для рішення;
- акредитації лабораторій – ISO/IEC 17025 вимагає оцінки та повідомлення MU;
- міжлабораторних порівнянь – MU допомагає зрозуміти, чи різниця між лабораторіями реальна, чи в межах невизначеності;
- встановлення «сірої зони» – діапазону значень навколо cut-off, де результати вважаються сумнівними.

Аналітичні характеристики (ASp, ASe, повторюваність, відтворюваність, лінійність, точність, MU) є технічним фундаментом валідації. Вони показують, наскільки добре тест працює «в ідеальних умовах». Однак для остаточної оцінки придатності тесту для діагностики необхідно також визначити діагностичні характеристики (DSe, DSp) на репрезентативних популяціях тварин, що буде описано у наступному підрозділі.

4.1.2. Діагностичні характеристики

Діагностичні характеристики визначають здатність тесту правильно класифікувати тварин за їхнім інфекційним статусом у реальних умовах. На відміну від аналітичних характеристик, які оцінюють технічні можливості методу, діагностичні характеристики показують клінічну цінність тесту для прийняття рішень у ветеринарній практиці.

Діагностична чутливість (Diagnostic Sensitivity, DSe) – це частка справді інфікованих тварин, які дають позитивний результат тесту. DSe відповідає на запитання: «З якою ймовірністю тест виявить інфікованих тварин?»

$$DSe = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%$$

де TP (True Positive) – істинно позитивні (інфіковані тварини з позитивним результатом);

FN (False Negative) – хибно негативні (інфіковані тварини з негативним результатом).

Класифікації результатів (таблиця 2×2):

	Інфіковані	Неінфіковані
Тест позитивний	TP (істинно позитивні)	FP (хибно позитивні)
Тест негативний	FN (хибно негативні)	TN (істинно негативні)

Практичний приклад: Тестували 100 корів, інфікованих бруцелами (підтверджено культуральним методом). З них 95 дали позитивний результат в ІФА, 5 – негативний. $DSe = 95/(95+5) \times 100\% = 95\%$.

Інтерпретація DSe:

- DSe > 95% – відмінна чутливість, рекомендується для скринінгових програм;
- DSe 90–95% – добра чутливість, прийнятна для більшості цілей;
- DSe < 90% – недостатня чутливість, значна кількість інфікованих тварин буде пропущена.

Фактори, що впливають на DSe:

- стадія інфекції – на ранній стадії (до сероконверсії) або при хронічному перебігу з низьким титром антитіл DSe знижується;
- імунний статус тварини – імунодефіцитні стани, старість, вагітність можуть знижувати імунну відповідь;
- штам патогену – різні штами можуть викликати різну за інтенсивністю імунну відповідь;
- вид тварини – тест, валідований на одному виді, може мати іншу DSe на іншому виді;
- поріг відсікання (cut-off) – зниження порогу підвищує DSe, але знижує DSp (і навпаки).

Визначення необхідного розміру вибірки для DSe. Для статистично значущої оцінки DSe потрібна достатня кількість зразків від інфікованих тварин. Розмір вибірки залежить від бажаного рівня DSe, довірчого інтервалу (ДІ) та допустимої похибки.

Приклади розрахунку (для 95% ДІ):

- DSe = 95%, допустима похибка $\pm 5\%$ → потрібно 73 інфікованих тварини;
- DSe = 95%, допустима похибка $\pm 3\%$ → потрібно 203 інфіковані тварини;
- DSe = 99%, допустима похибка $\pm 1\%$ → потрібно 380 інфікованих тварин.

Важливо: для високопатогенних хвороб (ящур, чума свиней) необхідна максимальна DSe (>99%) з мінімальною допустимою похибкою, щоб не пропустити жодної інфікованої тварини. Для менш небезпечних інфекцій прийнятна DSe 90–95%.

Діагностична специфічність (DSp, Diagnostic Specificity) – це частка справді неінфікованих тварин, які дають негативний результат тесту. DSp

відповідає на запитання: «З якою ймовірністю тест правильно ідентифікує здорових тварин?».

Формула розрахунку діагностичної специфічності (D_{Sp}):

$$D_{Sp} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\%$$

де: TN (True Negative) – істинно негативні (неінфіковані тварини з негативним результатом);

FP (False Positive) – хибно позитивні (неінфіковані тварини з позитивним результатом).

Практичний приклад: Тестували 500 корів із благополучного щодо бруцельозу стада (підтверджено епідеміологічними даними та відсутністю клінічних ознак). З них 495 дали негативний результат, 5 – позитивний. $D_{Sp} = 495/(495+5) \times 100\% = 99,0\%$.

Інтерпретація D_{Sp}:

- $D_{Sp} > 99\%$ – відмінна специфічність, рекомендується для підтверджувальних тестів;
- $D_{Sp} 95\text{--}99\%$ – добра специфічність, прийнятна для більшості цілей;
- $D_{Sp} < 95\%$ – недостатня специфічність, значна кількість здорових тварин буде хибно класифікована як інфіковані.

Фактори, що впливають на D_{Sp}:

- перехресні реакції – наявність антитіл до спорідненого патогену (наприклад, *Yersinia enterocolitica* O:9 при тестуванні на бруцельоз);
- неспецифічні фактори – ревматоїдний фактор, гетерофільні антитіла, автоантитіла;
- вакцинація – поствакцинальні антитіла можуть давати позитивні результати (проблема для тестів без DIVA-концепції);
- материнські антитіла – у молодняку можуть зберігатися до 6–8 місяців;
- поріг відсікання – підвищення порогу збільшує D_{Sp} , але знижує D_{Se} .

Визначення необхідного розміру вибірки для D_{Sp}. Для підтверджувальних тестів зазвичай потрібна вища D_{Sp} і більший розмір вибірки неінфікованих тварин. Приклади (для 95% ДІ):

- $D_{Sp} = 95\%$, допустима похибка $\pm 2\%$ → потрібно 457 неінфікованих тварин;
- $D_{Sp} = 99\%$, допустима похибка $\pm 1\%$ → потрібно 372 неінфіковані тварини;
- $D_{Sp} = 99,5\%$, допустима похибка $\pm 0,5\%$ → потрібно 761 неінфікована тварина.

DSe та DSp зазвичай обернено пропорційні – підвищення одного параметра призводить до зниження іншого. Це досягається зміною порогу відсікання (cut-off). Вибір оптимального балансу залежить від мети тесту:

1. Скринінгові тести: пріоритет – висока DSe (>95%), щоб не пропустити інфікованих. DSp може бути помірною (90–95%). Всі позитивні результати підтверджують іншим тестом з високою DSp.

2. Підтверджувальні тести: пріоритет – висока DSp (>99%), щоб мінімізувати хибнопозитивні результати. DSe може бути дещо нижчою.

3. Програми ерадикації (пізня стадія): максимальна DSp критична, щоб уникнути непотрібного забою здорових тварин при низькій поширеності.

4. Оцінка поширеності: збалансовані DSe та DSp (~95% обидва) дають найточнішу оцінку справжньої поширеності.

ROC-аналіз (Receiver Operating Characteristic). Для визначення оптимального порогу відсікання використовують ROC-криву, яка показує залежність між DSe (чутливість) та частотою хибнопозитивних результатів (1-DSp) при різних значеннях cut-off. Оптимальна точка – це компроміс між максимальною DSe та DSp. Площа під ROC-кривою (AUC – Area Under Curve) показує загальну діагностичну ефективність: AUC > 0,9 – відмінний тест, 0,8–0,9 – добрий, 0,7–0,8 – прийнятний, < 0,7 – низька діагностична цінність.

Позитивна та негативна прогностична цінність

Прогностичні цінності показують ймовірність того, що результат тесту відповідає дійсному інфекційному статусу тварини. На відміну від DSe та DSp, які є характеристиками самого тесту, прогностичні цінності залежать від поширеності інфекції в популяції.

Позитивна прогностична цінність (Positive Predictive Value, PPV) – це ймовірність того, що тварина з позитивним результатом тесту дійсно інфікована. PPV відповідає на запитання: «Якщо тест позитивний, наскільки я можу бути впевнений, що тварина справді хвора?»

Формула:

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP} \times 100\%$$

Негативна прогностична цінність (Negative Predictive Value, NPV) – це ймовірність того, що тварина з негативним результатом тесту дійсно неінфікована. NPV відповідає на запитання: «Якщо тест негативний, наскільки я можу бути впевнений, що тварина справді здорова?»

Формула:

$$NPV = \frac{TN}{TN + FN} \times 100\%$$

Вплив поширеності на прогностичні цінності. Прогностичні цінності не є константами тесту. Вони змінюються залежно від поширеності інфекції в популяції, навіть якщо DSe та DSр залишаються незмінними.

Практичний приклад №1 (висока поширеність 10%):

Тест з DSe = 99% та DSр = 99%.

Тестуємо 1000 тварин.

Інфіковані: 100 (10%).

Неінфіковані: 900 (90%).

Результати тесту: TP = $100 \times 0,99 = 99$;

FN = $100 \times 0,01 = 1$;

TN = $900 \times 0,99 = 891$;

FP = $900 \times 0,01 = 9$.

PPV = $99/(99+9) \times 100\% = 91,7\%$.

NPV = $891/(891+1) \times 100\% = 99,9\%$.

Інтерпретація: при поширеності 10% позитивний результат з ймовірністю 91,7% вказує на справжню інфекцію. Негативний результат майже завжди (99,9%) означає відсутність інфекції.

Практичний приклад №2 (низька поширеність 0,1%):

Той самий тест (DSe = DSр = 99%), але тестуємо популяцію з поширеністю 0,1%.

На 1000 тварин: інфіковані – 1, неінфіковані – 999.

TP = $1 \times 0,99 \approx 1$; FN ≈ 0 ;

TN = $999 \times 0,99 \approx 989$;

FP = $999 \times 0,01 \approx 10$.

PPV = $1/(1+10) \times 100\% \approx 9,1\%$.

NPV = $989/(989+0) \times 100\% \approx 100\%$.

Інтерпретація: при поширеності 0,1% лише 9,1% позитивних результатів відповідають справжній інфекції! З 11 позитивних тварин лише 1 дійсно інфікована, решта 10 – хибнопозитивні. Негативний результат практично гарантує відсутність інфекції.

Висновки з прикладів:

- при високій поширеності PPV високе – позитивному результату можна довіряти;
- при низькій поширеності PPV різко падає – більшість позитивних результатів будуть хибними;
- NPV майже завжди високе, особливо при низькій поширеності – негативному результату можна довіряти;
- для програм ерадикації на пізній стадії (поширеність < 1%) навіть тест з DSр = 99% дасть багато хибнопозитивних результатів.

Стратегії підвищення PPV при низькій поширеності:

- послідовне тестування: позитивні результати скринінгового тесту підтверджують тестом з високою DSp (>99,5%);
- підвищення порогу відсікання: жертвуємо DSe для підвищення DSp і PPV;
- повторне тестування: беруть новий зразок через 2–4 тижні – справжньо інфіковані знову дадуть позитивний результат;
- тестування на рівні стада: якщо хоча б одна тварина позитивна, тестують все стадо – збільшує ймовірність виявлення справжньої інфекції.

Відношення правдоподібності (Likelihood Ratio, LR) – це ще один спосіб оцінити діагностичну цінність тесту. На відміну від прогностичних цінностей, LR не залежить від поширеності і характеризує тільки сам тест.

Позитивне відношення правдоподібності (LR+). LR+ показує, у скільки разів ймовірність позитивного результату вища у інфікованих порівняно з неінфікованими.

Формула позитивного відношення правдоподібності:

$$LR+ = \frac{DSe}{1 - DSp}$$

Інтерпретація LR+:

- LR+ > 10 – позитивний результат дуже сильно підтверджує інфекцію;
- LR+ 5–10 – помірне підтвердження;
- LR+ 2–5 – слабке підтвердження;
- LR+ < 2 – майже не змінює ймовірність інфекції.

Негативне відношення правдоподібності (LR-). LR- показує, у скільки разів ймовірність негативного результату вища у інфікованих порівняно з неінфікованими.

Формула розрахунку негативного відношення правдоподібності:

$$LR- = \frac{1 - DSe}{DSp}$$

Інтерпретація LR-:

- LR- < 0,1 – негативний результат дуже сильно виключає інфекцію;
- LR- 0,1–0,2 – помірне виключення;
- LR- 0,2–0,5 – слабке виключення;
- LR- > 0,5 – майже не змінює ймовірність інфекції.

Практичний приклад: Тест на бруцельоз з DSe = 95%, DSp = 99%. LR+ = 0,95 / (1-0,99) = 0,95 / 0,01 = 95. LR- = (1-0,95) / 0,99 = 0,05 / 0,99 = 0,05. Інтерпретація: Позитивний результат у 95 разів більш ймовірний у інфікованих, ніж у здорових – сильне підтвердження. Негативний результат у 20 разів (1/0,05) більш ймовірний у здорових – сильно виключає інфекцію.

Переваги LR над прогностичними цінностями:

- LR не залежить від поширеності – це стабільна характеристика тесту;
- LR легко використовувати для послідовного тестування – можна комбінувати результати кількох тестів;
- LR дозволяє оцінити, наскільки результат тесту змінює ймовірність інфекції.

Діагностичні характеристики (DSe, DSp, PPV, NPV, LR) показують клінічну цінність тесту для прийняття рішень. DSe та DSp – це властивості тесту, PPV та NPV залежать від поширеності. Розуміння взаємозв'язку між цими параметрами критично важливе для правильної інтерпретації результатів, особливо в програмах ерадикації хвороб при низькій поширеності.

4.1.3. Вибір референтних зразків

Референтні зразки – це основа для визначення діагностичних характеристик тесту. Якість референтних зразків безпосередньо впливає на точність оцінок DSe та DSp. Неправильний вибір референтних зразків може призвести до переоцінки або недооцінки діагностичної ефективності тесту.

Референтний стандарт – це метод, який зі 100% точністю визначає інфекційний статус тварини. Однак в реальності такий метод існує рідко. Тому правильніше говорити про «референтний стандарт» різного рівня достовірності.

Типи референтних стандартів за WOAH:

1. Однозначний референтний стандарт

Це найвищий рівень достовірності. Включає виділення збудника та патогномонічну гістопатологію.

1. Виділення збудника здійснюється культуральним методом (бактерії), вірусною ізоляцією в культурі клітин або ПЛР з секвенуванням. Наприклад, виділення *Brucella spp.* з крові, лімфовузлів або плацентарних тканин є однозначним підтвердженням бруцельозу.

2. Патогномонічна гістопатологія – це специфічні морфологічні зміни, які однозначно вказують на конкретну інфекцію. Наприклад, тільця Негрі в нейронах є патогномонічною ознакою сказу.

Переваги однозначного референтного стандарту включають: максимальну впевненість в інфекційному статусі та мінімальну ймовірність помилкової класифікації.

Обмеження. Основні обмеження однозначного референтного стандарту полягають у наступному:

- зразки можуть бути взяті на ранній стадії інфекції, коли антитіла ще не виробилися, що призводить до хибнонегативного результату для

серологічного тесту. Наприклад, корова інфікована бруцелами 5 днів тому, культура позитивна, але антитіла ще не з'явилися – серологічний тест дасть негативний результат, хоча тварина інфікована, що занижує DSe;

- при хронічних інфекціях використання тільки тварин з підтвердженою культурою може завищити DSe, оскільки у них імунна відповідь завжди добре розвинена, тоді як в природних популяціях є тварини на різних стадіях інфекції;
- культуральні методи характеризуються складністю і вартістю: вони трудомісткі, довгі (2–6 тижнів для мікобактерій), вимагають суворого дотримання правил біобезпеки;
- для деяких інфекцій виділення збудника є неможливим або дуже складним, що обмежує доступність цього методу.

Приклад: Для валідації ІФА на туберкульоз ВРХ відібрали 80 корів з позитивною туберкуліновою пробою. При забої з 50 корів виділили *Mycobacterium bovis* (культура + гістопатологія) – це однозначні позитивні зразки. З 30 корів збудника не виділили, але були характерні гранульоми – це сумнівні зразки, які не включають в оцінку DSe.

2. Комбінований референтний стандарт

Комбінований референтний стандарт застосовується для негативних зразків, коли пряме виключення збудника неможливе.

Критерії відбору тварин як неінфікованих включають: географічну ізоляцію (тварини з регіонів, офіційно вільних від хвороби протягом багатьох років, наприклад відсутність бруцельозу в країні понад 10 років з постійним епіднаглядом), історію стада (закриті стада без введення нових тварин, без випадків хвороби, негативні результати попередніх тестувань протягом років), клінічний профіль (відсутність клінічних ознак, характерних для захворювання, таких як аборти, артрити, орхіти при бруцельозі), та багаторазове негативне тестування (мінімум 2–3 тести різними методами з інтервалом 3–6 місяців).

Обмеження комбінованого референтного стандарту полягають у тому, що неможливо бути абсолютно впевненими у відсутності інфекції – завжди є ймовірність прихованої інфекції. Це може занижувати DSp, якщо серед «негативних» зразків є приховані інфіковані. Крім того, метод вимагає ретельної документації епідеміологічної історії.

Приклад: для валідації ІФА на бруцельоз відібрали 500 корів з 10 благополучних щодо бруцельозу стад у Данії (країна офіційно вільна від бруцельозу з 1962 року). Додаткова перевірка: всі 500 зразків протестували

трьома незалежними методами (РБП, ІФА, СФТ) – усі результати були негативні. Ці зразки використані як негативний референтний стандарт.

3. Відносний референтний стандарт (порівняльна серологія)

Відносний референтний стандарт означає, що інфекційний статус тварин визначається на основі результатів іншого серологічного тесту (референтного методу).

Коли застосовується. Відносний референтний стандарт застосовується у наступних випадках: коли це єдине практичне джерело референтного матеріалу для нових серологічних тестів, коли виділення збудника неможливе або дуже складне (хронічні інфекції, внутрішньоклітинні патогени), або коли є визнаний міжнародний референтний метод WOAH з добре документованими DSe та DSp.

Вимоги до референтного тесту. Референтний тест повинен відповідати наступним вимогам: мати задокументовані, встановлені та прийнятні характеристики (DSe, DSp), бажано використовувати тест, рекомендований WOAH як референтний для даної хвороби, та базуватися на іншому принципі, ніж тест-кандидат, щоб уникнути однакових систематичних помилок.

Обмеження. Критичні обмеження відносного референтного стандарту полягають у тому, що референтний тест має власні хибнопозитивні та хибнонегативні результати, які передаються оцінкам DSe та DSp нового тесту. Якщо референтний тест має DSe = 95% і DSp = 98%, то частина «позитивних» зразків насправді будуть хибнопозитивними, а частина «негативних» – хибнонегативними. Це призводить до систематичного зміщення оцінок DSe та DSp нового тесту, найчастіше – до заниження обох параметрів.

Корекція похибки. Для корекції похибки референтного тесту можна застосувати: статистичні методи корекції (Bayesian latent class models), використання кількох референтних тестів одночасно для зниження похибки, або розширення панелі зразків з підгрупою, підтвердженою золотим стандартом.

Приклад: Розробляють новий конкурентний ІФА на бруцельоз. Як референтний метод використовують комплементзв'язуючий тест (СФТ) – рекомендований WOAH метод з DSe = 75% і DSp = 99%. Тестують 200 позитивних (за СФТ) і 400 негативних (за СФТ). Новий ІФА дає: на «позитивних» зразках – 165 позитивних (DSe = 82,5%), на «негативних» зразках – 8 позитивних (DSp = 98%). Однак справжні DSe та DSp будуть дещо інші через похибку СФТ. Для корекції додатково 50 позитивних зразків підтверджують культуральним методом.

4. Додатковий референтний стандарт (експериментальна інфекція)

Додатковий референтний стандарт передбачає, що тварин експериментально заражають відомим штамом патогену в контрольованих умовах.

Переваги експериментальної інфекції включають: 100% впевненість в інфекційному статусі (точно відомо, коли і чим заражені тварини), можливість моделювати динаміку інфекції та визначити «діагностичне вікно» (коли з'являються антитіла після інфікування), визначення кінетики антитільної відповіді (коли 25%, 50%, 75%, 100% інфікованих дають позитивний результат), та можливість порівняти різні штами, дози і шляхи зараження.

Обмеження. Експериментальні умови не відповідають природним через: штучно високі дози збудника, контрольовані шляхи зараження, використання SPF-тварин (вільних від патогенів) без супутніх інфекцій, та стандартизовані умови утримання. Це призводить до переоцінки DSe та DSp, оскільки імунна відповідь у експериментальних тварин сильніша і стандартніша, ніж у природно інфікованих.

Крім того, існує проблема статистичної незалежності: дані часових рядів (повторні зразки від тих самих тварин) не можна використовувати для розрахунку DSe/DSp, оскільки статистичні методи потребують незалежних спостережень. Також слід враховувати етичні обмеження на експериментальне зараження небезпечними патогенами.

Правила використання експериментальних зразків такі: валідація HE повинна ґрунтуватися виключно на експериментальних тваринах; експериментальні зразки можна використовувати для визначення діагностичного вікна, попереднього техніко-економічного обґрунтування або доповнення до польових зразків (але не їх заміни).

Обов'язково включати в панель польові зразки від природно інфікованих тварин. Для розрахунку DSe/DSp використовують один зразок від однієї тварини; якщо є часові ряди, вибирають один оптимальний момент (наприклад, пік антитільної відповіді). Необхідно документувати: штам збудника, дозу, шлях зараження, час відбору зразків після інфікування та походження тварин.

Приклад: для валідації ІФА на ящур експериментально заразили 20 свиней штамом O1 Manisa (10^5 TCID₅₀). Відбирали сироватки щодня протягом 30 днів. Результати показали, що антитіла з'являються у 25% тварин (5/20) на день 4, у 95% тварин (19/20) на день 7, у 100% тварин (20/20) на день 10, з піком на день 14. Для валідації DSe використали ТІЛЬКИ зразки з дня 14 від 20 тварин. Додатково включили 80 зразків від природно інфікованих свиней з польових спалахів (різні штами, різні стадії інфекції). Загалом сформували панель з 100 позитивних зразків (20 експериментальних + 80 польових).

Формування референтних панелей

Референтна панель – це набір зразків з відомим інфекційним статусом, що використовується для валідації тесту. Якість панелі визначає достовірність оцінок DSe та DSp.

Вимоги до репрезентативності панелі. Панель повинна представляти цільову популяцію, для якої призначений тест, і враховувати наступні фактори: види тварин (тест для ВРХ валідують на зразках від ВРХ, а не овець), породи (включають різні породи, якщо тест призначений для широкого використання), вік (молодняк, дорослі, старі тварини, оскільки імунна відповідь може відрізнятись), стадії інфекції (гостра, хронічна, носійство з різними титрами антитіл), штами патогену (різні серотипи і генотипи можуть давати різну імунну відповідь), географічне походження (тварини з різних регіонів можуть мати відмінності в експозиції до споріднених патогенів), та вакцинальний статус (невакциновані і вакциновані тварини, якщо тест має відрізнити вакцинацію від інфекції).

Структура панелі. Позитивна підпанель (інфіковані тварини) повинна включати мінімум 73 зразки для досягнення DSe = 95% (з 95% довірчим інтервалом і допустимою похибкою $\pm 5\%$), хоча бажано мати 100–200 зразків для більшої точності. Важливо включати зразки з різними титрами антитіл: сильнопозитивні (20–30% від загальної кількості), середньопозитивні (40–50%), та слабкопозитивні (20–30%), що є критично важливим для оцінки чутливості біля порогу відсікання.

Негативна підпанель (неінфіковані тварини) повинна включати мінімум 372 зразки для досягнення DSp = 99% (з 95% довірчим інтервалом і допустимою похибкою $\pm 1\%$), хоча бажано мати 400–500 зразків. Важливо включити тварини з перехресно реагуючими інфекціями (10–20% від загальної кількості), вакциновані тварини, якщо вакцинація поширена (10–15%), та тварини з високими титрами неспецифічних антитіл, таких як ревматоїдний фактор (5–10%).

Підготовка та зберігання зразків. Процедура підготовки та зберігання зразків включає наступні кроки: відбирають великий об'єм кожного зразка (мінімум 10 мл сироватки), розділяють на аліквоти по 0,1–0,5 мл і зберігають при температурі -20°C або нижче, одну аліквоту розморожують для експерименту і потім викидають (не перезаморожують), що забезпечує однакову кількість циклів заморожування-розморожування для всіх експериментів. Необхідно документувати дату відбору, вік тварини, клінічний статус, результати референтних тестів та умови зберігання.

Проблема недостатньої кількості зразків. Часто важко зібрати достатню кількість добре охарактеризованих зразків, особливо для рідкісних хвороб. Можливі рішення включають: тимчасову валідацію з

наявною кількістю зразків (провести валідацію, документувати обмеження, вказати ширші довірчі інтервали, що згідно WOAH є прийнятним як проміжний крок), поетапне нарощування панелі (після впровадження тесту накопичувати нові добре охарактеризовані зразки та періодично переоцінювати DSe/DSp), міжлабораторну співпрацю (об'єднання зусиль референтних лабораторій для створення спільних банків зразків), або використання моделей латентного класу (статистичні методи, що дозволяють оцінити DSe/DSp без золотого стандарту).

Моделі латентного класу (Latent Class Models)

Латентний клас (latent class) – це прихований інфекційний статус тварини, який неможливо спостерігати безпосередньо.

Моделі латентного класу (Latent class models, LCM) – це статистичні методи, що дозволяють оцінити діагностичні характеристики тестів без золотого стандарту, використовуючи результати двох або більше тестів.

Моделі латентного класу застосовуються у таких випадках: коли золотий стандарт відсутній або недоступний (культуральний метод неможливий для деяких патогенів), коли всі наявні референтні тести недосконалі (мають власні хибнопозитивні та хибнонегативні результати), коли потрібно одночасно оцінити DSe/DSp кількох нових тестів, або коли є підозра, що використовуваний референтний тест має значну похибку.

Принцип роботи моделей латентного класу полягає у наступному: тестують одну і ту саму панель зразків (мінімум 200–500) двома або більше тестами, аналізують узгодженість результатів між тестами, використовують Bayesian статистику для оцінки ймовірності приналежності кожного зразка до латентного класу (інфікований або неінфікований), та одночасно оцінюють DSe і DSp для кожного тесту.

Вимоги для застосування LCM. Для застосування моделей латентного класу необхідно виконати наступні вимоги: використовувати мінімум два тести (краще три або більше), забезпечити умовну незалежність тестів (помилки одного тесту не повинні корелювати з помилками іншого; наприклад, ІФА + культуральний метод є доброю комбінацією через різні принципи роботи, тоді як два різних ІФА на тому самому антигені є поганою комбінацією через можливість однакових джерел помилок), мати великий розмір вибірки (мінімум 200, бажано 500+ зразків), володіти експертними знаннями (а пріорі інформацією) про приблизний діапазон DSe/DSp для кожного тесту, та використовувати спеціалізоване програмне забезпечення (WinBUGS, OpenBUGS, JAGS або Stan).

Переваги моделей латентного класу включають: відсутність потреби у золотому стандарті, можливість корекції похибки референтного тесту, одночасну оцінку кількох тестів, та надання довірчих інтервалів для оцінок.

Обмеження методу полягають у: складності (потреба в експертизі з Bayesian статистики), залежності якості результатів від правильності припущень (незалежність тестів, а priori розподілів), необхідності великих вибірок (потрібно 500+ зразків для надійних оцінок), та можливості отримання неоднозначних результатів з широкими довірчими інтервалами при малих вибірках.

Приклад: оцінка ІФА на паратуберкульоз у ВРХ проводилася за умови, що золотий стандарт (культура *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) є дуже повільним (до 16 тижнів) і має низьку чутливість. Використали модель латентного класу: протестували 520 корів трьома тестами (новий ІФА, культуральний метод з фекалій, та ПЛР). Результати LCM показали наступне: для ІФА – DSe = 47% (95% ДІ: 38–57%), DSp = 99% (97–100%); для культури – DSe = 25% (18–34%), DSp = 100% (99–100%); для ПЛР – DSe = 55% (45–65%), DSp = 96% (93–98%). Висновок: культуральний метод («золотий стандарт») має найнижчу DSe серед усіх методів! Використання його як референта занижувало б оцінки DSe нових тестів.

Вибір референтних зразків є критичним етапом валідації діагностичних тестів. Золотий стандарт є ідеальним рішенням, але рідко доступний на практиці. Комбіновані та відносні стандарти є практичною альтернативою, але мають суттєві обмеження, які необхідно враховувати. Експериментальна інфекція корисна для техніко-економічного обґрунтування та визначення діагностичного вікна, але не може бути єдиною основою валідації через переоцінку діагностичних характеристик. Моделі латентного класу є потужним інструментом за відсутності золотого стандарту, але вимагають спеціальної експертизи та великих вибірок для отримання надійних результатів.

4.5. Міжлабораторна валідація

Міжлабораторна валідація – це оцінка відтворюваності (reproducibility) результатів тесту при виконанні в різних лабораторіях з використанням ідентичних протоколів, реагентів та контролів. Це критичний етап валідації, особливо для тестів, що призначені для широкого використання, міжнародної торгівлі або комерційних діагностичних наборів.

Основні цілі міжлабораторної валідації включають: підтвердження того, що тест дає узгоджені результати незалежно від місця виконання (різні лабораторії, регіони, країни), виявлення джерел варіабельності результатів

між лабораторіями (обладнання, оператори, умови середовища, інтерпретація результатів), встановлення реалістичних меж прийнятної варіабельності для контролю якості, гармонізацію методик між лабораторіями для забезпечення порівняльності результатів, а також підготовку до акредитації та участі в програмах зовнішньої оцінки якості.

Міжлабораторна валідація є обов'язковою для: комерційних діагностичних наборів перед виходом на ринок (вимога регуляторних органів), методів, рекомендованих WOAH для міжнародної торгівлі, референтних методів національних референтних лабораторій, валідації методів для акредитації згідно ISO/IEC 17025 (вимога щорічної участі в програмах зовнішньої оцінки якості), та тестів для програм масового скринінгу або ерадикації хвороб на національному рівні.

4.1.4. Організація порівняльних випробувань

Порівняльні випробування – це організовані дослідження, в яких кілька лабораторій тестують одну і ту саму панель зразків з використанням однакового протоколу та реагентів. Це золотий стандарт міжлабораторної валідації.

Планування. Кількість лабораторій для участі у порівняльних випробуваннях визначається наступним чином: 5 лабораторій (це мінімальна кількість для статистичної значущості результатів), оптимально 7-10 лабораторій (забезпечує надійніші оцінки варіабельності), максимум 15-20 лабораторій (більша кількість ускладнює координацію та аналіз даних). Лабораторії повинні бути географічно розподілені та включати: референтні лабораторії національного рівня, регіональні діагностичні лабораторії, комерційні лабораторії (якщо тест призначений для комерційного використання), та лабораторії з різним рівнем досвіду (досвідчені та менш досвідчені).

Підготовка панелі зразків. Панель зразків для порівняльних випробувань повинна включати 15-20 зразків (більша кількість ускладнює логістику та підвищує вартість), що охоплюють весь діапазон реактивності: негативні зразки (25-30%), слабкопозитивні (близько до cut-off, 20-25%), середньопозитивні (25-30%), та сильнопозитивні (20-25%). Важливо включити складні зразки: зразки з перехресною реактивністю (якщо це релевантно для тесту), зразки з низькими титрами антитіл, зразки від вакцинованих тварин (якщо застосовно), та зразки з різних географічних регіонів.

Зразки готують з однієї серії: відбирають достатній об'єм для всіх лабораторій плюс резерв (мінімум 0,5 мл на зразок на лабораторію), розділяють на ідентичні аліквоти (використовують одну серію пробірок для мінімізації варіабельності), заморожують при -70°C або нижче (для

довготривалого зберігання), проводять попереднє тестування панелі в організаторській лабораторії (визначають очікувані значення, перевіряють стабільність), кодують зразки (використовують сліпий код, щоб лабораторії не знали очікуваних результатів), та документують усі деталі підготовки.

Розподіл матеріалів. Всі лабораторії повинні отримати: панель кодованих зразків (відправляють на сухому льоду або з холодоагентами), реагенти з однієї серії (якщо тестують комерційний набір або централізовано виготовлені реагенти; якщо лабораторії готують власні реагенти, надають детальний протокол виготовлення), детальний стандартизований протокол (покроковий опис усіх процедур: підготовка зразків, розведення, інкубація, промивання, додавання реагентів, зчитування результатів), форми для звітності (стандартизовані форми для внесення результатів, щоб полегшити аналіз даних), та інструкції щодо термінів та способу надсилання результатів.

Виконання тестування. Кожна лабораторія виконує: мінімум два незалежні цикли тестування (в різні дні для оцінки внутрішньолабораторної відтворюваності), тестування всієї панелі в кожному циклі (з дублікатами або триплікатами згідно протоколу), включення власних контролів якості (якщо це є частиною рутинної практики лабораторії), та документування всіх умов виконання (дати, час, температура, обладнання, оператори, будь-які відхилення від протоколу).

Приклад: порівняльні випробування для нового конкурентного ІФА на бруцельоз. Залучили 8 лабораторій: 3 національні референтні лабораторії (Данія, Німеччина, Франція), 3 регіональні діагностичні лабораторії (Іспанія, Італія, Польща), 2 комерційні лабораторії. Панель: 18 зразків (5 негативних, 4 слабкопозитивні, 5 середньопозитивні, 4 сильнопозитивні). Всі зразки з однієї серії, заморожені аліквоти по 0,3 мл. Реагенти: комерційний набір з однієї виробничої серії. Кожна лабораторія протестувала панель у двох циклах з інтервалом 1 тиждень. Термін виконання: 4 тижні.

Аналіз узгодженості результатів

Після отримання результатів від усіх лабораторій координатор проводить статистичний аналіз для оцінки узгодженості результатів. Методи аналізу залежать від типу даних (якісні або кількісні).

Аналіз якісних результатів (позитивний/негативний)

Для оцінки узгодженості якісних результатів використовують загальну узгодженість, що розраховується як відсоток зразків, для яких всі лабораторії дали однаковий результат. Критерії оцінки: загальна узгодженість більше 95% вважається відмінною, 90-95% – доброю, 85-90% –

прийнятною, менше 85% – незадовільною і потребує з'ясування причин розбіжностей.

Також розраховують коефіцієнт каппа Коена (κ) для оцінки узгодженості з корекцією на випадковий збіг. Інтерпретація коефіцієнта: κ більше 0,8 означає відмінну узгодженість, 0,6-0,8 – добру узгодженість, 0,4-0,6 – помірну узгодженість, менше 0,4 – незадовільну узгодженість.

Аналіз кількісних результатів (OD, титри, відсотки)

Для кількісних результатів спочатку перевіряють наявність викидів (outliers) за критеріями Граббса або Кохрана. Викиди можуть свідчити про: системну помилку в лабораторії (неправильне калібрування обладнання, помилка в протоколі), проблеми з транспортуванням зразків (розморожування, деградація), або помилки оператора.

Потім розраховують міжлабораторний коефіцієнт варіації (between-laboratory CV). Критерії оцінки: CV менше 15% вважається відмінним результатом, 15-20% – добрим, 20-25% – прийнятним, більше 25% – незадовільним і вимагає додаткового аналізу.

Розраховують інтракласовий коефіцієнт кореляції (ICC) для оцінки узгодженості між лабораторіями. Інтерпретація: ICC більше 0,9 означає відмінну узгодженість, 0,75-0,9 – добру узгодженість, 0,5-0,75 – помірну узгодженість, менше 0,5 – незадовільну узгодженість.

Використовують дисперсійний аналіз (ANOVA) для розкладу загальної варіабельності на компоненти: варіація між зразками (бажано висока – показує, що тест добре розрізняє зразки), варіація між лабораторіями (бажано низька – показує хорошу міжлабораторну узгодженість), варіація між циклами в межах лабораторій (бажано низька – показує хорошу внутрішньолабораторну відтворюваність), та залишкова варіація (випадкова помилка).

Графічне представлення результатів

Для візуалізації результатів використовують діаграми розсіювання (scatter plots), де кожна точка представляє один зразок, на осі X відкладають очікуване значення (результат організаторської лабораторії), на осі Y – результати кожної лабораторії-учасниці. Ідеальна лінія узгодженості: $Y = X$.

Діаграми Бленда-Альтмана (Bland-Altman plots) показують різницю між результатами кожної лабораторії та середнім значенням усіх лабораторій проти середнього значення. Дозволяють виявити систематичне зміщення (bias) та оцінити межі узгодженості.

Boxplots (діаграми розмаху) для кожного зразка показують розподіл результатів усіх лабораторій, дозволяють легко побачити медіану, квартилі та викиди.

Приклад аналізу: порівняльні випробування для ІФА на бруцельоз (продовження). Результати для якісної інтерпретації (позитивний/негативний): загальна узгодженість = 94,4% (136 з 144 можливих збігів, 8 лабораторій × 18 зразків = 144), коефіцієнт каппа $\kappa = 0,87$ (відмінна узгодженість). Розбіжності: зразок №7 (слабкопозитивний, OD = 0,265, cut-off = 0,250): 6 лабораторій – позитивний, 2 лабораторії – негативний (результати цих двох лабораторій були трохи нижче порогу: 0,245 та 0,248). Зразок №12 (слабкопозитивний, OD = 0,280): 7 лабораторій – позитивний, 1 лабораторія – негативний (OD = 0,235, виявлено викид за критерієм Граббса). Результати для кількісних даних: міжлабораторний CV = 18,2% (добрий результат), ICC = 0,82 (добра узгодженість). ANOVA показав: 75% варіабельності пояснюється різницею між зразками (добре!), 15% – різницею між лабораторіями, 10% – випадкова помилка.

Гармонізація методик – це процес стандартизації всіх аспектів виконання тесту для забезпечення максимальної узгодженості результатів між лабораторіями. Це не разова подія, а постійний процес покращення.

Ключові аспекти гармонізації

Стандартизація протоколу передбачає: деталізацію кожного кроку (об'єми реагентів, температури, час інкубації, швидкість промивання, кількість промивань), стандартизацію критичних параметрів (розведення зразків, концентрації реагентів, умови зберігання), документування допустимих діапазонів варіювання (наприклад, температура інкубації $37 \pm 1^\circ\text{C}$, час промивання 30 ± 5 секунд), та створення покрокової інструкції з фотографіями або відео.

Калібрування обладнання включає: калібрування спектрофотометрів (перевірка лінійності, точності, повторюваності з використанням стандартних фільтрів або розчинів), калібрування піпеток (гравіметричний метод, перевірка точності та прецизійності), калібрування термостатів та інкубаторів (перевірка стабільності температури з використанням каліброваних термометрів), калібрування промивних пристроїв (перевірка об'єму, швидкості промивання), та регулярну recalібрацію згідно графіка (щонайменше щороку або після ремонту).

Стандартизація реагентів передбачає: централізоване виробництво критичних реагентів (антигени, кон'югати) або закупівля у одного виробника, використання міжнародних або національних референтних стандартів для калібрування, контроль якості кожної серії реагентів перед розподілом, документування номерів серій та термінів придатності, а також створення резервних запасів реагентів для забезпечення безперервності.

Інтерпретація результатів потребує: встановлення однозначних критеріїв інтерпретації (чіткі формули розрахунку, пороги відсікання), стандартизації розрахункових алгоритмів (використання однакового програмного забезпечення або формул), визначення «сірої зони» навколо cut-off (зразки в сірій зоні вважаються сумнівними і підлягають повторному тестуванню), та правил інтерпретації для контролів (коли цикл вважається валідним/невалідним).

Навчання персоналу

Навчання персоналу є критичним компонентом гармонізації і включає: проведення тренінгів для операторів усіх лабораторій-учасниць (теоретична частина: принципи методу, джерела помилок; практична частина: демонстрація техніки, практичні вправи), стандартизацію техніки виконання критичних етапів (техніка піпетування, додавання реагентів, промивання), створення навчальних матеріалів (відео-інструкції, покрокові фото-гіди), регулярне підвищення кваліфікації (щорічні оновлювальні тренінги), а також оцінку компетентності операторів (практичні тести, участь у ring trials).

Системи контролю якості

Всі лабораторії повинні використовувати: внутрішній контроль якості (щоденне тестування контрольних зразків, побудова контрольних карт Шухарта, моніторинг трендів), зовнішню оцінку якості (регулярна участь у ring trials, щонайменше раз на рік згідно ISO/IEC 17025), коригувальні дії при відхиленнях (розслідування причин, впровадження змін, документування), та періодичний аудит (внутрішній аудит процедур, зовнішній аудит для акредитації).

Моніторинг та постійне покращення

Після первинної гармонізації необхідний постійний моніторинг, що включає: регулярні порівняльні випробування (щонайменше щороку), аналіз результатів зовнішньої оцінки якості (виявлення проблемних лабораторій або зразків), оновлення протоколів на основі накопиченого досвіду, обмін інформацією між лабораторіями (спільні наради, електронні форуми), документування покращень (версії протоколів, історія змін), а також адаптацію до нових технологій або реагентів.

Приклад гармонізації: після порівняльних випробувань для ІФА на бруцельоз виявили проблему в одній лабораторії (систематично завищені результати, середнє зміщення +15%). Розслідування показало: спектрофотометр не калібрувався 3 роки. Рішення: провели калібрування спектрофотометра, повторили тестування контрольної панелі – результати нормалізувалися. Гармонізаційні заходи для всієї мережі лабораторій: запровадили обов'язкове щорічне калібрування спектрофотометрів (документування в журналі обладнання), створили єдину базу даних

контрольних зразків (усі лабораторії використовують зразки з однієї серії), запровадили щоквартальну міні-оцінку (тестування 3-5 зразків для раннього виявлення проблем), організували щорічні тренінги для нових операторів, та створили онлайн-форум для обміну досвідом та вирішення технічних питань.

Міжлабораторна валідація через порівняльні випробування є важливим етапом для тестів широкого використання. Аналіз узгодженості результатів дозволяє виявити джерела варіабельності та оцінити придатність тесту для багатоцентрового використання. Гармонізація методик – це не разова подія, а постійний процес стандартизації та покращення, що забезпечує порівнянність результатів між лабораторіями та підтримку високої якості діагностики на національному та міжнародному рівнях.

Після завершення повної валідації методу розробником або виробником, кожна окрема лабораторія, що впроваджує цей метод, повинна провести його верифікацію – підтвердити свою компетентність виконувати валідований метод у власних умовах.

4.2. Верифікація діагностичних методів

Верифікація – це підтвердження того, що лабораторія може задовільно виконувати валідований метод у власних специфічних умовах. Якщо валідація відповідає на запитання «Чи працює метод взагалі?», то верифікація відповідає на запитання «Чи можу я виконати цей метод у своїй лабораторії з належною якістю?»

Верифікація є практичною демонстрацією компетентності лабораторії застосовувати метод, який вже пройшов валідацію. Це процес документованого підтвердження того, що лабораторія може відтворювати заявлені характеристики методу (діагностичну чутливість, специфічність, відтворюваність) в умовах свого обладнання, приміщень, персоналу та реагентів.

Ключові відмінності між валідацією та верифікацією:

Критерій	Валідація	Верифікація
Мета	Підтвердити, що метод працює і є придатним для конкретного застосування	Підтвердити, що лабораторія може правильно виконати метод у своїх умовах
Коли проводиться	Під час розробки нового методу або значної модифікації існуючого	При впровадженні валідованого стандартизованого методу в лабораторію
Обсяг досліджень	Масштабний, комплексний, часто міжлабораторний	Обмежений, цільовий, внутрішньолабораторний

Параметри оцінки	Повний набір: DSe, DSr, ASe, ASr, LOD, лінійність, специфічність, робочий діапазон, міжлабораторна відтворюваність	Обмежений набір: повторюваність, відтворюваність, точність, перевірка критичних контрольних точок
Хто виконує	Розробник методу, виробник тест-систем, референтна лабораторія	Кожна окрема лабораторія, що впроваджує метод
Документація	Детальний валідаційний звіт, публікації, настанови WOAH	Протокол верифікації, звіт з результатами, СОП

Приклад валідації: Міжнародна організація WOAH провела повну валідацію ІФА на бруцельоз ВРХ. Дослідження включали 500 позитивних і 800 негативних зразків з 15 країн, тестування в 10 лабораторіях. Встановлено DSe = 98,5% (95% ДІ: 96,8–99,4%) та DSr = 99,7% (95% ДІ: 98,9–99,9%). Результати опубліковані, метод рекомендований для міжнародної торгівлі.

Приклад верифікації: Регіональна ветеринарна лабораторія в Україні впроваджує цей валідований метод. Лабораторія проводить верифікацію: тестує 20 позитивних і 30 негативних контрольних зразків, виконує 15 незалежних циклів аналізу протягом місяця. Підтверджує, що її результати узгоджуються з заявленими характеристиками методу (коефіцієнт варіації < 10%, узгодженість з референтною лабораторією > 95%). Після успішної верифікації метод затверджується для рутинного використання в цій лабораторії.

Нормативна база та вимоги стандарту ISO/IEC 17025

Згідно з п. 7.2.1.5 ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій»:

«Лабораторія повинна верифікувати, що вона може правильно виконувати методи до початку їх впровадження шляхом доведення того, що вона може досягнути необхідну результативність. Записи про верифікацію мають зберігатися. Якщо метод переглянуто органом, який його розробляє, верифікацію потрібно повторити в необхідному обсязі.»

Це положення встановлює чіткі зобов'язання для лабораторій:

1. Верифікація обов'язкова перед початком використання будь-якого стандартизованого методу. Лабораторія не може просто прийняти метод і почати його застосовувати без підтвердження своєї здатності його виконувати.

2. Документування є обов'язковим. Верифікація повинна бути задокументована у вигляді протоколу та звіту з результатами. Ці записи повинні зберігатися і бути доступними для аудиторів органів акредитації.

3. Повторна верифікація необхідна при оновленні методу. Якщо організація-розробник (наприклад, WOAH, ISO, виробник тест-систем) переглядає метод, лабораторія повинна повторити верифікацію в обсязі, який відповідає характеру змін.

Додаткові вимоги стандарту ISO/IEC 17025:2019:

П. 7.2.1.6 – Модифікація валідованих методів. Якщо лабораторія модифікує валідований метод (наприклад, змінює розведення реагентів, час інкубації, протокол промивання), такі зміни повинні бути документовані, і має бути проведена валідація модифікованого методу. Це вже не верифікація, а повноцінна (хоча й обмежена) валідація.

П. 7.2.2.1 – Вибір методів. Лабораторія повинна використовувати методи, що відповідають потребам замовника і придатні для випробувань. Перевага надається методам, опублікованим у міжнародних, регіональних або національних стандартах (для ветеринарії – методи WOAH, ISO, національні стандарти). Верифікація таких методів підтверджує, що лабораторія правильно їх застосовує.

П. 7.7 – Забезпечення валідності результатів. Лабораторія повинна мати процедури для моніторингу валідності результатів. Це включає регулярне використання контрольних зразків, участь у програмах міжлабораторних порівнянь (proficiency testing), повторний аналіз зразків, що зберігаються. Верифікація є початковою точкою цього процесу.

Верифікацію проводять у наступних ситуаціях:

1. Впровадження стандартизованого методу вперше. Коли лабораторія починає використовувати міжнародний, національний або галузевий стандартизований метод, який вже пройшов валідацію розробником або референтною організацією.

Приклад: діагностична лабораторія впроваджує комерційний ІФА-набір для виявлення антитіл до вірусу лейкозу ВРХ, сертифікований згідно з рекомендаціями WOAH. Набір вже пройшов повну валідацію виробником із встановленими $DSe = 99,2\%$ та $DSp = 99,8\%$. Лабораторія проводить верифікацію, щоб підтвердити, що може відтворити ці характеристики у своїх умовах.

Навіть якщо метод є «готовою» комерційною тест-системою з детальними інструкціями, верифікація залишається обов'язковою. Лабораторія повинна довести, що її персонал, обладнання та умови дозволяють коректно виконати метод.

2. Перенесення методу з однієї лабораторії в іншу. Коли валідований метод, який успішно використовується в одній лабораторії, впроваджується

в іншу лабораторію (філія, регіональна лабораторія мережі, нова лабораторія закладу).

Приклад: Національна референтна лабораторія розробила та валідувала власний ІФА для діагностики бруцельозу свиней. Регіональна лабораторія отримує протокол, реагенти та навчання персоналу. Перед початком рутинного використання регіональна лабораторія проводить верифікацію, щоб підтвердити свою компетентність.

3. Зміна критичного обладнання. При заміні ключового обладнання, яке безпосередньо впливає на результати аналізу.

Приклади: заміна планшетного фотометра для зчитування результатів ІФА (інша модель може мати інший динамічний діапазон, точність, довжину хвилі); заміна ПЛР-ампліфікатора (різні прилади мають різну однорідність температурного поля); заміна автоматичного промивача планшетів (різна ефективність промивання впливає на фоновий сигнал); заміна термостата/інкубатора (різна точність підтримання температури).

Обсяг верифікації: тестування контрольних зразків на новому обладнанні, порівняння з результатами на старому обладнанні (якщо воно ще доступне) або з архівними даними.

4. Зміна постачальника реагентів або серії реагентів. Зміна виробника тест-систем або критичних реагентів (антигени, кон'югати), навіть при збереженні методологічного принципу, може вплинути на характеристики методу.

Приклад: лабораторія переходить від використання ІФА-набору виробника А до набору виробника Б для діагностики того самого захворювання. Обидва набори базуються на непрямому ІФА, але використовують різні антигени, кон'югати, буфери. Необхідна верифікація нового набору.

Примітка: при зміні серії реагентів того самого виробника зазвичай проводять спрощену верифікацію (тестування контрольних зразків, перевірка відповідності специфікаціям виробника), якщо виробник гарантує узгодженість між серіями.

5. Зміна оператора або навчання нового персоналу. Коли новий співробітник починає працювати з методом, особливо для методів, що потребують значної операторської майстерності (візуальна оцінка, мануальні маніпуляції).

Приклад: реакція гальмування гемаглютинації (РЗГА) для визначення титру антитіл до вірусу грипу потребує досвіду у візуальній оцінці патерну осідання еритроцитів. Новий оператор повинен продемонструвати здатність правильно інтерпретувати результати, тестуючи панель зразків з відомими

титрами і порівнюючи свої результати з результатами досвідченого оператора.

Обсяг верифікації: зазвичай обмежується тестуванням 10-20 контрольних зразків для підтвердження узгодженості результатів нового оператора з раніше встановленими.

6. Перегляд стандарту розробником методу. Якщо організація-розробник (WOAH, ISO, виробник) оновлює або переглядає метод, лабораторія повинна оцінити характер змін і провести повторну верифікацію в необхідному обсязі.

Незначні зміни (уточнення формулювань, оновлення списку обладнання без зміни критичних параметрів) – мінімальна верифікація: перевірка відповідності нової версії документа, тестування контрольних зразків.

Значні зміни (зміна протоколу, реагентів, порогових значень) – повна верифікація: повторне тестування всіх критичних параметрів.

7. Періодична ревалідація/реверифікація. Деякі акредитуючі органи або внутрішні системи якості лабораторій вимагають періодичного підтвердження (наприклад, щорічного) характеристик критичних методів.

Обсяг: зазвичай спрощена процедура – тестування контрольних зразків, аналіз даних контрольних карт за попередній період, участь у профтестуванні.

4.2.1. Етапи проведення верифікації

Верифікація є структурованим процесом, який складається з восьми послідовних етапів. Дотримання цієї послідовності забезпечує повноту і документованість процедури.

Етап 1: Планування верифікації. Розробляють письмовий план верифікації, який є основним робочим документом процесу. План повинен включати:

1. Мету та обсяг верифікації. Чітко формулюють, що саме верифікується (повний метод, окремі етапи, нове обладнання) і в якому обсязі.

2. Параметри, які будуть перевірятися. Зазвичай це підмножина параметрів валідації: повторюваність, внутрішньолабораторна відтворюваність, точність, перевірка контрольних точок методу.

3. Критерії прийнятності. Встановлюють конкретні числові значення, яким повинні відповідати отримані результати. Наприклад: коефіцієнт варіації (CV) < 10% для повторюваності; узгодженість з референтними значеннями $\pm 5\%$; відповідність результатів контрольних зразків встановленим діапазнам.

4. Необхідні ресурси. Зразки (контрольні, референтні, з відомим статусом), реагенти (тест-системи, буфери, контролі), обладнання (фотометр, термостат, піпетки), персонал (відповідальні особи, оператори), час (графік виконання експериментів).

5. Відповідальних осіб. Призначають керівника верифікації, операторів, особу, відповідальну за перегляд та затвердження результатів.

Приклад плану верифікації: Верифікація комерційного ІФА-набору для виявлення антитіл до вірусу діареї ВРХ. Мета: підтвердити, що лабораторія може досягнути заявлених виробником характеристик ($CV < 10\%$, узгодженість з референтними значеннями $> 95\%$). Параметри: повторюваність (10 повторів контрольного зразка), відтворюваність (15 незалежних циклів протягом 3 тижнів), точність (тестування 5 сертифікованих референтних зразків). Критерії прийнятності: $CV \leq 10\%$, відновлення 90–110% для референтних зразків. Відповідальний: завідувач лабораторії, оператор: старший лаборант. Термін: 4 тижні.

Етап 2: Підготовка. Перед початком експериментальної роботи забезпечують наявність усіх необхідних компонентів:

1. Актуальна версія методу. Отримують останню версію стандарту, протоколу або інструкції виробника.

2. Відкаліброване та атестоване обладнання. Перевіряють наявність актуальних сертифікатів калібрування для спектрофотометра, піпеток, термостатів, ваг. Якщо калібрування прострочене – проводять перед верифікацією.

3. Кваліфікований персонал. Оператори, які виконуватимуть верифікацію, повинні бути навчені методу, ознайомлені з СОП.

4. Сертифіковані референтні зразки. Отримують стандартні зразки з відомими значеннями (від національної референтної лабораторії, міжнародних організацій, виробника тест-систем).

5. Контрольні зразки відомого статусу. Готують або отримують панель контрольних зразків (позитивні різних рівнів, негативні), що буде використовуватися для оцінки характеристик.

Етап 3: Виконання серії експериментів. Проводять дослідження згідно з планом верифікації. Типові експерименти включають:

1. **Тестування стандартних зразків.** Тестують референтні матеріали або контрольні зразки, що охоплюють діапазон очікуваних значень: позитивні контролі різних рівнів активності (слабкопозитивний, середньопозитивний, високопозитивний); негативні контролі (для перевірки специфічності); зразки з відомими концентраціями аналіту (для оцінки точності).

2. Оцінка повторюваності. Повторюваність характеризує узгодженість результатів при повторних вимірюваннях одного зразка в межах одного аналітичного циклу, одним оператором, в однаковий час:

- відбирають 1–3 контрольні зразки (бажано біля порогового значення або в середньому діапазоні).
- кожен зразок тестують у 10 повторях у межах одного циклу аналізу.
- розраховують середнє значення, стандартне відхилення (SD) та коефіцієнт варіації ($CV = SD/\text{середнє} \times 100\%$).

Критерій прийнятності: $CV < 10\%$ для імуноферментних методів, $CV < 15\%$ для титраційних методів.

Приклад: Контрольний зразок ІФА на бруцельоз тестували 10 разів у одному циклі. Оптична густина (OD_{450}): 0,285, 0,298, 0,276, 0,290, 0,282, 0,295, 0,288, 0,279, 0,291, 0,286. Середнє = 0,287, SD = 0,007, $CV = 2,4\%$ – відмінна повторюваність, відповідає критерію.

3. Оцінка внутрішньолабораторної відтворюваності. Відтворюваність характеризує узгодженість результатів між різними аналітичними циклами, операторами, серіями реагентів протягом тривалого періоду:

- відбирають 2–3 контрольні зразки (низький, середній, високий рівень активності);
- тестують їх щонайменше в 10–20 незалежних циклах протягом 2–4 тижнів;
- варіюють умови: різні дні, різні оператори (якщо є більше одного), різні серії реагентів (якщо доступно);
- розраховують загальний CV між циклами.

Критерій прийнятності: CV між циклами $< 15\text{--}20\%$ (зазвичай дещо вище, ніж для повторюваності, оскільки включає більше джерел варіабельності).

Приклад: Слабкопозитивний контроль ІФА тестували в 15 циклах протягом 3 тижнів. Середнє OD = 0,285, SD між циклами = 0,035, $CV = 12,3\%$ – прийнятна відтворюваність, відповідає критерію.

4. Оцінка точності. Точність характеризує близькість результату вимірювання до справжнього (референтного) значення. Оцінюють одним з наступних способів:

Метод 1: Використання сертифікованих референтних матеріалів (CRM):

- тестують міжнародні або національні референтні стандарти з атестованою концентрацією антитіл або відомим статусом.
- кожен стандарт вимірюють у 3–5 повторях.
- порівнюють виміряну концентрацію зі справжньою (атестованою).
- розраховують відсоток відновлення = (виміряне значення / справжнє значення) $\times 100\%$.

Критерій прийнятності: відсоток відновлення 90–110% (відмінна точність), 80–120% (прийнятна точність).

Метод 2: Порівняння з референтним методом або лабораторією:

- тестують панель зразків ($n = 20-50$) паралельно у власній лабораторії і в референтній лабораторії або двома різними методами.
- будують графік кореляції: вісь X – референтний метод, вісь Y – метод, що верифікується.
- оцінюють нахил та зміщення: slope близько до 1,0 і intercept близько до 0 свідчать про хорошу точність.

Критерій прийнятності: коефіцієнт кореляції $R^2 > 0,95$, slope 0,9–1,1, узгодженість > 90%.

Приклад: Панель з 30 зразків тестували в лабораторії (новий ІФА) і в національній референтній лабораторії (референтний метод). Лінійна регресія: $Y(\text{новий}) = 0,05 + 0,98 \times X(\text{референтний})$, $R^2 = 0,96$. Slope = 0,98 (близько до 1), intercept = 0,05 (близько до 0) – хороша точність.

Етап 4: Аналіз даних. Після завершення експериментів статистично обробляють отримані дані:

1. Розраховують описові статистики: середні значення, стандартні відхилення, коефіцієнти варіації, відсотки відновлення.
2. Порівнюють отримані значення з критеріями прийнятності, зазначеними в плані верифікації.
3. Оцінюють відповідність заявленим характеристикам методу (з валідаційного звіту, інструкції виробника, стандарту).
4. Виявляють викиди (outliers) та аномальні результати, з'ясовують їх причини.

Етап 5: Документування. Складають детальний звіт про верифікацію, який є основним доказовим документом. Структура звіту:

1. Вступна частина:

- назва методу, що верифікується (з посиланням на стандарт, протокол, інструкцію виробника).
- мета верифікації.
- дати проведення досліджень.
- відповідальні особи (керівник верифікації, оператори).

2. Опис методу:

- стислий опис принципу методу.
- посилання на валідаційний звіт або публікацію.

3. Матеріали та обладнання:

- список використаних зразків (тип, походження, кількість).
- реагенти (назва, виробник, номер серії, термін придатності).
- обладнання (назва, модель, інвентарний номер, дата останнього калібрування).

4. Методика верифікації:

- опис виконаних експериментів (повторюваність, відтворюваність, точність).
- умови виконання (температура, час інкубації, розведення).

5. Результати:

- первинні дані (таблиці з результатами вимірювань).
- розраховані статистичні показники (середні, SD, CV, recovery).
- графіки (контрольні карти, графіки кореляції, гістограми розподілу).

6. Порівняння з критеріями прийнятності: таблиця порівняння отриманих значень з критеріями (наприклад: Параметр / Отримане значення / Критерій / Відповідність).

7. Виявлені проблеми та відхилення:

- опис будь-яких відхилень від очікуваних результатів.
- аналіз причин (якщо встановлено).
- вжиті коригувальні дії (якщо необхідно).

8. Висновки:

- чітке формулювання: чи пройшла лабораторія верифікацію успішно.
- чи може метод бути впроваджений для рутинного використання.
- обмеження та рекомендації (якщо є).

9. Підписи:

- підпис виконавця (оператора).
- підпис керівника верифікації.
- підпис керівника лабораторії або особи, відповідальної за якість.

Етап 6: Перегляд та затвердження. Звіт про верифікацію переглядає та затверджує відповідальна особа:

- завідувач лабораторії або керівник підрозділу якості аналізує повноту та коректність звіту.
- перевіряє відповідність результатів критеріям прийнятності.
- приймає рішення про затвердження або необхідність додаткових досліджень.
- підписує та датує звіт.

Етап 7: Впровадження методу. Після успішної верифікації метод офіційно впроваджують в рутинну діагностичну практику лабораторії. Це включає:

Розробка або адаптація стандартної операційної процедури (СОП):

- складають детальну СОП, адаптовану до умов лабораторії.
- СОП має включати: призначення методу, принцип, матеріали та обладнання, покрокову процедуру виконання, розрахунок та інтерпретацію результатів, контроль якості, обмеження методу, посилання на валідаційний звіт та звіт про верифікацію.

Навчання персоналу:

- всі оператори, які виконуватимуть метод, повинні бути навчені та атестовані.
- документують проведення навчання (дата, тема, учасники, підписи).

Реєстрація методу:

- метод вносять у реєстр валідованих/верифікованих методів лабораторії.
- зазначають дату впровадження, сферу застосування, відповідальних осіб.

Впровадження системи контролю якості:

- встановлюють процедури внутрішнього контролю якості: включення контрольних зразків у кожен цикл аналізу, побудова та моніторинг контрольних карт Шухарта, встановлення контрольних меж та правил інтерпретації.
- планують участь у програмах зовнішньої оцінки якості, якщо доступно.

Етап 8: Постійний моніторинг та підтримання компетентності. Верифікація не є кінцевою точкою. Після впровадження методу лабораторія повинна постійно моніторити його ефективність:

- регулярний аналіз результатів контрольних карт – виявлення трендів, систематичних зміщень, виходів за контрольні межі.
- участь у міжлабораторних порівняльних випробуваннях – зазвичай 1–2 рази на рік для підтвердження узгодженості результатів з іншими лабораторіями.
- періодична переоцінка характеристик – наприклад, щорічна реверифікація для критичних методів.
- реагування на зміни – будь-яка зміна (обладнання, реагентів, персоналу, стандарту) потребує оцінки необхідності повторної верифікації.

4.2.2. Відмінності у обсязі верифікації залежно від ситуації

Обсяг верифікаційних досліджень не є фіксованим і залежить від конкретної ситуації, характеру змін та ризиків, пов'язаних з методом. Розглянемо типові сценарії та відповідні обсяги верифікації.

Сценарій 1: Впровадження повністю валідованого комерційного набору. Лабораторія впроваджує комерційний ІФА-набір, який пройшов повну валідацію виробником, має сертифікат відповідності, детальну інструкцію та задокументовані характеристики (DSe, DSp, CV).

Обсяг верифікації (стандартний):

- повторюваність: 10 повторів контрольного зразка в одному циклі (1–2 рівні активності).

- відтворюваність: 10–15 незалежних циклів протягом 2–3 тижнів з контрольними зразками.
- точність: тестування 3–5 сертифікованих референтних зразків, надані виробником або отримані з референтної лабораторії.
- загальна кількість зразків: 20–30 зразків, 10–15 циклів аналізу.

Тривалість: 2–4 тижні.

Сценарій 2: Впровадження методу з національного стандарту або рекомендацій WOAH. Лабораторія впроваджує метод, описаний у національному стандарті або Керівництві WOAH. Метод валідований на міжнародному рівні, але лабораторія готує власні реагенти (антигени, сироватки).

Обсяг верифікації (розширений):

- повторюваність: 10 повторів для 2–3 рівнів активності (негативний, слабкопозитивний, високопозитивний).
- відтворюваність: 15–20 незалежних циклів протягом 4–6 тижнів, з варіюванням операторів та серій реагентів (якщо готують самостійно).
- точність: тестування панелі з 20–30 зразків з відомим статусом (позитивні та негативні, підтверджені референтним методом або культуральним дослідженням).
- специфічність (за необхідності): тестування зразків від тварин, інфікованих спорідненими патогенами, для виключення перехресних реакцій.
- загальна кількість зразків: 40–60 зразків, 15–20 циклів аналізу.

Тривалість: 4–6 тижнів.

Сценарій 3: Зміна критичного обладнання. Лабораторія замінює планшетний фотометр. Метод залишається тим самим, але новий прилад може мати інші характеристики (чутливість, динамічний діапазон).

Обсяг верифікації (цільовий, обмежений):

- порівняльне тестування: паралельне тестування панелі з 10–20 зразків (різних рівнів активності) на старому та новому обладнанні (якщо старе ще доступне).
- повторюваність на новому обладнанні: 10 повторів контрольного зразка.
- відтворюваність: 5–10 циклів протягом 1–2 тижнів для підтвердження стабільності.
- статистичний аналіз: кореляція результатів між старим та новим обладнанням ($R^2 > 0,95$), відсутність систематичного зміщення.

Тривалість: 1–2 тижні.

Сценарій 4: Навчання нового оператора. Новий лаборант проходить навчання для роботи з ІФА. Необхідно підтвердити, що він може коректно виконувати метод.

Обсяг верифікації (мінімальний, атестаційний):

- тестування контрольної панелі: новий оператор тестує панель з 10–20 зразків з відомими результатами (позитивні, негативні, сумнівні).
- порівняння з досвідченим оператором: узгодженість результатів повинна бути > 90%.
- повторюваність: 5–10 повторів контрольного зразка для підтвердження прецизійності роботи нового оператора.

Документування: запис про проходження атестації, дата, результати, підпис керівника.

Тривалість: кілька днів до 1 тижня.

Сценарій 5: Перегляд методу розробником (незначні зміни). Виробник комерційного ІФА-набору оновлює інструкцію: змінює час інкубації з 30 на 35 хвилин на одному з етапів. Інші параметри залишаються незмінними.

Обсяг верифікації (спрощений):

- тестування контрольних зразків: перевірка, що контрольні зразки залишаються в межах встановлених діапазонів при новій процедурі (3–5 циклів).
- порівняння зі старою версією: паралельне тестування 5–10 зразків за старою та новою інструкцією для підтвердження узгодженості.

Тривалість: 1 тиждень.

Узагальнення: «Обсяг верифікації залежно від ситуації»

Ситуація	Обсяг верифікації	К-сть зразків/циклів	Тривалість
Комерційний набір (перше впровадження)	Стандартний	20–30 зр. / 10–15 циклів	2–4 тижні
Національний стандарт (власні реагенти)	Розширений	40–60 зр. / 15–20 циклів	4–6 тижнів
Зміна обладнання	Цільовий, обмежений	10–20 зр. / 5–10 циклів	1–2 тижні
Навчання нового оператора	Мінімальний, атестаційний	10–20 зр. / 5–10 повторів	кілька днів
Незначні зміни методу	Спрощений	5–10 зр. / 3–5 циклів	1 тиждень

Верифікація діагностичних методів є невід'ємною частиною системи забезпечення якості лабораторних досліджень. Правильно проведена верифікація гарантує, що лабораторія може надійно виконувати валідовані методи у власних специфічних умовах, забезпечуючи достовірність результатів діагностики інфекційних хвороб тварин. Обсяг та глибина

верифікації повинні відповідати ризикам, пов'язаним з методом та змінами в умовах його виконання, що дозволяє оптимізувати ресурси лабораторії при збереженні необхідного рівня якості.

РОЗДІЛ 5. НЕВИЗНАЧЕНІСТЬ ВИМІРЮВАНЬ В ІМУНОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

5.1. Концепція невизначеності вимірювання

Невизначеність вимірювання (НВ, англ. *measurement uncertainty*, MU) є основою концепції сучасної аналітичної діагностики, яка визначає ступінь довіри до результатів лабораторних досліджень. У контексті імунологічної діагностики інфекційних хвороб тварин розуміння та коректна оцінка невизначеності набувають особливого значення, оскільки від точності інтерпретації результатів залежать критичні рішення щодо здоров'я тварин, епізоотичного благополуччя та безпеки продукції тваринного походження.

Концепція невизначеності визнає об'єктивний факт: жоден процес вимірювання не є абсолютно точним, і кожен результат несе певний рівень неточності, зумовлений сукупністю численних факторів. Це положення особливо актуальне для біологічних систем, де варіабельність є природною властивістю об'єктів дослідження.

5.1.1. Визначення та значення невизначеності

Згідно з Міжнародним словником метрології, невизначеність вимірювання визначається як «параметр, що характеризує розкид значень, які можна обґрунтовано приписати вимірюваній величині». Це означає, що результат вимірювання найточніше виражається як оцінка з відповідним рівнем неточності, а не як єдине абсолютне значення.

У практичному застосуванні невизначеність вимірювання:

- відображає ступінь довіри до результату вимірювання;
- кількісно виражає межі, в яких з певною ймовірністю (зазвичай 95%) знаходиться справжнє значення вимірюваної величини;
- є інтегральною характеристикою якості аналітичного процесу;
- дозволяє коректно інтерпретувати результати, особливо при значеннях, близьких до діагностичних порогів.

Значення концепції невизначеності в імунологічній діагностиці.

В імунологічній діагностиці інфекційних хвороб тварин процес вимірювання характеризується особливою складністю через залежність від біологічної варіабельності як досліджуваного матеріалу, так і реагентів біологічного походження. Врахування невизначеності вимірювання дозволяє:

Коректно класифікувати результати в зоні невизначеності. Зразки з результатами, що потрапляють у діапазон невизначеності навколо порогового значення, мають бути класифіковані як сумнівні або непереконливі, а не як чітко позитивні чи негативні. Це запобігає хибній інтерпретації та необґрунтованим управлінським рішенням.

Встановлювати обґрунтовані діагностичні зони. Знання невизначеності дозволяє визначити «сіру зону» – проміжний діапазон результатів, для яких рекомендується проведення повторних або підтверджувальних досліджень.

Порівнювати результати різних лабораторій. Вираження результатів з урахуванням невизначеності забезпечує основу для об'єктивного порівняння даних між лабораторіями та методами, що критично важливо для гармонізації діагностичних підходів.

Оцінювати відповідність регуляторним вимогам. Документування невизначеності є обов'язковою вимогою міжнародних стандартів якості (ISO/IEC 17025) для акредитованих діагностичних лабораторій.

Приймати зважені управлінські рішення. Розуміння меж достовірності результату дозволяє епізоотологам та керівникам ветеринарних служб приймати обґрунтовані рішення щодо необхідності додаткових досліджень, карантинних заходів або інших протиепізоотичних дій.

5.1.2. Нормативна база (ISO/IEC 17025)

Міжнародний стандарт ISO/IEC 17025:2017 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» встановлює обов'язкові вимоги до оцінки та вираження невизначеності вимірювання для акредитованих діагностичних лабораторій. Цей стандарт є основою для національних систем акредитації в більшості країн світу, включаючи Україну.

Ключові положення ISO/IEC 17025:2017 щодо невизначеності вимірювання:

Обов'язковість оцінки. Пункт 7.6 стандарту вимагає від лабораторії визначати невизначеність для кількісних вимірювань та, за необхідності, для результатів, виражених у якісній формі, але отриманих на основі кількісних вимірювань (наприклад, позитивний/негативний результат на основі оптичної густини в ІФА).

Ідентифікація джерел невизначеності. Лабораторія повинна ідентифікувати всі значущі компоненти невизначеності, включаючи ті, що походять від процедур відбору проб, якщо це входить до сфери відповідальності лабораторії.

Документування та валідація підходу. Методика оцінки невизначеності має бути документована, валідована та регулярно переглядатися. Лабораторія повинна зберігати записи про процедури оцінки невизначеності та отримані значення.

Вираження та повідомлення результатів. Коли невизначеність релевантна до валідності або застосування результатів випробувань, або коли вимагається специфікацією клієнта, або коли невизначеність впливає на відповідність специфікаційній межі, лабораторія повинна повідомляти інформацію про невизначеність разом з результатом.

Додаткові нормативні документи, що регламентують оцінку невизначеності:

ISO/IEC Guide 98-3:2008 (GUM – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement). Посібник – документ, що встановлює загальні правила оцінки та вираження невизначеності вимірювання. Визначає математичні основи оцінки невизначеності, включаючи типи невизначеності (тип А та тип Б), їх комбінування та розрахунок розширеної невизначеності.

Guide CG 4 «Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement» (2012). Практичний посібник з кількісної оцінки невизначеності в аналітичних вимірюваннях, адаптований для хімічних та біологічних лабораторій. Надає детальні рекомендації щодо застосування підходів «знизу вгору» та «зверху вниз» для різних типів аналізів.

WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 1.1.6. Настанови Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (WOAH) з валідації діагностичних тестів, які містять спеціальні рекомендації щодо оцінки невизначеності вимірювання для серологічних та молекулярних методів діагностики інфекційних хвороб тварин.

Практичне значення нормативної бази. Для ветеринарних діагностичних лабораторій, що прагнуть отримати або підтримати акредитацію відповідно до ISO/IEC 17025, документування та застосування процедур оцінки невизначеності є не просто формальною вимогою, а практичним інструментом забезпечення та демонстрації якості аналітичної роботи. Національні органи акредитації проводять оцінку відповідності цим вимогам під час первинної акредитації та наглядових візитів.

Важливо розуміти, що вимоги до оцінки невизначеності застосовуються до кількісних результатів (наприклад, оптична щільність, відсоток позитивності, титри, значення циклічного порогу в ПЛР) та до результатів, що виражаються якісно (позитивний/негативний), але базуються на кількісних

вимірюваннях з пороговими значеннями. Для строго бінарних якісних тестів без кількісної стадії (наприклад, візуальна оцінка гемаглютинації без фотометрії) концепція невизначеності вимірювання не застосовується безпосередньо, проте залишаються актуальними питання відтворюваності та діагностичної чутливості/специфічності.

5.1.3. Типи невизначеності

Відповідно до ISO/IEC Guide 98-3 (GUM), компоненти невизначеності класифікуються на основі методу їх оцінки на два типи: невизначеність типу А та невизначеність типу Б. Ця класифікація не відображає природу джерела невизначеності, а лише спосіб її кількісної оцінки.

Невизначеність типу А оцінюється статистичними методами на основі серії повторних вимірювань однієї і тієї ж величини. Цей тип невизначеності характеризує випадкову варіабельність результатів і виражається через статистичні параметри, такі як стандартне відхилення середньоквадратичного значення.

Основні характеристики невизначеності типу А:

Базується на повторних вимірюваннях. Для оцінки необхідна серія незалежних вимірювань (зазвичай не менше 10) одного й того ж зразка за однакових умов.

Оцінюється через стандартне відхилення. Стандартна невизначеність типу А розраховується як стандартне відхилення (SD) серії вимірювань, поділене на квадратний корінь з кількості вимірювань (n):

$$u_A = SD/\sqrt{n}.$$

Відображає прецизійність методу. Характеризує внутрішньолабораторну варіабельність, включаючи випадкові коливання в роботі обладнання, варіації в техніці виконання процедур оператором, нестабільність реагентів тощо.

Може оцінюватися на різних рівнях. Повторюваність (repeatability) – варіабельність в межах одного аналітичного циклу, одним оператором, з одними реагентами. Відтворюваність (reproducibility) – варіабельність між різними аналітичними циклами, операторами, серіями реагентів протягом тривалого періоду часу.

Приклади оцінки невизначеності типу А в імунологічній діагностиці:

- для ІФА: стандартне відхилення оптичної густини або відсотка позитивності для контрольного зразка, виміряного в 20-30 незалежних аналітичних циклах;

- для серологічних титрів: стандартне відхилення логарифмів титрів контрольної сироватки;
- для ПЛР: стандартне відхилення значень порогового циклу (Ct) для позитивного контролю.

Невизначеність типу Б оцінюється іншими методами, ніж статистичний аналіз повторних вимірювань. Вона базується на інформації з зовнішніх джерел, науковому судженні та попередньому досвіді, включаючи:

- калібрувальні сертифікати референтних матеріалів та еталонів;
- технічні специфікації та паспорти обладнання;
- інформацію виробників реагентів та тест-систем;
- дані з наукових публікацій;
- експертні оцінки на основі досвіду роботи з методом.

Основні характеристики невизначеності типу Б:

Не базується на повторних вимірюваннях. Оцінюється на основі доступної інформації про можливі джерела систематичних ефектів.

Включає систематичні компоненти. Характеризує систематичні зміщення, пов'язані з обладнанням, реагентами, стандартами, методикою вимірювання.

Потребує припущень про розподіл. Часто припускається прямокутний (рівномірний) розподіл ймовірності в межах заявленого діапазону, хоча можуть використовуватися й інші розподіли (трикутний, нормальний) залежно від природи джерела.

Вимагає експертного судження. Оцінка значущості та величини компонентів невизначеності типу Б часто ґрунтується на професійному досвіді та розумінні аналітичного процесу.

Приклади джерел невизначеності типу Б в імунологічній діагностиці:

Неточність фотометра. Якщо виробник заявляє точність $\pm 1\%$ для вимірювання оптичної густини в робочому діапазоні, стандартна невизначеність типу Б (при прямокутному розподілі) становить:
 $u_B = 0.01/\sqrt{3} = 0.0058$.

Похибка піпетування. Калібрувальний сертифікат автоматичного дозатора вказує максимальне відхилення об'єму $\pm 0.5\%$ для 100 мкл, що дає
 $u_B = 0.005/\sqrt{3}$.

Стабільність реагентів. На основі попереднього досвіду та даних виробника оцінюється можлива деградація активності реагентів протягом терміну зберігання.

Температурні ефекти. Коливання температури інкубації в межах $\pm 2^\circ\text{C}$ можуть впливати на швидкість імунологічної реакції; оцінка цього ефекту на основі валідаційних даних або літератури.

Невизначеність референтного стандарту. Якщо використовується міжнародний або національний референтний стандарт для калібрування, його сертифікована невизначеність (зазвичай вказана в сертифікаті) вноситься як компонент типу Б.

Комбінування невизначеностей типу А та типу Б

Для отримання **сумарної (комбінованої) стандартної невизначеності** всі компоненти невизначеності типу А і типу Б комбінуються за законом поширення невизначеності. У найпростішому випадку, коли всі компоненти незалежні та впливають аддитивно, комбінована стандартна невизначеність (u_c) розраховується як квадратний корінь із суми квадратів окремих компонентів:

$$u_c = \sqrt{(u_A^2 + u_{B1}^2 + u_{B2}^2 + \dots + u_{Bn}^2)}$$

де u_A – стандартна невизначеність типу А, $u_{B1}, u_{B2}, \dots, u_{Bn}$ – стандартні невизначеності типу Б від різних джерел.

Нарешті, для вираження результату з певним рівнем довіри (зазвичай 95%) розраховується **розширена невизначеність (U)** шляхом множення комбінованої стандартної невизначеності на коефіцієнт охоплення k (для 95% довірчого інтервалу при нормальному розподілі $k = 2$):

$$U = k \times u_c$$

Результат вимірювання виражається як: $Y \pm U$, де Y – виміряне значення, U – розширена невизначеність при рівні довіри 95%.

Практичні міркування щодо типів невизначеності в імунодіагностиці.

В імунологічній діагностиці інфекційних хвороб тварин основний внесок у невизначеність зазвичай робить невизначеність типу А, тобто випадкова варіабельність, що пов'язана з біологічною природою як зразків, так і реагентів. Тому для ветеринарних діагностичних лабораторій найбільш практичним та ефективним є так званий «низхідний» підхід (top-down approach), де невизначеність оцінюється на основі довгострокових даних контролю якості – багаторазових вимірювань стабільного контрольного зразка в рутинних умовах роботи лабораторії.

Цей підхід автоматично враховує всі значущі джерела варіабельності (і типу А, і типу Б), що проявляються в реальних умовах, включаючи різних операторів, різні серії реагентів, коливання умов навколишнього середовища, варіації в роботі обладнання тощо.

Концепція невизначеності вимірювання є невід'ємною частиною сучасної системи забезпечення якості в діагностичних лабораторіях. Розуміння природи невизначеності, її типів та методів оцінки дозволяє коректно інтерпретувати результати аналізів, особливо при значеннях, близьких до діагностичних порогів, та приймати обґрунтовані рішення в управлінні здоров'ям тварин.

Нормативна база, зокрема ISO/IEC 17025:2017, встановлює чіткі вимоги до оцінки та документування невизначеності для акредитованих лабораторій. Класифікація невизначеності на типи А (статистична оцінка) та Б (інші методи оцінки) забезпечує структурований підхід до ідентифікації та кількісної оцінки всіх значущих джерел варіабельності в аналітичному процесі.

5.2. Джерела невизначеності в імунологічній діагностиці

Невизначеність вимірювання в імунологічних методах діагностики є результатом складної взаємодії численних факторів, що впливають на всі етапи аналітичного процесу – від преаналітичної підготовки зразків до інтерпретації результатів. На відміну від більшості фізико-хімічних вимірювань, біологічні діагностичні тести характеризуються особливо високою варіабельністю через залежність від біологічних матеріалів – як досліджуваних зразків, так і реагентів. Ідентифікація та розуміння конкретних джерел невизначеності є критично важливим для розробки стратегій їх мінімізації та коректного врахування при інтерпретації результатів.

У цьому підрозділі розглядаються основні категорії джерел невизначеності, специфічні для імунологічних методів діагностики інфекційних хвороб тварин: варіабельність біологічного матеріалу, інструментальні похибки, людський фактор та варіації реагентів.

5.2.1. Варіабельність біологічного матеріалу

Біологічна варіабельність є найбільш значущим та найменш контрольованим джерелом невизначеності в імунологічній діагностиці. Вона виникає з природної гетерогенності біологічних систем і проявляється на всіх рівнях – від індивідуальних відмінностей між тваринами до варіацій у властивостях окремих молекул.

Преаналітична варіабельність

Преаналітична стадія охоплює всі процеси від відбору зразка до його внесення в аналітичну систему і є джерелом значної частини загальної варіабельності результатів.

Індивідуальна варіабельність пов'язана тваринами. Імунна відповідь на один і той самий патоген може значно відрізнятися між окремими тваринами навіть за умови ідентичного інфікування. Це зумовлено генетичними факторами (різні алелі генів головного комплексу гістосумісності, полімофізм генів імуноглобулінів), віком (імунна система молодих та старих тварин функціонує по-різному), фізіологічним станом (вагітність, лактація, стрес), супутніми захворюваннями та імуносупресивними станами. Наприклад, титри антитіл у відповідь на вакцинацію проти одного й того ж збудника можуть відрізнятися в 10 і більше разів між різними тваринами.

Стадія інфекційного процесу. Рівень антитіл динамічно змінюється протягом перебігу інфекції: від відсутності в ранній інкубаційний період, через наростання в гострій фазі, до стабілізації або зниження в періоді реконвалесценції чи хронізації. Час відбору зразка відносно моменту інфікування впливає на результат серологічного дослідження. Навіть невелика різниця (1-2 дні) у часі відбору може призвести до значної різниці в титрах антитіл, особливо в період швидкого наростання імунної відповіді.

Процедура відбору та обробки зразків. Якість зразка залежить від техніки взяття крові (венепункція, пункція серця), використання антикоагулянтів (для плазми) або їх відсутності (для сироватки), повноти відділення згустку, наявності гемолізу, ліпемії чи бактеріального забруднення. Гемоліз може вивільняти внутрішньоклітинні компоненти, що інтерферують з імунологічними реакціями; ліпемія створює оптичну інтерференцію в спектрофотометричних методах.

Умови транспортування та зберігання. Неконтрольовані цикли заморожування-відтавання призводять до денатурації білків, включаючи імуноглобуліни, та утворення преципітатів. Тривале зберігання навіть при рекомендованих температурах (-20°C або -80°C) може спричиняти поступову деградацію антитіл. Порушення холодового ланцюга під час транспортування особливо важливе для нестабільних аналітів.

Матричні ефекти. Сироватка або плазма містить складну суміш білків, ліпідів, вуглеводів, солей, які можуть впливати на імунологічні реакції неспецифічними шляхами. Різні види тварин мають різний склад сироваткових білків, що може потребувати специфічної оптимізації методів. Наприклад, висока концентрація гетерофільних антитіл у деяких зразках може спричиняти хибнопозитивні реакції.

Гетерогенність антитіл. Навіть антитіла до одного й того ж антигену є гетерогенними за багатьма характеристиками: класом (IgM, IgG, IgA), підкласом (IgG1, IgG2 тощо), афінністю (силою зв'язування з антигеном), авідністю (сумарною силою зв'язування мультивалентних взаємодій), специфічністю до різних епітопів. Ця гетерогенність впливає на поведінку антитіл у діагностичних тестах. Наприклад, в ранній фазі імунної відповіді переважають низькоафінні IgM антитіла, пізніше – високоафінні IgG.

Гетерогенність антигенів. Патогенні мікроорганізми природно варіабельні: різні штами, серовари, генотипи можуть мати антигенні відмінності. Це явище антигенного дрейфу особливо характерне для РНК-вірусів (наприклад, вірус грипу). Використання в діагностичних тест-системах антигену одного штаму може призводити до зниженої реактивності з антитілами до інших штамів того ж патогену.

Практичні наслідки біологічної варіабельності. Через високу біологічну варіабельність один і той самий зразок, досліджений у різний час або в різних лабораторіях, може давати результати, що помітно відрізняються, навіть якщо всі інші умови контрольовані. Це підкреслює необхідність встановлення діагностичних «сірих зон» навколо порогових значень, де результати вважаються сумнівними і потребують повторного дослідження або підтвердження іншим методом.

5.2.2. Інструментальні похибки

Інструментальна компонента невизначеності пов'язана з обмеженнями точності вимірювального обладнання та варіабельністю його роботи. На відміну від біологічної варіабельності, інструментальні похибки можуть бути краще контрольовані та мінімізовані через правильне обслуговування, калібрування та валідацію обладнання.

Спектрофотометричні та флуориметричні вимірювання

Похибки фотометрів. Вимірювання оптичної густини (ОГ) в імуноферментному аналізі залежить від точності планшетного фотометра. Виробники зазвичай декларують точність у межах $\pm 1-2\%$ від вимірюваного значення в робочому діапазоні. Ця похибка включає нестабільність джерела світла, шум фотоприймача, температурний дрейф електронних компонентів. Якщо аналіз має пороговий cut-off при $ОЩ = 0.500$, а точність приладу $\pm 2\%$, то справжнє значення може лежати в діапазоні $0.490-0.510$, що вносить невизначеність у класифікацію граничних зразків.

Оптичні артефакти. Бульбашки повітря, подряпини на дні мікропланшетів, нерівномірність товщини пластику створюють локальні варіації в оптичних вимірюваннях. Неоднакова товщина рідини в лунках (через похибки дозування або випаровування) також впливає на довжину оптичного шляху і, відповідно, на виміряну ОЩ.

Температурні ефекти. Оптичні властивості розчинів (показник заломлення) залежать від температури. Якщо планшет зчитується одразу після виймання з інкубатора (37°C) без екваїбрації до кімнатної температури, результати можуть відрізнятися від тих, що отримані при стандартній температурі.

Дозуючі пристрої (піпетки, диспенсери)

Точність піпетування є важливою для відтворюваності імунологічних тестів, оскільки навіть невелика похибка об'єму призводить до пропорційної похибки концентрації реагентів.

Систематичні похибки дозування. Автоматичні та механічні піпетки мають специфіковану точність (наприклад, $\pm 0.8\%$ для об'єму 100 мкл), яка погіршується при неналежному обслуговуванні, зношенні ущільнень поршня, забрудненні каналів. Регулярне калібрування гравіметричним методом (зважування відібраного об'єму води) є обов'язковим для акредитованих лабораторій і повинно проводитись не рідше 1 разу на рік.

Випадкова варіабельність піпетування. Навіть при правильному калібруванні, повторні відбори одного й того ж об'єму тією самою піпеткою дають дещо різні результати (випадкова похибка, характеризується коефіцієнтом варіації, зазвичай $< 0.5\%$ для якісних приладів). Використання багатоканальних піпеток додатково вносить варіабельність між каналами.

Вплив властивостей рідини. В'язкість, поверхневий натяг, наявність детергентів впливають на формування та відрив краплі. Піпетки калібруються на воді, тому робота з іншими рідинами (наприклад, високов'язкою сироваткою, розчинами з високим вмістом гліцерину) може вносити додаткову систематичну похибку.

Інкубатори та термостати

Точність підтримання температури. Імунологічні реакції є температурно-залежними процесами; комплекси антиген-антитіло, швидкість ферментативних реакцій експоненційно змінюються з температурою. Стандартні інкубатори мають точність $\pm 0.5-1.0^\circ\text{C}$. При номінальній температурі інкубації 37°C реальна температура може коливатись від 36

до 38°C, що призводить до варіабельності швидкості реакції та кінцевого сигналу.

Неоднорідність температурного поля. Всередині інкубаційної камери існують температурні градієнти (центр зазвичай тепліший за периферію), особливо в старих або неякісних приладах. Розміщення планшетів у різних позиціях може призводити до систематичних відмінностей результатів.

Промивні пристрої для мікропланшетів

Ефективність промивання. Недостатнє видалення незв'язаних компонентів при промиванні планшетів в ІФА є джерелом високого фоновому сигналу та хибнопозитивних результатів. Автоматичні промивні пристрої мають варіабельність між головками, залежність від якості промивного розчину, засмічення голівок.

Повнота аспірації. Залишки рідини після аспірації різняться між лунками (особливо при ручному промиванні), що вносить розбавлення наступних реагентів і варіабельність сигналу.

Контроль інструментальних похибок. Регулярне технічне обслуговування, калібрування та кваліфікація обладнання (Installation Qualification, Operational Qualification, Performance Qualification за підходом GLP/ISO) дозволяють тримати інструментальну невизначеність у передбачуваних межах. Документування параметрів обладнання та періодична перевірка їх відповідності специфікаціям є вимогою стандартів якості ISO/IEC 17025.

5.2.3. Людський фактор

Навіть при використанні добре валідованих методик та справного обладнання варіабельність, пов'язана з роботою оператора, залишається важливим джерелом невизначеності. Людський фактор проявляється на всіх етапах виконання аналізу і може бути як систематичним (специфічний для певного оператора стиль роботи), так і випадковим (тимчасові відхилення від процедури).

Варіабельність техніки виконання процедур

Техніка піпетування. Різні оператори по-різному тримають піпетку, з різною швидкістю натискають на поршень, по-різному занурюють наконечник у рідину. Ці, здавалося б, незначні відмінності призводять до варіабельності відібраного об'єму навіть при використанні одного й того ж приладу. Оператори, які не пройшли належного тренування, можуть допускати систематичні помилки (наприклад, неповне

занурення наконечника, утворення бульбашок повітря, торкання стінок посудини).

Час виконання етапів. Хоча протоколи специфікують час інкубації (наприклад, 30 хв при 37°C), реальний час може відрізнятись через затримки в роботі. Якщо оператор розпочинає наступний етап не одразу після закінчення інкубації, а через кілька хвилин (через інші завдання, телефонний дзвінок тощо), це призводить до подовження реакції і зміни сигналу. При роботі з великою кількістю планшетів затримка між внесенням реагенту в перші та останні лунки може становити кілька хвилин, що створює градієнт сигналу по планшету.

Перемішування. Багато протоколів вимагають перемішування після внесення реагентів. Інтенсивність та тривалість перемішування (на шейкері або ручного постукування по планшету) варіюється між операторами і впливає на ефективність взаємодії компонентів.

Помилки при підготовці реагентів

Приготування розведень. Помилки в розрахунку або виконанні серійних розведень (наприклад, зразків для побудови стандартної кривої, робочих розведень кон'югатів) призводять до систематичного зміщення результатів. Неправильний вибір піпетки для відповідного діапазону об'ємів збільшує відносну похибку.

Реконструкція ліофілізованих реагентів. Відновлення сухих реагентів потрібним об'ємом розчинника вимагає точності; додавання більшого або меншого об'єму призводить до зміни концентрації. Недостатнє розчинення (залишки нерозчиненого матеріалу) також впливає на кінцеву активність.

Контамінація. Перехресна контамінація між зразками або між позитивними/негативними контролями може виникати через неналежну техніку роботи (повторне використання наконечників, торкання стінок лунок, бризки). Контамінація реагентів мікроорганізмами при багаторазовому відборі з основних флаконів призводить до їх деградації.

Інтерпретація та реєстрація результатів

Помилки зчитування. У методах, що потребують візуальної оцінки (наприклад, визначення титру в реакції гемаглютинації за останнім розведенням з видимою реакцією), існує суб'єктивна компонента. Різні оператори можуть по-різному оцінювати граничні, слабкопозитивні реакції. Втома очей після тривалої роботи знижує точність візуальних оцінок.

Транскрипційні помилки. Ручне перенесення даних з лабораторних журналів до комп'ютерних систем, неправильна ідентифікація зразків (переплутування номерів), арифметичні помилки в розрахунках – все це потенційні джерела помилок, не пов'язаних з самим аналітичним процесом.

Психофізіологічні фактори

Втома та монотонність. При виконанні рутинних, повторюваних дій протягом тривалого часу увага оператора знижується, збільшується ймовірність помилок. Робота в кінці зміни, після нічного чергування, під час хвороби негативно впливає на якість виконання процедур.

Стрес та поспіх. Робота під тиском часу (наприклад, при діагностиці особливо небезпечних хвороб, коли від результату залежать невідкладні протиепізоотичні заходи) може призводити до порушення протоколів, скорочення часу інкубації, пропуску етапів контролю якості.

Мінімізація людського фактора. Стандартизація процедур через детальні стандартні операційні процедури (СОП), регулярне навчання та атестація персоналу, використання чек-листів та електронних систем реєстрації даних, максимальна автоматизація рутинних етапів (автоматичні диспенсери, робототехнічні системи для підготовки планшетів), належна організація робочого процесу та умов праці – все це заходи, спрямовані на зниження впливу людського фактора на невизначеність вимірювань.

5.2.4. Варіації реагентів

Реагенти – компоненти імунологічних тестів, їхня варіабельність безпосередньо впливає на відтворюваність та точність результатів. Навіть при використанні комерційних тест-систем з контрольованою якістю, властивості реагентів не є абсолютно ідентичними між серіями виробництва.

Варіабельність реагентів «від серії до серії»

Варіації при виробництві. Різні серії (лоти) одного і того ж реагенту, навіть виготовлені за ідентичною технологією, можуть мати дещо відмінні властивості. Для біологічних реагентів (антигени, отримані з культур патогенів; антитіла, отримані імунізацією тварин; ферментні кон'югати) це особливо виражено через природну варіабельність біологічних систем. Наприклад, антигенна активність різних пулів вірусу грипу може відрізнятися на 20-30% через варіації в умовах культивування, титрі вірусу, ступені очистки.

Кон'югати антитіл. Процес кон'югації (приєднання ферментної мітки до антитіла) не є повністю однорідним: утворюється суміш молекул з

різним числом ферментних молекул на одне антитіло (молярне співвідношення). Різні серії кон'югату можуть мати різне середнє молярне співвідношення, що впливає на чутливість і динамічний діапазон методу. Крім того, частина антитіл може втрачати афінність внаслідок хімічної модифікації при кон'югації.

Мікропланшети з іммобілізованим антигеном. Для планшетів, покритих антигеном виробником, існує варіабельність густини і орієнтації антигенних молекул між різними партіями планшетів, що впливає на зв'язувальну ємність і, відповідно, на амплітуду сигналу.

Деградація реагентів при зберіганні

Втрата активності з часом. Навіть при зберіганні в рекомендованих умовах біологічні реагенти поступово втрачають активність. Ферменти (пероксидаза хрому, лужна фосфатаза) інактивуються через автоокислення, денатурацію; антитіла агрегують, зазнають протеолізу, окислення дисульфідних зв'язків. Швидкість деградації залежить від температури (правило Вант-Гоффа: підвищення температури на 10°C приблизно подвоює швидкість реакцій), освітлення, наявності стабілізаторів, рН буферу.

Нестабільність після відкриття. Після першого відкриття флакону реагент контактує з повітрям (окислення, випаровування розчинника, що підвищує концентрацію), може контамінуватися мікроорганізмами. Виробники зазвичай вказують термін придатності після відкриття (наприклад, 1 місяць при 2-8°C), але реальна стабільність залежить від умов зберігання та частоти використання.

Цикли заморожування-відтавання. Багато реагентів постачаються у замороженому стані і повинні зберігатися при -20°C або -80°C. Кожен цикл заморожування-розморожування (наприклад, при відборі аліквоти) призводить до часткової денатурації білків, утворення нерозчинних агрегатів, зміни концентрації через неповне перемішування після відтавання (ефект концентраційного градієнту). Рекомендується аліквотування реагентів на разові порції, щоб уникати повторного заморожування.

Варіабельність допоміжних реагентів

Буфери та розчинники. Якість води (деіонізованої, дистильованої) впливає на стабільність та активність реагентів. Домішки іонів металів можуть впливати на ферментативну активність; органічні забруднення – на поверхневі властивості, що критично для процесів адсорбції на пластику. Склад буферів (рН, іонна сила, наявність консервантів, детергентів) повинен суворо контролюватися, оскільки навіть невеликі

відхилення рН (± 0.2 одиниці) можуть помітно впливати на імунологічні взаємодії.

Субстрати для ферментів. Хромогенні субстрати (наприклад, ТМВ для пероксидази, рNPP для лужної фосфатази) чутливі до світла, температури, присутності іонів металів. Старіння субстратів призводить до підвищення фонового забарвлення (спонтанна реакція без ферменту), що знижує співвідношення сигнал/фон і може маскувати слабопозитивні зразки.

Контроль варіабельності реагентів. Лабораторія повинна впроваджувати систему вхідного контролю реагентів, що включає перевірку відповідності специфікаціям виробника, тестування кожної нової серії в паралельних експериментах зі старою (перед повною заміною), моніторинг стабільності реагентів у процесі використання через контрольні зразки. Для критичних реагентів доцільне створення великих гомогенних запасів (пулів) з характеристикою їх властивостей, що використовуються протягом тривалого часу, забезпечуючи таким чином більшу міжсерійну відтворюваність.

Невизначеність вимірювань в імунологічній діагностиці має багатофакторну природу і виникає з численних, часто взаємопов'язаних джерел. Біологічна варіабельність, зумовлена природною гетерогенністю живих систем, зазвичай є домінуючим фактором і найменш піддається контролю. Інструментальні похибки, хоча й контрольовані через калібрування та обслуговування обладнання, вносять систематичний внесок у загальну невизначеність. Людський фактор залишається значущим навіть при високому рівні автоматизації, підкреслюючи важливість навчання персоналу та стандартизації процедур. Варіабельність реагентів, особливо біологічного походження, вимагає ретельного контролю якості та моніторингу стабільності.

Розуміння конкретних джерел невизначеності дозволяє розробляти цілеспрямовані стратегії їх мінімізації. Однак повністю усунути варіабельність неможливо через об'єктивні обмеження, що підкреслює необхідність кількісної оцінки сумарної невизначеності та врахування її при інтерпретації результатів. У наступному підрозділі розглядаються практичні підходи до оцінки невизначеності вимірювання в імунологічних методах.

5.3. Оцінка невизначеності вимірювання

Оцінка невизначеності вимірювання в імунологічній діагностиці вимагає систематичного підходу, що дозволяє кількісно виразити сукупний вплив

усіх ідентифікованих джерел варіабельності на результат аналізу. Існує два основні методологічні підходи до оцінки невизначеності: «висхідний» (bottom-up) та «низхідний» (top-down). Для біологічних діагностичних систем, де варіабельність біологічного матеріалу є домінуючим і складно прогнозованим фактором, міжнародні настанови (WOAH, Eurachem/CITAC) рекомендують використання низхідного підходу на основі даних рутинного контролю якості.

5.3.1. Низхідний підхід оцінки невизначеності

Низхідний підхід (також називається підходом контрольних зразків або емпіричним підходом) оцінює невизначеність вимірювання на основі даних відтворюваності, отриманих при багаторазовому тестуванні контрольних зразків у рутинних умовах роботи лабораторії. Цей метод не вимагає детального аналізу кожного окремого джерела невизначеності, а надає інтегральну оцінку сумарної невизначеності, яка проявляється в реальних результатах.

Принципи низхідного підходу

Використання контрольних зразків. Стабільний контрольний зразок (сироватка, позитивний контроль) включається в кожен аналітичний цикл і тестується нарівні з досліджуваними зразками, проходячи всі етапи підготовки та аналізу. Це забезпечує, що варіабельність, яку відображає контрольний зразок, включає всі джерела невизначеності, що виникають у реальних умовах роботи.

Накопичення довгострокових даних. Результати контрольного зразка реєструються протягом тривалого періоду (зазвичай не менше 20-30 незалежних аналітичних циклів, оптимально – протягом кількох місяців). Це дозволяє охопити всі типи варіабельності: внутрішньосерійну, міжсерійну, між різними операторами, між різними партіями реагентів, за різних умов навколишнього середовища.

Статистичний аналіз варіабельності. На основі накопичених даних розраховуються статистичні показники прецизійності: середнє значення, стандартне відхилення (SD), відносне стандартне відхилення (RSD) або коефіцієнт варіації (CV). Ці параметри характеризують типову варіабельність результатів у даній лабораторії при даному методі.

Застосування на пороговому рівні. Невизначеність, визначена на рівні контрольного зразка, екстраполюється (з певними припущеннями) на діагностичне порогове значення (cut-off), де вона найбільш критична для інтерпретації результатів. Це дозволяє визначити діапазон невизначеності навколо порогу та встановити «сіру зону».

Переваги низхідного підходу для імунодіагностики

Відповідність реальним умовам. Оцінка базується на даних, отриманих у звичайних робочих умовах лабораторії, з реальними операторами, реальними варіаціями реагентів, реальними коливаннями факторів навколишнього середовища. Тому отримана оцінка невизначеності адекватно відображає те, що відбувається з досліджуваними зразками.

Автоматичне врахування всіх джерел. Низхідний підхід не вимагає окремої ідентифікації та кількісної оцінки кожного джерела невизначеності (що може бути складним для біологічних систем). Всі джерела, що проявляються в реальній практиці, автоматично інтегровані у варіабельність контрольних зразків.

Використання наявних даних. Лабораторії, що працюють відповідно до стандартів якості (ISO/IEC 17025), вже проводять рутинний моніторинг контрольних зразків як частину внутрішнього контролю якості. Низхідний підхід використовує ці наявні дані без необхідності проведення додаткових спеціальних експериментів.

Простота реалізації. Методологія відносно проста у впровадженні та не потребує глибоких знань у теорії метрології. Розрахунки базуються на стандартних статистичних показниках (середнє, стандартне відхилення), доступних у будь-якому статистичному програмному забезпеченні або навіть в Excel.

Обмеження низхідного підходу

Відсутність інформації про індивідуальні джерела. Низхідний підхід дає лише інтегральну оцінку без деталізації внеску окремих факторів. Якщо необхідно цілеспрямовано знизити невизначеність, може знадобитися додатковий аналіз для ідентифікації домінуючих джерел варіабельності.

Потреба в достатньому обсязі даних. Для надійної оцінки необхідно достатньо багато незалежних спостережень (принаймні 20-30). Для нових методів, що тільки впроваджуються, може знадобитися час для накопичення даних.

Припущення про пропорційність дисперсії. При екстраполяції невизначеності з рівня контрольного зразка на порогове значення припускається, що відносна варіабельність приблизно однакова в цих точках шкали вимірювання. Це припущення може не виконуватися, якщо варіабельність значно залежить від концентрації аналіту (гетероскедастичність). У таких випадках слід вибирати контрольний зразок з рівнем активності, близьким до порогового значення.

5.3.2. Використання контрольних зразків

Вибір та підготовка контрольних зразків є критичними аспектами коректної оцінки невизначеності низхідним підходом. Контрольні зразки повинні відповідати певним вимогам, щоб забезпечити валідність отриманих оцінок.

Вимоги до контрольних зразків

Стабільність. Контрольний зразок повинен зберігати свої властивості протягом тривалого періоду (щонайменше протягом періоду збору даних, оптимально – років). Це досягається правильними умовами зберігання (зазвичай -20°C або -80°C), аліквотуванням на разові порції для уникнення циклів заморожування-відтавання, додаванням стабілізаторів (наприклад, гліцерину, альбуміну). Стабільність повинна бути попередньо підтверджена шляхом періодичного тестування аліквот з одного пулу.

Гомогенність. Всі аліквоти контрольного зразка повинні мати ідентичний склад. Для серологічних зразків це досягається ретельним перемішуванням пулу сироватки перед аліквотуванням, перевіркою гомогенності шляхом випадкового відбору та тестування декількох аліквот.

Відповідність матриці. Контрольний зразок повинен мати ту саму біологічну матрицю, що й досліджувані зразки (наприклад, сироватка крові великої рогатої худоби для тестування зразків ВРХ). Це забезпечує, що матричні ефекти, які впливають на варіабельність, будуть подібними для контролю та зразків.

Рівень реактивності. Для оцінки невизначеності на діагностичному порозі найбільш релевантним є слабкопозитивний контрольний зразок – зразок з рівнем активності, близьким до cut-off значення. Це пов'язано з тим, що невизначеність найбільш критична саме в цій області, де відбувається класифікація на позитивні/негативні результати. Якщо метод має широкий робочий діапазон, може бути доцільним використання кількох контрольних зразків різних рівнів (негативний, слабкопозитивний, середньопозитивний, високопозитивний) для характеристики варіабельності на різних ділянках шкали.

Достатній об'єм. Необхідно підготувати достатню кількість контрольного матеріалу для використання протягом тривалого періоду (принаймні для 50-100 аналітичних циклів). Це дозволить накопичити необхідний обсяг даних і забезпечить послідовність моніторингу якості.

Приготування контрольних зразків. Для серологічних методів контрольні зразки зазвичай готуються шляхом об'єднання (пулування) сироваток від кількох тварин відомого статусу:

Позитивний контроль. Сироватки від природно інфікованих або вакцинованих тварин з підтвердженою наявністю антитіл. Для отримання слабкопозитивного контролю можна розвести сироватку з високим титром відповідним розчинником (буфер, негативна сироватка) або об'єднати високопозитивні та негативні сироватки в певній пропорції.

Негативний контроль. Пул сироваток від тварин, які гарантовано не контактували з патогеном (тварини з вільних від хвороби господарств, підтверджено негативні в інших тестах, тварини до досягнення віку можливого інфікування).

Після приготування пулу проводиться його характеристика: багаторазове тестування (10-20 реплік) для визначення середнього значення та прийнятної діапазону коливань, перевірка стабільності при зберіганні, документування всіх деталей (походження зразків, дата приготування, умови зберігання).

Використання контрольних зразків у рутинній роботі. Контрольні зразки включаються в кожен аналітичний цикл і проходять повний цикл підготовки та аналізу нарівні з досліджуваними зразками:

- розморожування з досліджуваними зразками;
- розведення (якщо потрібно) тією ж процедурою;
- внесення в аналітичну систему (планшет, пробірку) в тій же послідовності;
- інкубації та промивки за стандартним протоколом;
- вимірювання сигналу.

Результат контрольного зразка реєструється в журналі контролю якості або в електронній системі управління даними лабораторії (LIMS) разом з датою, ідентифікатором аналітичного циклу, оператором та іншими релевантними параметрами.

5.3.3. Статистичні методи розрахунку кількісної оцінки невизначеності

Після накопичення достатнього обсягу даних контрольних зразків (мінімум 20-30 незалежних вимірювань, краще 50-100) проводиться статистичний аналіз для кількісної оцінки невизначеності. Розрахунки базуються на показниках прецизійності та передбачають кілька послідовних кроків.

Крок 1. Обчислення базових статистичних параметрів. На основі накопичених даних контрольного зразка розраховуються:

Середнє значення (Mean, \bar{x}). Середнє арифметичне всіх n вимірювань контрольного зразка:

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$$

де x_1, x_2, \dots, x_n – індивідуальні результати вимірювань контрольного зразка в різних аналітичних циклах.

Стандартне відхилення (Standard Deviation, SD). Міра розкиду результатів навколо середнього значення:

$$SD = \sqrt{[\Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)]}$$

де Σ означає суму по всіх вимірюваннях, $(n-1)$ – кількість ступенів свободи (використовується для незміщеної оцінки).

Крок 2. Розрахунок відносного стандартного відхилення. Відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation, RSD), також називане коефіцієнтом варіації (Coefficient of Variation, CV) при вираженні у відсотках, характеризує варіабельність відносно середнього значення:

$$RSD = SD / \bar{x}$$

$$CV (\%) = RSD \times 100\%$$

RSD є безрозмірною величиною, що дозволяє порівнювати прецизійність між різними методами або різними діапазонами вимірювання. В імунологічних методах типові значення CV для контрольних зразків становлять 5-15%, хоча для деяких методів (особливо титраційних) можуть бути вищими.

Крок 3. Обчислення розширеної невизначеності. Для вираження невизначеності з певним рівнем довіри (зазвичай 95%) обчислюється розширена невизначеність (Expanded Uncertainty, U) шляхом множення RSD на коефіцієнт охоплення k:

$$U = k \times RSD$$

Для 95% довірчого інтервалу, припускаючи нормальний розподіл даних, $k = 2$ (точніше, 1.96, але зазвичай округлюють до 2 для простоти). Це означає, що з ймовірністю 95% справжнє значення лежить в межах $\pm 2SD$ від виміряного середнього.

Крок 4. Застосування невизначеності на пороговому рівні. Розширена невизначеність U, обчислена на рівні контрольного зразка, застосовується

до діагностичного порогового значення (cut-off) для визначення діапазону невизначеності навколо порогу:

$$\text{Діапазон невизначеності} = \text{Cut-off} \pm (\text{Cut-off} \times U)$$

Результати, що потрапляють у цей діапазон, знаходяться в «сірій зоні» і вважаються сумнівними або непереконливими. Для таких результатів рекомендується повторне дослідження або підтвердження іншим методом.

Особливості для різних типів даних

Для титрів. Серологічні титри (наприклад, у РЗК, РЗГА, РН) виражаються як розведення у геометричній прогресії (1:2, 1:4, 1:8, ...). Для таких даних статистичний аналіз проводиться на логарифмічно трансформованих значеннях (зазвичай \log_2). Обчислюється середнє геометричне та геометричне стандартне відхилення. Після розрахунку невизначеності в логарифмічній шкалі результат переводиться назад в шкалу титрів через антилогарифм.

Для відсоткових показників. У багатьох ІФА результати виражаються у відсотках (відсоток позитивності, PP; відсоток інгібування, PI). Для таких даних розрахунки проводяться безпосередньо на відсоткових значеннях.

Для значень порогових циклів (Ct) в ПЛР. Ct є логарифмічною мірою концентрації нуклеїнової кислоти. Розрахунки невизначеності проводяться безпосередньо на значеннях Ct.

5.3.4. Вираження невизначеності на порогових значеннях

Застосування невизначеності на діагностичному пороговому значенні (cut-off) є центральним моментом у інтерпретації результатів імунологічних тестів. Розуміння та коректне вираження невизначеності в зоні прийняття рішень дозволяє уникнути хибної класифікації зразків та забезпечує більш обґрунтовану інтерпретацію граничних результатів.

Встановлення діагностичних зон. На основі розрахованої невизначеності навколо cut-off встановлюються три діагностичні зони:

Чітко негативна зона. Результати нижче (Cut-off - U). Зразки в цій зоні з високою ймовірністю не містять антитіл до патогену (або містять у концентрації нижче порогу детекції). Ці зразки класифікуються як негативні без необхідності повторного тестування.

Сіра зона (зона невизначеності). Результати в діапазоні від (Cut-off - U) до (Cut-off + U). Зразки в цій зоні потрапляють у діапазон, де варіабельність методу не дозволяє з достатньою впевненістю класифікувати результат

як позитивний або негативний. Такі результати класифікуються як сумнівні, непереконливі або підозрілі. Для них рекомендується:

- повторне тестування того самого зразка;
- відбір та тестування парної сироватки (через 2-3 тижні) для виявлення динаміки антитілоутворення;
- підтвердження альтернативним методом (якщо доступно);
- прийняття управлінських рішень з урахуванням епідеміологічного контексту.

Чітко позитивна зона. Результати вище (Cut-off + U). Зразки в цій зоні з високою ймовірністю містять специфічні антитіла. Ці зразки класифікуються як позитивні.

Графічне представлення невизначеності

Невизначеність зазвичай представляється графічно у вигляді діапазону (планки похибок) навколо порогового значення на контрольній карті або у звітах про результати. Така візуалізація допомагає інтерпретувати результати граничних зразків.

Для контрольних карт якості, на які наносяться результати контрольних зразків у часі, встановлюються контрольні межі:

- центральна лінія: середнє значення контрольного зразка (\bar{x});
- попереджувальні межі: $\bar{x} \pm 2SD$ (приблизно 95% довірчий інтервал);
- контрольні межі: $\bar{x} \pm 3SD$ (приблизно 99.7% довірчий інтервал).

Результат контрольного зразка, що виходить за попереджувальні межі (але в межах контрольних), сигналізує про можливі проблеми і потребує уваги. Вихід за контрольні межі вказує на втрату контролю над процесом і є підставою для браковки аналітичного циклу та проведення коригувальних дій.

Повідомлення результатів з урахуванням невизначеності

Коли невизначеність релевантна до валідності або застосування результату, лабораторія повинна повідомляти інформацію про невизначеність. В імунологічній діагностиці це особливо актуально для результатів у сірій зоні.

Формати повідомлення результатів можуть включати:

Кількісний результат з невизначеністю. Наприклад: «Відсоток позитивності = $48 \pm 7\%$ (95% ДІ)». Це вказує, що справжнє значення з ймовірністю 95% лежить у діапазоні 41-55%.

Якісний результат з коментарем. Наприклад: «Сумнівний результат. Рекомендується повторне дослідження через 2-3 тижні». Це інформує клініциста про необхідність додаткових дій.

Графічне представлення. Візуальне зображення результату відносно порогового значення та діапазону невизначеності у звіті.

Періодичний перегляд та оновлення оцінок невизначеності

Оцінка невизначеності не є статичною величиною. Вона повинна періодично переглядатися та оновлюватися у міру накопичення нових даних контролю якості. Рекомендується:

- перераховувати невизначеність щонайменше раз на рік або після накопичення додаткових 50-100 точок даних;
- обов'язково перераховувати після будь-яких значних змін у методі (нова партія реагентів, нове обладнання, зміна процедури);
- порівнювати нові оцінки невизначеності з попередніми для виявлення трендів (погіршення або покращення прецизійності);
- документувати всі зміни в оцінках невизначеності та їх причини.

Низхідний підхід до оцінки невизначеності на основі контрольних зразків є практичним та ефективним методом для імунологічної діагностики. Він дозволяє інтегрально врахувати всі джерела варіабельності, що проявляються в реальних умовах роботи лабораторії, використовуючи дані рутинного контролю якості.

Коректний вибір та підготовка контрольних зразків, накопичення достатнього обсягу даних, застосування відповідних статистичних методів та правильна інтерпретація результатів з урахуванням невизначеності на порогових значеннях є ключовими елементами забезпечення якості діагностичних досліджень.

У наступному підрозділі будуть розглянуті конкретні практичні приклади розрахунку невизначеності для основних імунологічних методів, що проілюструють застосування описаних принципів.

5.4. Практичні приклади розрахунків невизначеності

У цьому підрозділі розглядаються конкретні приклади розрахунку невизначеності вимірювання для основних імунологічних методів діагностики інфекційних хвороб тварин. Кожен приклад ілюструє покрокове застосування низхідного підходу на основі даних контрольних зразків, демонструючи як статистичні розрахунки, так і практичну інтерпретацію результатів з урахуванням невизначеності.

Приклад 1. Конкурентний ІФА для виявлення антитіл до вірусу пташиного грипу

Опис методу. Конкурентний імуноферментний аналіз (к-ІФА) використовується для виявлення антитіл до вірусу пташиного грипу типу А в

сироватці крові птиці. Метод базується на конкуренції між антитілами зразка та мічених антитіл за зв'язування з антигеном, іммобілізованим на планшеті. Результати виражаються у відсотках інгібування (PI, Percent Inhibition), де вищі значення PI відповідають вищій концентрації специфічних антитіл.

Формула розрахунку PI:

$$PI = 1 - \frac{\text{ОЩ зразка}}{\text{ОЩ НК}} \times 100\%$$

Діагностичне порогове значення (cut-off) встановлено виробником тест-набору на рівні PI = 50%. Зразки з PI ≥ 50% класифікуються як позитивні, PI < 50% – як негативні.

Дані контрольного зразка. Лабораторія використовує слабкопозитивний контрольний зразок, що включається в кожен аналітичний цикл. Зібрані результати PI для цього контрольного зразка за 30 незалежних аналітичних циклів протягом 6 місяців представлені нижче (для прикладу наведено перші 10 значень з розширеного набору даних):

№ аналітичного циклу	Відсоток інгібування, PI (%)
1	56
2	54
3	61
4	58
5	51
6	49
7	59
8	62
9	55
10	53

(Дані продовжуються до циклу № 30)

Статистичні розрахунки

Крок 1. Розрахунок середнього значення (\bar{x})

$$\text{На основі всіх 30 вимірювань: } \bar{x} = (56 + 54 + 61 + \dots + 58) / 30 = 56.3\%$$

Крок 2. Розрахунок стандартного відхилення (SD):

$$SD = \sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)]} = \sqrt{[\sum(x_i - 56.3)^2 / 29]} = 7.9\%$$

Крок 3. Розрахунок відносного стандартного відхилення (RSD):

$$RSD = SD / \bar{x} = 7.9 / 56.3 = 0.14$$

$$CV (\%) = RSD \times 100\% = 14\%$$

Коефіцієнт варіації 14% вказує на задовільну прецизійність методу (для імунологічних методів прийнятні значення CV зазвичай становлять до 15-20%).

Крок 4. Розрахунок розширеної невизначеності (U). Для 95% довірчого інтервалу використовуємо коефіцієнт охоплення $k = 2$:

$$U = k \times RSD = 2 \times 0.14 = 0.28$$

Крок 5. Застосування невизначеності на пороговому значенні. Діагностичне порогове значення (cut-off) = 50%. Абсолютна невизначеність на цьому рівні:

$$\text{Абсолютна невизначеність} = \text{Cut-off} \times U = 50 \times 0.28 = 14\%$$

Діапазон невизначеності (95% ДІ):

$$95\% \text{ ДІ} = 50 \pm 14\% = \text{від } 36\% \text{ до } 64\%.$$

Інтерпретація результатів. На основі розрахованої невизначеності встановлюються три діагностичні зони:

Негативна зона: $PI < 36\%$. Зразки однозначно негативні.

Сіра зона (зона невизначеності): $PI = 36\text{-}64\%$. Результати сумнівні, рекомендується:

- повторне тестування зразка в наступному циклі;
- відбір парної сироватки через 2-3 тижні для виявлення динаміки;
- підтвердження підтверджувальним методом (наприклад, реакція гальмування гемаглютинації).

Позитивна зона: $PI > 64\%$. Зразки однозначно позитивні.

Практичний приклад інтерпретації

Зразок А: $PI = 32\%$. Результат: негативний (нижче сірої зони).

Зразок Б: $PI = 48\%$. Результат: сумнівний (у сірій зоні, близько до cut-off).

Рекомендація: повторне дослідження.

Зразок В: $PI = 72\%$. Результат: позитивний (вище сірої зони).

Приклад 2: Реакція гальмування гемаглютинації (РЗГА) для визначення титру антитіл

Опис методу. РЗГА використовується для визначення титру антитіл проти гемаглютинуючих вірусів (наприклад, вірус грипу, вірус ньюкаслської хвороби). Метод базується на здатності специфічних антитіл блокувати гемаглютинацію еритроцитів вірусом. Результати виражаються як титр – найбільше розведення сироватки, яке ще повністю гальмує гемаглютинацію. Титри представляються у геометричній прогресії з основою 2: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, ..., 1:512, 1:1024 і т.д.

Діагностичне порогове значення встановлено як титр 1:16 ($\log_2 = 4$). Зразки з титром $\geq 1:16$ вважаються позитивними.

Дані контрольного зразка. Позитивний контрольний зразок тестується в кожній постановці РЗГА.

Результати за 20 постановок:

№ п.п.	Титр	$\log_2(\text{титр})$
1	1:32	5
2	1:16	4
3	1:32	5
4	1:64	6
5	1:32	5
6	1:16	4
7	1:32	5
8	1:32	5
9	1:64	6
10	1:32	5

(Дані продовжуються до постановки № 20)

Статистичні розрахунки

Для титрів завжди працюємо з логарифмічно трансформованими значеннями (\log_2), оскільки титри мають геометричний розподіл:

Крок 1. Середнє значення $\log_2(\text{титр})$

$$\bar{x} \log = (5 + 4 + 5 + 6 + 5 + \dots + 5) / 20 = 5.1$$

Крок 2. Стандартне відхилення $\log_2(\text{титр})$

$$SD \log = \sqrt{[\sum(x_i - 5.1)^2 / 19]} = 0.72$$

Крок 3. Відносне стандартне відхилення

$$RSD = 0.72 / 5.1 = 0.141 \text{ (CV = 14.1\%)}$$

Крок 4. Розширена невизначеність

$$U = 2 \times 0.141 = 0.282$$

Крок 5. Застосування на cut-off ($\log_2 = 4$, що відповідає титру 1:16)

Абсолютна невизначеність = $4 \times 0.282 = 1.13$ у логарифмічній шкалі

95% ДІ у логарифмічній шкалі = $4 \pm 1.13 =$ від 2.87 до 5.13

Перетворення назад у шкалу титрів (антилогарифм):

Нижня межа: $22.87 \approx 7.3 \rightarrow$ титр $\approx 1:7$ (округлюємо до найближчого розведення 1:8)

Верхня межа: $25.13 \approx 35 \rightarrow$ титр $\approx 1:35$ (округлюємо до 1:32)

Інтерпретація результатів

Негативна зона: Титр < 1:8. Зразки негативні.

Сіра зона: Титр 1:8 до 1:32. Результати сумнівні, рекомендується повторне дослідження або дослідження парної сироватки.

Позитивна зона: Титр $\geq 1:64$. Зразки однозначно позитивні.

Примітка: ширина сірої зони для титраційних методів (1:8 до 1:32, тобто три розведення) відображає більшу варіабельність, притаманну візуальним

напівкількісним методам порівняно з інструментальними методами (ІФА, ПЛР).

Невизначеність вимірювання є невід'ємною характеристикою будь-якого кількісного діагностичного методу в імунологічній діагностиці. Розуміння концепції невизначеності, ідентифікація її джерел та кількісна оцінка є ключовими елементами забезпечення якості діагностичних досліджень.

Низхідний підхід на основі контрольних зразків забезпечує практичний та ефективний спосіб оцінки невизначеності, автоматично інтегруючи всі джерела варіабельності, що виникають у реальних умовах роботи лабораторії. Практичні приклади, розглянуті в цьому розділі, демонструють застосування методології для різних типів імунологічних та молекулярних методів, підкреслюючи важливість коректної інтерпретації результатів з урахуванням невизначеності, особливо для зразків, що потрапляють у діагностичну «сіру зону».

Впровадження систематичної оцінки невизначеності вимірювання відповідно до вимог ISO/IEC 17025:2017 не лише забезпечує відповідність міжнародним стандартам якості, але й підвищує діагностичну цінність результатів, дозволяючи приймати більш обґрунтовані рішення щодо епізоотичного статусу тварин та проведення протиепізоотичних заходів.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1. Система управління якістю в діагностичній лабораторії

Система управління якістю (СУЯ) в діагностичній/випробувальній лабораторії є комплексним підходом до забезпечення надійності, точності та відтворюваності результатів діагностичних досліджень. Впровадження ефективної СУЯ є обов'язковою умовою для акредитації лабораторій та забезпечує довіру до результатів серологічної діагностики інфекційних хвороб тварин.

Сучасна СУЯ базується на міжнародних стандартах якості та регулярно оцінюється через процедури внутрішнього і зовнішнього контролю. Основною метою СУЯ є мінімізація помилок на всіх етапах діагностичного процесу – від відбору проб до інтерпретації результатів та видачі звіту.

6.1.1. Стандарти якості (ISO/IEC 17025, GLP)

ISO/IEC 17025:2017 – це міжнародний стандарт «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» (**ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019** – переклад, український стандарт), який встановлює загальні вимоги до компетентності, неупередженості та постійності роботи лабораторій.

Основні вимоги ISO 17025 включають:

Неупередженість і конфіденційність – лабораторія повинна проводити свою діяльність неупереджено, структурувати її таким чином і управляти нею так, щоб зберігати неупередженість та забезпечувати конфіденційність інформації.

Вимоги до структури – чітке визначення правової відповідальності, організаційної структури та управління; відділення відповідальності за діяльність, що може вплинути на довіру до результатів.

Вимоги до ресурсів – персонал має бути компетентним; приміщення та умови навколишнього середовища відповідними; обладнання придатним та відкаліброваним; метрологічна простежуваність результатів вимірювань забезпечена.

Вимоги до процесів – перегляд запитів, тендерів і контрактів; вибір, верифікація та валідація методів; відбір проб; поводження з об'єктами випробувань; забезпечення якості результатів; звітування про результати.

Система менеджменту – документування політики, процедур і системи менеджменту; управління документацією; управління записами; дії щодо ризиків і можливостей; поліпшення; коригувальні дії; внутрішні аудити; аналіз з боку керівництва.

Належна лабораторна практика (GLP – Good Laboratory Practice) є системою менеджменту якості, що охоплює організаційний процес і умови, за яких проводяться неклінічні дослідження з охорони здоров'я та безпеки навколишнього середовища.

Принципи GLP охоплюють:

Організацію випробувального об'єкта та персоналу – чітке визначення ролей і відповідальностей, включаючи керівництво випробувального об'єкта, керівника дослідження, персонал дослідження, програму забезпечення якості.

Програму забезпечення якості – незалежну систему, призначену для забезпечення відповідності досліджень принципам GLP.

Приміщення – відповідний розмір, конструкція та розташування для забезпечення надійності досліджень; адекватне відділення різних діяльностей.

Апаратуру, матеріали та реагенти – документоване калібрування, обслуговування та атестацію відповідності стандартам; належне маркування та зберігання.

Випробувальні системи – належне поводження, розміщення та догляд за біологічними системами, включаючи карантин, ідентифікацію та записи.

Стандартні операційні процедури (СОП) – письмові процедури для всіх аспектів дослідження.

Проведення дослідження – письмовий план дослідження; документування всіх даних безпосередньо, швидко, точно та читабельно.

Звітність про результати дослідження – підготовка остаточного звіту з повним описом методів, результатів і висновків.

Зберігання та утримання записів і матеріалів – архівування всіх документів, зразків та даних відповідно до встановлених термінів зберігання.

Порівняння ISO 17025 та GLP:

Критерій	ISO/IEC 17025	GLP
Область застосування	Випробувальні та калібрувальні лабораторії	Неклінічні дослідження безпеки
Акредитація	Національний орган акредитації	Національний орган моніторингу GLP
Фокус	Технічна компетентність та якість результатів	Організаційний процес та умови досліджень
Валідація методів	Обов'язкова для нестандартних методів	Обов'язкова згідно з планом дослідження
Простежуваність	Метрологічна простежуваність вимірювань до міжнародних стандартів	Простежуваність даних дослідження до джерел

Для діагностичних/випробувальних лабораторій у ветеринарній медицині найбільш релевантним є стандарт ISO 17025, оскільки він безпосередньо стосується випробувальної діяльності та забезпечує визнання результатів на міжнародному рівні. Водночас, принципи GLP можуть бути корисними при проведенні валідаційних досліджень та розробці нових діагностичних методів.

6.1.2. Документація системи якості

Документація системи якості є основою для забезпечення послідовності та відтворюваності діагностичних процедур. Належно розроблена та підтримувана документація забезпечує прозорість роботи

лабораторії, полегшує навчання персоналу та є критичним елементом при аудитах та акредитації.

Ієрархія документів системи якості. Документація СУЯ зазвичай організована в чотирирівневу структуру:

Рівень 1: Керівництво з якості (Quality Manual) є головним документом СУЯ, який визначає політику якості лабораторії, її структуру, обов'язки та загальний опис системи менеджменту. Цей документ містить:

- заяву про політику якості та цілі лабораторії;
- опис організаційної структури та управління;
- сферу акредитації та види діяльності;
- посилання на документовані процедури;
- відповідальності керівництва та персоналу;
- опис взаємодії між елементами системи менеджменту.

Рівень 2: Стандартні операційні процедури (СОП) – детальні інструкції для виконання конкретних завдань або процесів. Кожна СОП повинна містити:

- назву та унікальний ідентифікаційний номер;
- мету та сферу застосування;
- відповідальність за виконання та нагляд;
- детальний опис процедури покроково;
- посилання на пов'язані документи та форми;
- вимоги до безпеки та охорони навколишнього середовища;
- контроль версій (дата випуску, номер версії, історія змін);
- підписи особи, яка затверджує СОП.

Приклади СОП для серологічної діагностики:

1. Відбір, маркування та транспортування зразків (наприклад: сироватка крові);
2. Приймання, реєстрація та зберігання проб;
3. Підготовка проб сироватки крові;
4. Виконання специфічних серологічних тестів (ІФА, РН, РЗК тощо);
5. Калібрування обладнання (спектрофотометри, піпетки, ваги);
6. Приготування та стандартизація реагентів;
7. Внутрішній контроль якості;
8. Участь у програмах зовнішньої оцінки якості;
9. Управління невідповідностями та коригувальні дії;
10. Утилізація біологічних відходів.

Рівень 3: Робочі інструкції та методики. Це детальні технічні документи, які описують конкретні методи випробувань або операції з обладнанням. Вони можуть включати:

- інструкції виробників обладнання;
- вставки до комерційних наборів;
- адаптовані методики з наукових публікацій;
- власні методи, розроблені в лабораторії;
- короткі довідкові картки для рутинних операцій.

Рівень 4: Записи якості (Quality Records). Це заповнені форми, журнали та звіти, які документують виконання роботи та відповідність процедурам.

Приклади включають:

- журнали реєстрації проб;
- протоколи випробувань;
- карти контролю якості;
- журнали калібрування та технічного обслуговування обладнання;
- сертифікати на реагенти та стандартні зразки;
- звіти про невідповідності;
- звіти про внутрішні аудити;
- записи про навчання персоналу;
- остаточні звіти про результати випробувань для клієнтів.

Управління документацією. Ефективне управління документацією передбачає:

Контроль: кожен документ повинен мати унікальний номер, номер версії та дату випуску. Історія змін документується в журналі ревізій. Старі версії видаляються з робочих місць, але архівуються для простежуваності.

Затвердження документів: всі документи перед впровадженням повинні бути переглянуті та затверджені компетентними особами. Зазвичай це керівник відділу якості, технічний керівник або керівник лабораторії.

Доступність: актуальні версії документів повинні бути легко доступні для персоналу на робочих місцях. Це може бути електронна система управління документами або контрольовані паперові копії.

Періодичний перегляд: документи повинні регулярно переглядатися (зазвичай щороку) для забезпечення їх актуальності та відповідності поточній практиці.

Навчання персоналу: при впровадженні нових або переглянутих документів персонал повинен бути проінформований та пройти відповідне навчання.

6.1.3. Акредитація лабораторій

Акредитація є формальним визнанням компетентності лабораторії виконувати конкретні випробування або калібрування згідно з міжнародними стандартами. Це добровільний процес, який демонструє

технічну компетентність лабораторії та здатність надавати достовірні результати.

Акредитація лабораторії забезпечує:

Визнання компетентності – результати акредитованої лабораторії визнаються на національному та міжнародному рівнях завдяки угодам про взаємне визнання між національними органами акредитації.

Довіру замовників – акредитація підтверджує, що лабораторія працює згідно з найвищими стандартами якості.

Конкурентні переваги – акредитація може бути обов'язковою вимогою для участі в тендерах, міжнародній торгівлі або програмах моніторингу хвороб.

Постійне вдосконалення – процес акредитації та подальший нагляд стимулюють лабораторію до безперервного підвищення якості роботи.

Зменшення ризиків – систематичний підхід до управління якістю знижує ймовірність помилок та покращує безпеку праці.

Процес акредитації. Отримання акредитації є багатетапним процесом, який зазвичай включає такі стадії:

Етап 1: Підготовка лабораторії

- аналіз відповідності вимогам ISO 17025
- розробка та впровадження системи управління якістю
- підготовка документації (Керівництво з якості, СОП)
- навчання персоналу щодо вимог стандарту
- валідація методів випробувань
- калібрування обладнання та забезпечення метрологічної простежуваності
- впровадження програм внутрішнього та зовнішнього контролю якості

Етап 2: Подання заявки

- вибір національного органу акредитації
- заповнення заявки з описом сфери акредитації
- надання копії Керівництва з якості та супровідної документації
- оплата відповідних зборів

Етап 3: Попередня оцінка документації

- перевірка поданої документації органом акредитації
- виявлення потенційних невідповідностей
- можливі запити на додаткову інформацію або виправлення

Етап 4: Оцінювання на місці. Команда експертів органу акредитації проводить інспекцію лабораторії, яка включає:

- огляд приміщень та обладнання
- перевірку відповідності документації фактичній практиці

- співбесіди з персоналом для оцінки компетентності
- спостереження за виконанням тестів (можливі «свідчення» тестування)
- перевірку записів якості
- оцінку програм контролю якості
- складання звіту про аудит з переліком невідповідностей (якщо є)

Етап 5: Усунення невідповідностей

- лабораторія розробляє та впроваджує коригувальні дії
- надання доказів усунення невідповідностей органу акредитації
- можливий повторний візит для верифікації критичних невідповідностей

Етап 6: Прийняття рішення та видача сертифіката

- технічний комітет органу акредитації розглядає звіт про оцінювання
- у разі позитивного рішення видається сертифікат акредитації
- лабораторія включається до реєстру акредитованих лабораторій
- сертифікат зазвичай видається на 4–5 років

Підтримання акредитації. Після отримання акредитації лабораторія повинна постійно підтримувати відповідність вимогам:

Регулярний нагляд: орган акредитації проводить періодичні інспекції (зазвичай щороку або раз на два роки) для моніторингу підтримання системи якості.

Повідомлення про зміни: лабораторія зобов'язана інформувати орган акредитації про будь-які суттєві зміни, які можуть вплинути на її компетентність (наприклад, зміна керівництва, переїзд, нові методи).

Участь у міжлабораторних порівняннях: регулярна участь у програмах зовнішньої оцінки якості є вимогою для підтримання акредитації.

Повторна (планова) акредитація: наприкінці терміну дії сертифіката проводиться повна переоцінка лабораторії для продовження акредитації.

Сфера акредитації визначає конкретні види діяльності, методи випробувань та матриці зразків, для яких лабораторія визнана компетентною. Для серологічних лабораторій це може включати:

- конкретні інфекційні захворювання (наприклад, бруцельоз, туберкульоз, класична чума свиней)
- типи тестів (ІФА, РН, РЗК, ІФ та інші)
- види тварин (велика рогата худоба, свині, птиця тощо)
- типи зразків (сироватка, плазма, молоко)

Сфера акредитації може бути розширена за потреби шляхом подання заявки на додаткову оцінку конкретних методів або видів діяльності.

Впровадження системи управління якістю згідно з міжнародними стандартами та отримання акредитації є важливими кроками для діагностичних лабораторій у ветеринарній медицині. Хоча процес вимагає значних зусиль та ресурсів, переваги у вигляді підвищення надійності результатів, визнання компетентності та постійного вдосконалення роботи виправдовують інвестиції.

Успішна акредитація залежить від компетентності керівництва, персоналу та культури якості, що забезпечує всі аспекти діяльності лабораторії. Регулярний моніторинг, безперервне навчання та готовність до змін є ключовими для підтримання високих стандартів роботи.

6.2. Внутрішній контроль якості

Внутрішній контроль якості (ВКЯ) – систематична сукупність процедур, що здійснюються лабораторією для постійного моніторингу надійності та точності діагностичних досліджень. Метою ВКЯ є виявлення помилок у процесі виконання аналізу до того, як результати будуть видані замовнику, а також забезпечення стабільності роботи лабораторії з часом.

Система ВКЯ базується на використанні контрольних зразків з відомими характеристиками, статистичних методах аналізу даних та чітких критеріях прийняття або відхилення результатів серії досліджень.

6.2.1. Контрольні зразки та стандарти

Типи контрольних матеріалів. У системі внутрішнього контролю якості серологічних досліджень використовують декілька типів контрольних матеріалів:

Позитивний контрольний зразок – це сироватка крові тварини, про яку достовірно відомо, що вона містить специфічні антитіла до досліджуваного збудника в середній або високій концентрації. Цей контроль підтверджує, що всі компоненти тест-системи функціонують належним чином і здатні виявляти позитивні зразки.

Негативний контрольний зразок – це сироватка, отримана від клінічно здорової тварини, яка не була інфікована та не вакцинувалася проти досліджуваного збудника. Даний контроль використовують для підтвердження відсутності неспецифічних реакцій та правильності інтерпретації негативних результатів.

Слабкопозитивний контрольний зразок – сироватка з низькою концентрацією специфічних антитіл, близькою до граничного значення (cut-off) тесту. Цей контроль є найбільш критичним для оцінки чутливості методу та його здатності розрізняти сумнівні результати.

Референтний стандарт – це сертифікований зразок із точно визначеною активністю антитіл, виражений в міжнародних одиницях (МО) або інших стандартизованих величинах. Референтні стандарти використовують для калібрування робочих стандартів та нормалізації результатів між різними серіями досліджень.

Вимоги до контрольних зразків. Контрольні матеріали повинні відповідати таким критеріям:

Стабільність – контрольні зразки мають зберігати свої властивості протягом тривалого часу при належних умовах зберігання (зазвичай при температурі -20°C або нижче).

Достатній об'єм – необхідно заготовити достатню кількість матеріалу для забезпечення однорідності контролю впродовж тривалого періоду (щонайменше на 50-100 серій досліджень).

Однорідність – матеріал повинен бути ретельно перемішаний та розфасований на аліквоти по 0,1-0,5 мл для запобігання багаторазовому заморожуванню-розморожуванню.

Характеризація – для кожного контрольного зразка має бути визначено середнє значення та стандартне відхилення на основі мінімум 20-30 незалежних вимірювань.

Документація – на кожний контрольний зразок повинна бути заведена картка з інформацією про джерело, дату заготівлі, умови зберігання, встановлені контрольні межі.

Підготовка та зберігання контрольних зразків. Процедура підготовки контрольних матеріалів включає такі етапи:

1. Відбір великого об'єму сироватки (щонайменше 10-20 мл) від відповідних тварин з відомим серологічним статусом.
2. Центрифугування для видалення залишків клітин та фібрину.
3. Ретельне перемішування для забезпечення однорідності.
4. Розфасовка на аліквоти в стерильні кріопробірки.
5. Маркування з зазначенням типу контролю, дати та унікального номера серії.
6. Швидке заморожування при температурі -70°C або нижче.
7. Зберігання при температурі -20°C або -70°C залежно від типу аналізу та стабільності.

Кожну аліквоту використовують одноразово після розморожування, щоб уникнути денатурації білків внаслідок повторних циклів заморожування-розморожування. Якщо повторне використання неминуче, зразок можна зберігати при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ не більше 2 тижнів.

6.2.2. Контрольні карти (карти Леві-Дженнінгса)

Контрольні карти Леві-Дженнінгса (Levey-Jennings charts), також відомі як карти Шухарта, є графічним інструментом статистичного контролю процесу, який дозволяє візуалізувати стабільність методу дослідження в часі та своєчасно виявляти систематичні та випадкові помилки.

Принцип побудови контрольних карт. Контрольна карта будується на основі результатів вимірювання контрольного зразка в багатьох незалежних серіях досліджень. Для побудови карти необхідно:

1. Виконати щонайменше 20-30 вимірювань контрольного зразка в різних серіях за стабільних умов роботи.
2. Розрахувати середнє значення (\bar{x}) та стандартне відхилення (SD) для отриманих даних.
3. Встановити контрольні межі на карті:
 - центральна лінія (CL) = \bar{x}
 - попереджувальні межі = $\bar{x} \pm 2SD$ (охоплюють ~95% значень)
 - контрольні межі = $\bar{x} \pm 3SD$ (охоплюють ~99,7% значень)
4. На графік наносити результати контрольних вимірювань у кожній серії досліджень з зазначенням дати або номера серії.

Правила Вестгарда для інтерпретації контрольних карт

Правила Вестгарда (Westgard rules) – це набір критеріїв для виявлення помилок на контрольних картах. Основні правила включають:

1_{2s} (попередження) – одне контрольне значення виходить за межі $\bar{x} \pm 2SD$. Це попереджувальний сигнал, що вимагає підвищеної уваги, але серія може бути прийнята.

1_{3s} (відхилення) – одне контрольне значення виходить за межі $\bar{x} \pm 3SD$. Серія відхиляється через випадкову помилку.

2_{2s} (відхилення) – два послідовні контрольні значення виходять за одну межу $\bar{x} \pm 2SD$ (обидва вище або обидва нижче середнього). Свідчить про систематичну помилку.

R_{4s} (відхилення) – різниця між двома послідовними контрольними значеннями перевищує $4SD$. Вказує на різку зміну умов.

4_{1s} (відхилення) – чотири послідовні контрольні значення виходять за одну межу $\bar{x} \pm 1SD$. Свідчить про систематичне зміщення.

10 \bar{x} (відхилення) – десять послідовних контрольних значень розташовані по один бік від центральної лінії. Свідчить про стійке систематичне зміщення.

Частота використання контрольних карт. Контрольні зразки включають у кожну серію досліджень. Рекомендується використовувати:

- щонайменше один позитивний та один негативний контроль на кожну планшету (для ІФА);
- додатково слабкопозитивний контроль для оцінки чутливості;
- результати контролів наносять на карту одразу після завершення серії для оперативного виявлення проблем.

Карти слід регулярно переглядати (щомісяця або після кожних 20-30 вимірювань) для виявлення трендів, циклічності або інших систематичних змін, які можуть вказувати на необхідність коригувальних дій.

6.2.3. Моніторинг показників відтворюваності

Відтворюваність – це ступінь узгодженості між результатами незалежних вимірювань, виконаних за однакових умов. Моніторинг відтворюваності є критичним для забезпечення надійності діагностичних результатів.

Типи відтворюваності:

Повторюваність – варіація результатів при виконанні повторних вимірювань одного зразка в межах однієї серії досліджень (тим самим оператором, з використанням того самого обладнання і реагентів, в короткий проміжок часу).

Внутрішньолабораторна відтворюваність – варіація результатів при виконанні досліджень в різних серіях, різними операторами, з різними серіями реагентів, але в одній лабораторії.

Міжлабораторна відтворюваність – варіація результатів при виконанні досліджень в різних лабораторіях. Оцінюється в рамках програм зовнішньої оцінки якості.

Показники для оцінки відтворюваності

Коефіцієнт варіації (CV, Coefficient of Variation) – найпоширеніший показник відтворюваності, що виражається у відсотках:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

де SD – стандартне відхилення, \bar{x} – середнє значення.

Для більшості серологічних тестів прийнятними вважаються такі значення CV:

- для повторюваності (within-run): CV < 10%
- для внутрішньолабораторної відтворюваності: CV < 15%

Винятком є зразки з дуже низькою або дуже високою концентрацією антитіл, де CV може бути вищим без втрати діагностичної цінності тесту.

Процедура моніторингу відтворюваності. Для ефективного моніторингу відтворюваності рекомендується:

1. Використовувати панель контрольних зразків з низькою, середньою та високою концентрацією антитіл.
2. Виконувати дублікатні або триплікатні вимірювання контрольних зразків у кожній серії.
3. Розраховувати CV для кожного рівня контролю регулярно (щомісяця або після 20-30 серій).
4. Вести журнал відтворюваності з графічним відображенням динаміки CV у часі.
5. При перевищенні встановлених меж CV проводити аналіз причин та вживати коригувальних заходів.

Погіршення відтворюваності може вказувати на проблеми з обладнанням (піпетки, промивач, фотометр), нестабільність реагентів, недостатню кваліфікацію персоналу або неоптимальні умови довкілля.

6.2.4. Критерії прийняття/відхилення результатів

Кожна лабораторія повинна встановити чіткі критерії для прийняття або відхилення результатів серії досліджень на основі даних внутрішнього контролю якості. Ці критерії мають бути задокументовані в СОП та суворо дотримуватися персоналом.

Загальні критерії прийняття серії. Серія досліджень вважається прийнятною, якщо виконуються всі наступні умови:

1. Негативний контроль дає негативний результат (значення нижче cut-off).
2. Позитивний контроль дає позитивний результат (значення вище cut-off).
3. Результати всіх контрольних зразків знаходяться в межах встановлених контрольних меж ($\bar{x} \pm 2SD$ або $\bar{x} \pm 3SD$ залежно від прийнятої стратегії).
4. Не порушено жодне з правил Вестгарда (для методів, де застосовуються ці правила).
5. CV повторних вимірювань контрольних зразків не перевищує встановленого ліміту (зазвичай 10-15%).
6. Відсутні візуальні дефекти планшети або реагентів (бульбашки, преципітація, контамінація).
7. Дотримані всі критичні параметри протоколу (температура, час інкубації, об'єми реагентів).

Критерії відхилення серії. Серія досліджень має бути відхилена у наступних випадках:

- негативний контроль дає позитивний результат – свідчить про неспецифічне зв'язування або контамінацію.
- позитивний контроль дає негативний результат – вказує на втрату чутливості методу через неякісні реагенти або технічні помилки.
- порушено будь-яке з правил Вестгарда (1_{3s} , 2_{2s} , R_{4s} , 4_{1s} , $10\bar{x}$).
- CV повторних вимірювань перевищує максимально допустиме значення.
- виявлено грубі технічні помилки (пропущені кроки протоколу, неправильні розведення, помилки в маркуванні).
- наявні візуальні дефекти або аномалії результатів (неоднорідне забарвлення лунок, значна варіація між дублікатами).

Дії при відхиленні серії:

1. Документувати причину відхилення в журналі контролю якості.
2. Провести аналіз можливих причин невідповідності (обладнання, реагенти, оператор, умови середовища).
3. Вжити коригувальних заходів (перевірка обладнання, заміна реагентів, додаткове навчання персоналу).
4. Повторити дослідження зразків з відхиленої серії після усунення проблем.
5. Не видавати результати до успішного завершення повторних досліджень з прийнятними показниками контролю.

Додаткові рекомендації:

1. При наближенні контрольних значень до попереджувальних меж ($\bar{x} \pm 2SD$) рекомендується підвищити частоту моніторингу та готуватися до можливих коригувальних дій.
2. Періодично (кожні 3-6 місяців) переглядати встановлені контрольні межі на основі накопичених даних для забезпечення їх актуальності.
3. При зміні серії реагентів, обладнання або значних модифікаціях методу перевстановлювати контрольні межі на основі нових даних.
4. Вести детальні записи всіх випадків відхилення серій, причин та вжитих коригувальних заходів для аналізу трендів та вдосконалення процедур.

Ефективна система внутрішнього контролю якості є невід'ємною складовою роботи діагностичної лабораторії. Використання контрольних зразків, контрольних карт Шухарта, моніторинг відтворюваності та дотримання чітких критеріїв прийняття/відхилення результатів забезпечують високу надійність діагностичних досліджень, сприяють своєчасному виявленню проблем і підтримують довіру до результатів лабораторії.

Постійний моніторинг показників внутрішнього контролю якості, поєднаний з участю в програмах зовнішньої оцінки якості, створює комплексну систему забезпечення якості, яка відповідає міжнародним стандартам та вимогам акредитації.

6.3. Зовнішня оцінка якості

Зовнішня оцінка якості (ЗОЯ) – незалежна система перевірки точності та надійності результатів лабораторних досліджень через регулярне тестування стандартизованих зразків, що розсилаються організатором програми. На відміну від внутрішнього контролю якості, який виконується самою лабораторією, ЗОЯ забезпечує об'єктивну оцінку роботи лабораторії шляхом порівняння її результатів з результатами інших лабораторій-учасниць або з референтними значеннями.

Участь у програмах ЗОЯ є обов'язковою вимогою для акредитованих лабораторій згідно зі стандартом ISO/IEC 17025:2017 та рекомендується всім діагностичним лабораторіям як засіб підтвердження компетентності та постійного вдосконалення якості роботи.

6.3.1. Міжлабораторні порівняльні випробування

Міжлабораторні порівняльні випробування – це організовані програми, в рамках яких лабораторії отримують ідентичні зразки для аналізу, після чого їхні результати порівнюються з референтними значеннями або консенсусом учасників для оцінки компетентності кожної лабораторії.

Основні цілі міжлабораторних порівняльних випробувань включають:

Об'єктивна оцінка точності – порівняння результатів лабораторії з референтними або консенсусними значеннями дозволяє виявити систематичні зміщення в аналітичному процесі.

Оцінка відтворюваності – аналіз варіації результатів між різними лабораторіями виявляє проблеми зі стандартизацією методів або реагентів.

Виявлення аналітичних помилок – участь у ЗОЯ допомагає своєчасно виявляти проблеми з обладнанням, реагентами, методиками або кваліфікацією персоналу.

Демонстрація компетентності – успішна участь у програмах ЗОЯ є доказом технічної компетентності лабораторії для органів акредитації, регуляторних органів та замовників.

Гармонізація методів – участь багатьох лабораторій у тих самих програмах сприяє стандартизації підходів та підвищенню порівняльності результатів.

Освітня функція – участь у ЗОЯ стимулює персонал лабораторії до підвищення кваліфікації та вдосконалення методик роботи.

Організація міжлабораторних випробувань. Базова схема проведення міжлабораторних порівняльних випробувань включає наступні етапи:

1. *Підготовка тестових зразків* – організатор програми (зазвичай референтна лабораторія або спеціалізований центр) готує панель зразків з відомими або консенсусними характеристиками. Зразки повинні бути однорідними, стабільними та максимально наближеними до рутинних діагностичних зразків.

2. *Розсилання зразків* – панель зразків розсилається лабораторіям-учасницям з дотриманням умов холодового ланцюга. Кожна лабораторія отримує ідентичні зразки під закодованими номерами для забезпечення сліпого тестування.

3. *Тестування зразків* – лабораторії досліджують зразки згідно зі своїми рутинними методиками та протоколами, як ніби це звичайні діагностичні проби. Важливо не використовувати спеціальні процедури або додаткові контролю, щоб результати відображали реальну роботу лабораторії.

4. *Подання результатів* – лабораторії надсилають свої результати організатору в установлений термін (зазвичай 2-4 тижні) через онлайн-форми або електронну пошту.

5. *Статистичний аналіз* – організатор аналізує результати всіх учасників, розраховує статистичні показники (середні значення, стандартні відхилення, z-scores) та оцінює ефективність кожної лабораторії.

6. *Звіт і зворотній зв'язок* – кожна лабораторія отримує індивідуальний звіт зі своїми результатами, їх оцінкою відносно референтних значень або консенсусу, а також зведений звіт з анонімізованими результатами всіх учасників для порівняння.

Типи зразків у міжлабораторних випробуваннях. У програмах ЗОЯ для серологічної діагностики використовують різні типи зразків:

Натуральні зразки – сироватки крові від клінічно обстежених тварин з підтвердженим серологічним статусом. Ці зразки найкраще відображають реальні діагностичні ситуації, але можуть бути обмеженими за об'ємом і нестабільними при тривалому зберіганні.

Пулові зразки – змішані сироватки від декількох тварин для забезпечення достатнього об'єму і однорідності. Дозволяють розіслати однакові зразки великій кількості лабораторій.

Штучно збагачені зразки – негативні сироватки, до яких додано відомі кількості специфічних антитіл або антигенів. Використовують для точної оцінки кількісних методів.

Ліофілізовані зразки – висушені заморожуванням сироватки, які відновлюють перед використанням. Забезпечують високу стабільність при транспортуванні та зберіганні, але можуть дещо відрізнятися від натуральних зразків.

Частота участі у міжлабораторних випробуваннях. Стандарт ISO/IEC 17025:2017 вимагає участі акредитованих лабораторій у програмах ЗОЯ щонайменше один раз на рік для кожного акредитованого методу. На практиці рекомендується наступна частота:

- для рутинних серологічних методів – 2-4 рази на рік.
- для особливо важливих або складних методів – 4-6 разів на рік.
- для нових або нещодавно впроваджених методів – частіше на початковому етапі (щомісяця або щоквартально).

6.3.2. Програми професійного тестування

Програми професійного тестування – це систематичні ініціативи, організовані референтними лабораторіями, міжнародними організаціями або національними органами, які регулярно проводять міжлабораторні порівняльні випробування для певних методів чи патогенів.

Міжнародні програми профтестування. Для діагностики інфекційних хвороб тварин існує низка міжнародних програм профтестування:

Програми WOAH (Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин) – референтні лабораторії WOAH організують програми ЗОЯ для захворювань, включених до списку нотифікованих хвороб (ящур, класична чума свиней, африканська чума свиней, пташиний грип тощо). Участь у цих програмах є важливою для лабораторій, що беруть участь у міжнародній торгівлі тваринами та продукцією.

Програми FAO (Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН) – організація координує програми ЗОЯ для зоонозних захворювань та хвороб, що мають значення для продовольчої безпеки.

Європейські програми – Європейський союз через референтні лабораторії ЄС організовує регулярні програми профтестування для лабораторій країн-членів та асоційованих країн.

Регіональні програми – окремі регіони можуть організовувати власні програми профтестування для захворювань, специфічних для даного географічного ареалу.

Вибір відповідних програм профтестування. При виборі програм профтестування лабораторія повинна врахувати:

- сферу акредитації – програми ЗОЯ мають покривати всі акредитовані методи лабораторії.
- репутацію організатора – перевагу слід віддавати програмам, організованим визнаними референтними лабораторіями або міжнародними організаціями.
- відповідність методам – зразки та методи оцінювання в програмі ЗОЯ повинні відповідати методикам, що застосовуються в лабораторії.
- частоту раундів – програма повинна забезпечувати регулярність (щонайменше 1-2 рази на рік).
- якість зворотного зв'язку – програма має надавати детальні звіти з аналізом результатів та рекомендаціями.
- вартість – програми можуть суттєво відрізнятись за вартістю, тому слід збалансувати бюджет та потреби лабораторії.

Оцінювання результатів у програмах профтестування. Організатори програм використовують різні статистичні методи для оцінки результатів лабораторій:

Z-score (стандартизоване відхилення) – найпоширеніший показник ефективності, що розраховується за формулою:

$$z = (x - X) / \sigma$$

де x – результат лабораторії, X – референтне або консенсусне значення, σ – стандартне відхилення для профтестування.

Інтерпретація z-score:

$|z| \leq 2,0$ – результат задовільний (acceptable)

$2,0 < |z| \leq 3,0$ – результат сумнівний (questionable), потребує уваги

$|z| > 3,0$ – результат незадовільний (unsatisfactory), потрібні коригувальні дії

Якісна оцінка – для якісних тестів (позитивний/негативний) оцінка базується на відсотку правильних класифікацій зразків. Результат вважається задовільним, якщо всі зразки класифіковано правильно або допущено не більше однієї помилки (залежно від кількості зразків).

6.3.3. Аналіз розбіжностей

Аналіз розбіжностей є критичним компонентом системи зовнішньої оцінки якості. Коли результати лабораторії в програмі профтестування виявляються незадовільними або сумнівними, необхідно провести детальне розслідування причин невідповідності та вжити коригувальних заходів.

Причини розбіжностей. Розбіжності між результатами лабораторії та референтними значеннями можуть виникати з різних причин:

1. Аналітичні помилки

- несправність обладнання – некалібровані піпетки, несправний промивач планшетів, погана роботи фотометра.
- проблеми з реагентами – застарілі або неправильно зберігалися реагенти, контамінація, неправильні розведення.
- порушення протоколу – неправильні час або температура інкубації, пропущені кроки, використання невірних розведень.

2. Помилки інтерпретації

- невірне встановлення cut-off – використання неадекватних граничних значень для класифікації результатів.
- помилки розрахунків – арифметичні помилки при обчисленні відсотка позитивності або титрів.
- неправильна нормалізація – помилки при коригуванні результатів за контрольними зразками.

3. Людський фактор

- недостатня кваліфікація персоналу – відсутність належного навчання або досвіду виконання методу.
- помилки в маркуванні – переплутування зразків або лунок на планшеті.
- неуважність – технічні помилки через втому або відволікання.

4. Преаналітичні фактори

- пошкодження зразків – несправне транспортування або зберігання призвело до деградації антитіл.
- забруднення зразків – перехресна контамінація між зразками.

Процедура аналізу розбіжностей. При виявленні незадовільних результатів лабораторія повинна провести систематичний аналіз за наступною схемою:

1. Документування невідповідності – зафіксувати всі деталі незадовільного результату, включаючи значення z-score, референтне значення, фактичний результат лабораторії.

2. Перевірка даних – переглянути всі первинні дані та розрахунки для виключення арифметичних помилок або помилок введення даних.

3. Аналіз протоколу – детально перевірити дотримання всіх етапів протоколу під час виконання тесту.

4. Перевірка обладнання – провести технічне обслуговування та калібрування всього обладнання, використаного в тесті.

5. Перевірка реагентів – оцінити термін придатності, умови зберігання та якість використаних реагентів.

6. Аналіз результатів ВКЯ – переглянути дані внутрішнього контролю якості за період виконання тесту профтестування для виявлення трендів або аномалій.

7. Інтерв'ювання персоналу – обговорити з виконавцями особливості проведення тесту, виявити можливі незадокументовані відхилення.

8. Порівняння з попередніми раундами – проаналізувати результати попередніх програм профтестування для виявлення систематичних проблем.

Коригувальні дії та запобіжні заходи. На основі результатів аналізу розбіжностей лабораторія повинна розробити та впровадити план коригувальних дій:

- усунення виявлених проблем – ремонт або заміна несправного обладнання, оновлення реагентів, перегляд протоколів.
- додаткове навчання персоналу – проведення тренінгів або практичних занять для підвищення кваліфікації.
- впровадження додаткових контролів – посилення процедур внутрішнього контролю якості в проблемних областях.
- перевірка ефективності – повторне тестування контрольних зразків або участь у позачерговому раунді профтестування для підтвердження усунення проблем.
- документування – ведення детальних записів про всі виявлені проблеми, вжиті заходи та їх результати.

Зовнішня оцінка якості через участь у міжлабораторних порівняльних випробуваннях та програмах профтестування є невід'ємною частиною системи забезпечення якості діагностичної лабораторії. Регулярна участь у таких програмах забезпечує об'єктивну перевірку компетентності лабораторії, сприяє виявленню та усуненню аналітичних проблем, підвищує довіру до результатів лабораторії з боку замовників і регуляторних органів.

Систематичний аналіз розбіжностей та своєчасне впровадження коригувальних дій дозволяють не лише усувати виявлені проблеми, але й запобігати їх повторенню, що призводить до постійного вдосконалення якості роботи лабораторії та підтримання високих стандартів діагностичної діяльності.

6.4. Калібрування обладнання та його обслуговування

Калібрування вимірювального обладнання є важливим елементом системи забезпечення якості діагностичної лабораторії. Згідно з ДСТУ ISO 10012:2005 «Системи керування вимірюванням. Вимоги до процесів

вимірювання та вимірювального обладнання», калібрування визначається як сукупність операцій, що встановлюють за певних умов співвідношення між значеннями величин, отриманими за допомогою даних засобів вимірювальної техніки, і відповідними значеннями величин, визначеними за допомогою еталонів, з метою забезпечення простежуваності до одиниць SI.

Метрологічне підтвердження обладнання охоплює калібрування, верифікацію (підтвердження відповідності встановленим вимогам), необхідне регулювання або ремонт, повторне калібрування, а також пломбування та маркування обладнання відповідними ідентифікаторами статусу.

6.4.1. Вимоги до калібрування

Загальні вимоги до системи калібрування. Відповідно до вимог ДСТУ ISO 10012:2005, система керування вимірюванням повинна забезпечувати:

1. Ідентифікацію всього вимірювального обладнання – кожен прилад має бути занесений до реєстру обладнання з унікальним ідентифікаційним номером.

2. Належний статус калібрування – обладнання повинно мати дійсний сертифікат калібрування або свідоцтво про повірку перед використанням.

3. Простежуваність вимірювань – ланцюг калібрування повинен прослідковуватися до національних або міжнародних еталонів SI через акредитовані калібрувальні лабораторії.

4. Документування метрологічних характеристик – для кожного приладу мають бути визначені та задокументовані метрологічні вимоги (діапазон, точність, стабільність, роздільна здатність).

5. Контрольовані умови експлуатації – обладнання має використовуватися в умовах довкілля, які є контрольованими або відомі з достатньою точністю.

Метрологічні вимоги до обладнання. Метрологічні вимоги визначають з урахуванням призначення обладнання та вимог до якості кінцевих результатів досліджень. Для серологічної лабораторії метрологічні вимоги встановлюють для наступного обладнання:

Піпетки та дозатори змінного об'єму – точність дозування повинна відповідати вимогам виробника (зазвичай $\pm 0,5-2\%$ від номінального об'єму залежно від діапазону). Калібрування проводять гравіметричним методом з використанням аналітичних ваг.

Фотометри для планшетів (ІФА-рідери) – перевірка лінійності вимірювання оптичної густини у робочому діапазоні (зазвичай 0,0-4,0 од. ОГ), точність

фотометричних вимірювань, відтворюваність показань. Використовують сертифіковані оптичні фільтри.

Термостати та інкубатори – точність підтримання температури в межах $\pm 0,5-1,0^{\circ}\text{C}$ від заданого значення, однорідність температурного поля в робочому об'ємі. Калібрування проводять з використанням прецизійних термометрів або температурних логерів.

Холодильники та морозильники – підтримання температури в заданих межах (для холодильників $+2...+8^{\circ}\text{C}$, для морозильників $-15...-25^{\circ}\text{C}$ або нижче), стабільність температури, час відновлення після відкриття дверей.

Ваги аналітичні та технічні – точність зважування відповідно до класу точності (для аналітичних ваг зазвичай $\pm 0,0001-0,001$ г), лінійність, повторюваність. Калібрування проводять з використанням сертифікованих гир.

Таймери та секундоміри – точність відліку часу (зазвичай ± 1 секунда на годину), стабільність ходу. Перевірка проводиться порівнянням з еталонними часовими джерелами.

pH-метри – точність вимірювання pH (зазвичай $\pm 0,01-0,05$ од. pH), стабільність показань. Калібрування проводять з використанням сертифікованих буферних розчинів.

Процедура калібрування та верифікації. Процес метрологічного підтвердження включає наступні етапи:

1. Планування калібрування – складання річного графіка калібрування всього обладнання з урахуванням міжкалібрувальних інтервалів, призначення відповідальних осіб.

2. Підготовка до калібрування – перевірка стану обладнання, його очищення, виведення на робочий режим.

3. Калібрування – виконання вимірювань згідно з затвердженими методиками, порівняння з еталонами, реєстрація результатів.

4. Верифікація – підтвердження того, що метрологічні характеристики обладнання відповідають встановленим вимогам.

5. Регулювання (при необхідності) – якщо обладнання не відповідає вимогам, проводять його регулювання, ремонт або заміну.

6. Повторне калібрування – після регулювання або ремонту обладнання повторно калібрують для підтвердження відповідності вимогам.

7. Пломбування та маркування – на обладнанні розміщують етикетки зі статусом калібрування (дата останнього калібрування, дата наступного калібрування, відповідальна особа).

8. Документування – оформлення протоколів калібрування, сертифікатів або свідоцтв, внесення записів до журналів обліку.

Визначення міжкалібрувальних інтервалів

Міжкалібрувальний інтервал – це максимальний дозволений проміжок часу між послідовними калібруваннями обладнання. Згідно з ДСТУ ІЛАС-G24/OIML D10:2013, інтервали встановлюють з урахуванням:

- рекомендацій виробника обладнання.
- стабільності метрологічних характеристик (історія попередніх калібрувань).
- інтенсивності використання обладнання.
- умов експлуатації та зберігання.
- критичності обладнання для якості результатів.
- вимог регуляторних органів та акредитації.

Типові міжкалібрувальні інтервали для обладнання серологічної лабораторії:

- піпетки та дозатори – щорічно або раз на 6 місяців при інтенсивному використанні
- фотометри – щорічно
- термостати та інкубатори – раз на 6-12 місяців
- холодильники та морозильники – щоквартально (моніторинг температури)
- ваги аналітичні – щорічно з щоденною перевіркою контрольною гирею
- рН-метри – щорічно з щоденним калібруванням буферними розчинами

Інтервали можуть коригуватися на основі результатів попередніх калібрувань: якщо обладнання демонструє стабільні характеристики протягом кількох циклів калібрування, інтервал може бути збільшений; якщо виявляються відхилення – зменшений.

6.4.2. Графіки технічного обслуговування

Регулярне технічне обслуговування обладнання є невід'ємною складовою системи керування вимірюванням згідно з ДСТУ ISO 10012:2005. Профілактичне обслуговування запобігає несподіваним поломкам, подовжує термін служби обладнання та забезпечує стабільність метрологічних характеристик.

Види технічного обслуговування

Щоденне обслуговування – виконується персоналом лабораторії перед початком роботи та після її завершення:

- візуальний огляд обладнання на наявність пошкоджень.
- очищення робочих поверхонь та доступних частин.

- перевірка показників температури холодильників, морозильників, інкубаторів.
- калібрування рН-метра буферними розчинами.
- перевірка ваг контрольною гирею.

Щотижневе обслуговування – більш ретельне очищення та перевірка функціонування:

- очищення промивача планшетів, перевірка проходження всіх каналів.
- дезінфекція робочих поверхонь ламінарних боксів.
- перевірка функціонування центрифуг, термостатів, шейкерів.

Щомісячне обслуговування – планова профілактика:

- детальна очистка фотометра (оптичних шляхів, датчиків).
- перевірка та очищення фільтрів систем вентиляції.
- розморожування та очищення морозильних камер (при необхідності).
- перевірка герметичності дверцят холодильного обладнання.

Квартальне та річне обслуговування – комплексна профілактика з можливим залученням спеціалізованих сервісних організацій:

- повна діагностика та профілактика складного обладнання (фотометрів, автоклавів, термостатів).
- заміна зношених деталей, ущільнювачів, фільтрів.
- перевірка електричних з'єднань, заземлення.
- метрологічне підтвердження (калібрування) відповідно до графіка.

Документування технічного обслуговування

Всі процедури технічного обслуговування повинні бути задокументовані:

- журнал обліку обладнання – містить перелік всього обладнання з інвентарними номерами, датами введення в експлуатацію, термінами служби.
- паспорт обладнання – технічна документація виробника, інструкції з експлуатації, сертифікати відповідності.
- журнал технічного обслуговування – записи про всі види обслуговування з датами, описом робіт, підписами виконавців.
- протоколи калібрування та повірки – сертифікати або свідоцтва з результатами метрологічного підтвердження.
- журнал несправностей та ремонтів – записи про виявлені несправності, проведені ремонти, заміну комплектуючих.
- графік технічного обслуговування та калібрування – планування робіт на рік з позначенням виконаних робіт.

Дії при виявленні несправностей обладнання

При виявленні несправностей або невідповідності метрологічних характеристик обладнання встановленим вимогам необхідно:

1. негайно вивести обладнання з експлуатації, позначити його відповідним маркуванням (наприклад, червоною етикеткою «Несправне»).
2. Повідомити керівника лабораторії та відповідальну особу за обладнання.
3. Оцінити вплив несправності на результати досліджень, виконаних з використанням цього обладнання.
4. При необхідності переглянути та анулювати результати, отримані з моменту останнього успішного калібрування або обслуговування.
5. Організувати ремонт або заміну несправного обладнання.
6. Після ремонту провести повне метрологічне підтвердження перед поверненням обладнання в експлуатацію.
7. Задokumentувати всі дії в журналі несправностей та провести розслідування для запобігання повторенню.

6.4.3. Кваліфікація персоналу

Компетентність персоналу, що виконує калібрування, технічне обслуговування та експлуатацію обладнання, є критичним фактором забезпечення якості вимірювань. Згідно з ДСТУ ISO 10012:2005, організація повинна забезпечити, щоб персонал, який впливає на якість вимірювань, був компетентним на основі відповідної освіти, навчання, умінь та досвіду.

Вимоги до кваліфікації персоналу. Персонал діагностичної лабораторії, залучений до роботи з вимірювальним обладнанням, повинен відповідати наступним вимогам:

Освіта – вища або середня спеціальна освіта за напрямками: ветеринарна медицина, біологія, біотехнологія, лабораторна діагностика, хімія або суміжні спеціальності.

Спеціальне навчання – проходження курсів або тренінгів з:

- основ метрології та калібрування вимірювального обладнання.
- роботи з конкретними типами обладнання (піпетки, фотометри, термостати тощо).
- вимог стандартів ISO/IEC 17025, ISO 10012 щодо керування вимірюванням.
- методів оцінювання невизначеності вимірювань.

Практичний досвід – робота під наглядом досвідченого співробітника протягом мінімум 3-6 місяців з поступовим збільшенням самостійності. Перед допуском до самостійної роботи персонал повинен продемонструвати компетентність через практичну перевірку навичок.

Регулярне підвищення кваліфікації – участь у семінарах, конференціях, курсах підвищення кваліфікації не рідше одного разу на 3-5 років. Вивчення оновлень стандартів, нових методик та обладнання.

Розподіл обов'язків персоналу

Відповідальний за обладнання – призначається керівництвом лабораторії з числа найбільш досвідчених співробітників. Відповідальності:

- ведення реєстру обладнання та контроль за його станом.
- складання та контроль виконання графіків калібрування та технічного обслуговування.
- організація зовнішнього калібрування через акредитовані організації.
- контроль документування всіх процедур калібрування та обслуговування.
- навчання персоналу правилам експлуатації обладнання.

Користувачі обладнання (лаборанти, біологи) – персонал, що безпосередньо працює з обладнанням. Відповідальності:

- дотримання інструкцій з експлуатації обладнання.
- виконання щоденного обслуговування (очищення, перевірка показників).
- негайне повідомлення про виявлені несправності або відхилення.
- ведення журналів використання обладнання.

Технічний персонал або сервісні організації – виконують складні ремонти, калібрування спеціалізованого обладнання, що потребує спеціальних знань або устаткування.

Програма навчання та оцінювання компетентності

Лабораторія повинна мати документовану програму навчання персоналу, що включає:

1. Вступне навчання – ознайомлення нових співробітників з обладнанням лабораторії, правилами безпеки, СОП на роботу з обладнанням.

2. Навчання на робочому місці – практичне навчання під наглядом досвідченого співробітника з веденням журналу навчання.

3. Оцінювання компетентності – періодична (щорічна) оцінка теоретичних знань (тестування) та практичних навичок (спостереження за роботою).

4. Додаткове навчання – при впровадженні нового обладнання або методів, при виявленні недостатньої компетентності.

5. Документування – ведення особових справ співробітників з дипломами, сертифікатами, результатами оцінювання, записами про навчання.

Ефективна система калібрування обладнання та його технічного обслуговування, побудована відповідно до вимог ДСТУ ISO 10012:2005,

забезпечує метрологічну простежуваність вимірювань, підтримання обладнання в робочому стані та запобігає отриманню недостовірних результатів діагностичних досліджень.

Компетентний персонал, належним чином навчений та регулярно підвищуючий свою кваліфікацію, є ключовим фактором успішного функціонування системи керування вимірюванням. Поєднання технічного обслуговування, регулярного калібрування та компетентного персоналу створює надійну основу для забезпечення якості діагностичних послуг лабораторії та відповідності вимогам міжнародних стандартів і акредитації.

Додаток А. Терміни та скорочення

Цей глосарій містить основні терміни та визначення, що використовуються в імунологічних методах діагностики у ветеринарії. Терміни подані в алфавітному порядку з англійськими еквівалентами та детальними визначеннями.

Термін українською	Термін англійською	Визначення
Авідність	<i>Avidity</i>	Сумарна міцність зв'язування багатовалентного антигену з багатовалентним антитілом; визначається як функціональною афінністю окремих центрів зв'язування, так і кількістю центрів зв'язування.
Аглютинація	<i>Agglutination</i>	Формування видимих агрегатів корпускулярних антигенів (клітин, латексних частинок) під впливом специфічних антитіл.
Аглютиніни	<i>Agglutinins</i>	Антитіла, здатні викликати аглютинацію корпускулярних антигенів.
Алармінів	<i>Alarmins</i>	Ендогенні молекули, що вивільняються при пошкодженні клітин і активують вроджену імунну відповідь.
Аналітична специфічність	<i>Analytical specificity</i>	Здатність методу виявляти лише цільовий аналіт без перехресних реакцій з іншими речовинами, що можуть бути присутні в зразку.
Аналітична чутливість	<i>Analytical sensitivity</i>	Мінімальна концентрація аналіту, яку можна достовірно виявити за допомогою тест-

		системи; часто виражається як межа виявлення (LOD).
Антиген	<i>Antigen</i>	Молекула або молекулярна структура, здатна специфічно зв'язуватися з продуктами імунної відповіді (антитілами або рецепторами лімфоцитів) і в певних умовах індукувати імунну відповідь.
Антигенна детермінанта (епітоп)	<i>Antigenic determinant (Epitope)</i>	Частина молекули антигену, що розпізнається і специфічно зв'язується з паратопом антитіла або Т-клітинного рецептора.
Антитіло	<i>Antibody</i>	Імуноглобуліновий білок, що продукується В-лімфоцитами у відповідь на антигенну стимуляцію і здатний специфічно зв'язуватися з відповідним антигеном.
Афінність	<i>Affinity</i>	Міцність зв'язування одного епітопу антигену з одним паратопом антитіла; термодинамічна характеристика, що визначається константою асоціації (K_a) або дисоціації (K_d).
Валідація	<i>Validation</i>	Процес підтвердження відповідності методу встановленим вимогам щодо специфічності, чутливості, відтворюваності, точності та інших характеристик для конкретного призначення.
Верифікація	<i>Verification</i>	Підтвердження того, що раніше валідований метод працює

		належним чином в конкретній лабораторії при конкретних умовах.
Гуморальний імунітет	<i>Humoral immunity</i>	Імунна відповідь, опосередкована антитілами, які циркулюють у крові та тканинних рідинах.
Діагностична специфічність (DSp)	<i>Diagnostic specificity</i>	Частка справді негативних зразків, правильно ідентифікованих тестом; ймовірність негативного результату тесту при відсутності захворювання. $DSp = TN / (TN + FP)$.
Діагностична чутливість (DSe)	<i>Diagnostic sensitivity</i>	Частка справді позитивних зразків, правильно ідентифікованих тестом; ймовірність позитивного результату тесту при наявності захворювання. $DSe = TP / (TP + FN)$.
Епітоп	<i>Epitope</i>	Див. Антигенна детермінанта.
Золотий стандарт	<i>Gold standard</i>	Найкращий доступний референтний метод для визначення справжнього статусу захворювання, який використовується для оцінки діагностичних характеристик нового тесту.
Зона сірої зони (зона невизначеності)	<i>Grey zone (Equivocal zone)</i>	Діапазон значень тесту між позитивним та негативним cut-off, де результат вважається сумнівним і потребує повторного дослідження або додаткового підтвердження.

Ізотип	<i>Isotype</i>	Клас імуноглобулінів, що визначається структурою константних доменів важкого ланцюга (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE).
Імуноблотинг	<i>Immunoblotting</i>	Метод виявлення специфічних білків після їх розділення електрофорезом і перенесення на мембрану з наступним виявленням за допомогою специфічних антитіл.
Імуноглобулін	<i>Immunoglobulin</i>	Клас глікопротеїнів, які функціонують як антитіла; молекула складається з двох важких і двох легких ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками.
Імунодомінантний епітоп	<i>Immunodominant epitope</i>	Антигенна детермінанта, що викликає найбільш сильну імунну відповідь при імунізації або інфікуванні.
Імунологічна пам'ять	<i>Immunological memory</i>	Здатність імунної системи формувати довготривалу специфічну відповідь після первинного контакту з антигеном, що забезпечує швидшу та сильнішу відповідь при повторному контакті.
Імунохроматографія	<i>Immunochromatography</i>	Експрес-метод імунодіагностики, заснований на міграції аналіту через мембрану з іммобілізованими реагентами під дією капілярних сил.
Кінетика антитілоутворення	<i>Antibody kinetics</i>	Часова динаміка продукції антитіл після антигенної стимуляції, включаючи

		первинну та вторинну імунну відповідь.
Клітинний імунітет	<i>Cell-mediated immunity</i>	Імунна відповідь, опосередкована Т-лімфоцитами та іншими ефекторними клітинами імунної системи.
Комплемент	<i>Complement</i>	Система білків сироватки крові, що активуються послідовно і беруть участь у лізисі клітин-мішеней, опсонізації та запаленні.
Кон'югат	<i>Conjugate</i>	Молекула антитіла, хімічно зв'язана з маркерною молекулою (ферментом, флуорохромом, золотими частинками) для візуалізації імунної реакції.
Латеральний потік	<i>Lateral flow</i>	Принцип імунохроматографії, при якому рідина рухається горизонтально через мембрану під дією капілярних сил.
Межа виявлення (LOD)	<i>Limit of detection</i>	Найнижча концентрація аналіту, яку можна виявити з певною ймовірністю (зазвичай 95%), але не обов'язково точно кількісно визначити.
Межа кількісного визначення (LOQ)	<i>Limit of quantification</i>	Найнижча концентрація аналіту, яку можна визначити кількісно з прийнятною точністю та правильністю.
Моноклональні антитіла	<i>Monoclonal antibodies</i>	Антитіла, що продукуються одним клоном В-лімфоцитів і мають ідентичну специфічність до одного епітопу.
Невизначеність вимірювання	<i>Measurement uncertainty</i>	Параметр, що характеризує розсіювання значень, які

		можуть бути обґрунтовано приписані вимірюваній величині.
Нормалізація	<i>Normalization</i>	Процес корекції результатів вимірювань для усунення систематичних відхилень, пов'язаних з варіабельністю між планшетами, серіями або днями аналізу.
Опсонізація	<i>Opsonization</i>	Процес покриття патогенів антитілами або компонентами комплементу для полегшення їх розпізнавання та фагоцитозу.
Паратоп	<i>Paratope</i>	Антигензв'язуючий центр антитіла, що утворюється варіабельними доменами важкого та легкого ланцюгів.
Первинна імунна відповідь	<i>Primary immune response</i>	Імунна відповідь, що розвивається при першому контакті організму з антигеном; характеризується латентним періодом, повільним наростанням титру антитіл класу IgM.
Поліклональні антитіла	<i>Polyclonal antibodies</i>	Суміш антитіл, що продукуються різними клонами В-лімфоцитів і розпізнають різні епітопи одного антигену.
Позитивна прогностична цінність (PPV)	<i>Positive predictive value</i>	Ймовірність того, що тварина з позитивним результатом тесту справді хвора. $PPV = TP / (TP + FP)$.
Негативна прогностична цінність (NPV)	<i>Negative predictive value</i>	Ймовірність того, що тварина з негативним результатом тесту справді здорова. $NPV = TN / (TN + FN)$.

Преципітація	<i>Precipitation</i>	Утворення нерозчинних комплексів антиген-антитіло, видимих як помутніння або осад.
Прогностична цінність	<i>Predictive value</i>	Ймовірність наявності або відсутності захворювання при позитивному або негативному результаті тесту; залежить від преваленції захворювання в популяції.
Робастність	<i>Robustness</i>	Здатність методу давати надійні результати при незначних змінах експериментальних умов (температура, час інкубації, постачальник реагентів).
Сандвіч-ІФА	<i>Sandwich ELISA</i>	Варіант ІФА для виявлення антигену, при якому аналіт зв'язується між двома антитілами - захоплюючим на твердій фазі і детектуючим у розчині.
Серологічне вікно	<i>Serological window</i>	Період між інфікуванням та появою детектованих рівнів специфічних антитіл у крові.
Серологія	<i>Serology</i>	Розділ імунології, що вивчає властивості та взаємодії компонентів сироватки крові, насамперед антитіл.
Серопреваленція	<i>Seroprevalence</i>	Частка тварин у популяції, що мають антитіла до певного патогену, виражена у відсотках.
Сероконверсія	<i>Seroconversion</i>	Поява детектованих рівнів специфічних антитіл у крові після інфікування або вакцинації.

Титр антитіл	<i>Antibody titer</i>	Максимальне розведення сироватки, при якому ще виявляється специфічна імунна реакція; міра концентрації антитіл.
Фагоцитоз	<i>Phagocytosis</i>	Процес поглинання клітинами імунної системи (макрофагами, нейтрофілами) чужорідних частинок, мікроорганізмів або клітинних фрагментів.
Хибнонегативний результат (FN)	<i>False negative</i>	Негативний результат тесту у справді інфікованої або хворої тварини.
Хибнопозитивний результат (FP)	<i>False positive</i>	Позитивний результат тесту у справді неінфікованої або здорової тварини.
Cut-off (порогове значення)	<i>Cut-off</i>	Граничне значення, що розділяє позитивні та негативні результати тесту; визначається на основі валідаційних досліджень.
DIVA-стратегія	<i>DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)</i>	Підхід до діагностики, який дозволяє відрізнити інфікованих тварин від вакцинованих на основі виявлення антитіл до маркерних білків.
ELISA (ІФА)	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	Імуноферментний аналіз - високочутливий метод виявлення та кількісного визначення антигенів або антитіл з використанням ферментної мітки.
ROC-аналіз	<i>Receiver Operating Characteristic analysis</i>	Статистичний метод оцінки діагностичних характеристик тесту шляхом побудови кривої

залежності чутливості від (1-специфічність).

Western blot

Western blot

Метод імуноблотингу для виявлення специфічних білків після електрофоретичного розділення та перенесення на мембрану.

Скорочення та аббревіатури

АЧС	Африканська чума свиней
АС	Аналітична специфічність
АЧ	Аналітична чутливість
ВГ	Важкий ланцюг (імуноглобуліну)
ВРТ	Віруснейтралізаційний тест
ВПГП	Високопатогенний пташиний грип
ДС	Діагностична специфічність
ДЧ	Діагностична чутливість
ІФА	Імуноферментний аналіз
ІХА	Імунохроматографічний аналіз
ЛГ	Легкий ланцюг (імуноглобуліну)
ЛПР	Ланцюгова полімеразна реакція
МВВ	Межа виявлення
МКВ	Межа кількісного визначення
НВ	Невизначеність вимірювання
ОД	Оптична щільність
РА	Реакція аглютинації
РЗК	Реакція зв'язування комплементу
РІД	Реакція імунодифузії
РІФ	Реакція імунофлуоресценції
РП	Реакція преципітації
РТГА	Реакція гальмування гемаглютинації

СМК	Система менеджменту якості
СОП	Стандартна операційна процедура
ТМБ	Тетраметилбензидин
ХН	Хибнонегативний результат
ХП	Хибнопозитивний результат
AUC	Area Under Curve - площа під ROC-кривою
BSL	Biosafety Level - рівень біологічної безпеки
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cELISA	Competitive ELISA - конкурентний ІФА
CI	Confidence Interval - довірчий інтервал
CV	Coefficient of Variation - коефіцієнт варіації
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DSe	Diagnostic Sensitivity - діагностична чутливість
DSp	Diagnostic Specificity - діагностична специфічність
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - імуноферментний аналіз
FAO	Food and Agriculture Organization
FN	False Negative - хибнонегативний результат
FP	False Positive - хибнопозитивний результат
GLP	Good Laboratory Practice
HRP	Horseradish Peroxidase - пероксидаза хрону
iELISA	Indirect ELISA - непрямий ІФА
IFA	Immunofluorescence Assay - імунофлуоресцентний аналіз
Ig	Immunoglobulin - імуноглобулін
IgA	Immunoglobulin A
IgD	Immunoglobulin D
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
ISO	International Organization for Standardization

LOD	Limit of Detection - межа виявлення
LOQ	Limit of Quantification - межа кількісного визначення
mAb	Monoclonal Antibody - моноклональне антитіло
NPV	Negative Predictive Value - негативна прогностична цінність
OD	Optical Density - оптична щільність
OIE	World Organisation for Animal Health (колишня назва)
pAb	Polyclonal Antibody - поліклональне антитіло
PBS	Phosphate Buffered Saline - фосфатно-сольовий буфер
PCR	Polymerase Chain Reaction - полімеразна ланцюгова реакція
PPV	Positive Predictive Value - позитивна прогностична цінність
QC	Quality Control - контроль якості
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SD	Standard Deviation - стандартне відхилення
СОП	Standard Operating Procedure
TN	True Negative - справді негативний результат
TP	True Positive - справді позитивний результат
WHO	World Health Organization
WOAH	World Organisation for Animal Health

Додаток Б. Стандартні операційні процедури

Цей додаток містить стандартні операційні процедури (СОП), розроблені відповідно до вимог ISO/IEC 17025:2017, ДСТУ ISO/IEC 17025:2019 та рекомендацій WOAH (World Organisation for Animal Health). Кожна СОП є обов'язковою для виконання всім персоналом лабораторії.

ПЕРЕЛІК СТАНДАРТНИХ ОПЕРАЦІЙНИХ ПРОЦЕДУР (приклад)

№ СОП	Назва процедури	Версія	Дата набуття чинності
СОП-IML-001	Виконання імуноферментного аналізу (ІФА/ELISA)	02	2025
СОП-IML-002	Вхідний контроль реагентів та витратних матеріалів	01	2025
СОП-IML-003	Внутрішньолабораторний контроль якості	01	2025
СОП-IML-004	Контроль забруднень робочих поверхонь	01	2025

Приклад 1:

СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА			
Виконання імуноферментного аналізу (ІФА)			
№ СОП:	СОП-IML-001	Версія:	02
Галузь застосування:	Імунологічна діагностика інфекційних захворювань тварин		
Замінює версію:	01 від 2024	Дата набуття чинності:	01.01.2025
ЗАТВЕРДЖЕНО: Завідувач лабораторії: _____ / _____ (підпис) (ПІБ) Дата: _____			

1. МЕТА ТА СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

1.1 Мета: встановити єдиний порядок виконання імуноферментного аналізу для виявлення та кількісного визначення антитіл або антигенів у біологічних зразках тварин.

1.2 Сфера застосування: всі типи ІФА (прямий, непрямий, сандвіч, конкурентний), що виконуються в лабораторії для серологічної діагностики інфекційних захворювань.

1.3 Процедура обов'язкова для виконання всім персоналом, що проводить ІФА досліджень.

2. НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

- 2.1. ДСТУ ISO/IEC 17025:2019 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій
- 2.2. WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2024
- 2.3. Інструкції виробників тест-систем

3. ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ

ІФА/ELISA - імуноферментний аналіз; метод виявлення антигенів або антитіл з використанням ферментної мітки.

ОЩ - оптична щільність; показник поглинання світла розчином при певній довжині хвилі.

Cut-off - порогове значення, що розділяє позитивні та негативні результати.

Контрольні зразки - зразки з відомим статусом (позитивні/негативні), що використовуються для валідації тесту.

4. ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ

4.1. Завідувач лабораторії:

- Затвердження СОП та контроль за її виконанням
- Забезпечення персоналу необхідними реагентами та обладнанням
- Організація навчання персоналу

4.2. Виконавці (лаборанти, біологи):

- Дотримання всіх етапів процедури
- Ведення лабораторної документації
- Контроль якості на кожному етапі

4.3. Відповідальний за якість:

- Моніторинг дотримання СОП
- Аналіз результатів контролю якості
- Документування відхилень

5. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

5.1. Реагенти:

- Мікропланшети, вкриті антигеном або антитілами (96-лункові)
- Промивний розчин (PBS-Tween 20, 0.05%)
- Розчин для розведення зразків
- Кон'югат (антитіла, мічені ферментом)
- Субстрат-хромогенна суміш (ТМБ)
- Стоп-розчин (1-2М H₂SO₄)
- Позитивний контроль
- Негативний контроль

5.2. Обладнання:

- Фотометр для мікропланшетів (450 нм)
- Автоматичний промивач планшетів
- Багатоканальні піпетки (50-300 мкл)
- Інкубатор (37±1°C)
- Шейкер для планшетів

- Холодильник (2-8°C)
- Морозильна камера (-20°C)

6. ОПИС ПРОЦЕДУРИ

6.1. Підготовка до роботи

5. Перевірити наявність та придатність всіх реагентів (термін придатності, зовнішній вигляд, умови зберігання).
6. Витримати реагенти при кімнатній температурі (20-25°C) 30 хвилин.
7. Підготувати робочі розчини згідно з інструкцією виробника.
8. Перевірити роботу обладнання (фотометр, інкубатор, промивач).
9. Скласти схему розміщення зразків на планшеті.
10. Заповнити протокол дослідження (дата, номери зразків, серія реагентів).

6.2. Підготовка зразків

11. Розморозити заморожені зразки при кімнатній температурі.
12. Перемішати зразки перевертанням пробірки 5-10 разів.
13. При необхідності центрифугувати (3000 об/хв, 10 хв).
14. Відбракувати зразки з ознаками гемолізу, ліпемії або забруднення.
15. Підготувати розведення зразків згідно з протоколом (зазвичай 1:100-1:400).

6.3. Виконання аналізу

6.3.1. Внесення зразків

16. Внести по 100 мкл розведених зразків у відповідні лунки планшета.
17. Внести позитивний та негативний контролю (мінімум у дублікаті).
18. Залишити 2-4 лунки для бланка (тільки розчин для розведення).
19. Накрити планшет клейкою плівкою.
20. Інкубувати при $37\pm 1^\circ\text{C}$ згідно з протоколом (зазвичай 30-60 хв).

6.3.2. Промивання

21. Видалити вміст лунок струшуванням.
22. Промити лунки 3-5 разів промивним розчином (300 мкл/лунка).
23. Видалити залишки рідини перевертанням планшета на адсорбуючий папір.
24. Примітка: повне видалення рідини критично для якості результатів.

6.3.3. Додавання кон'югату

25. Внести по 100 мкл робочого розведення кон'югату.
26. Накрити планшет та інкубувати при $37\pm 1^\circ\text{C}$ (зазвичай 30 хв).
27. Повторити процедуру промивання.

6.3.4. Виявлення сигналу

28. Внести по 100 мкл субстрат-хромогенної суміші.
29. Інкубувати при кімнатній температурі в темряві (10-30 хв).
30. Спостерігати за розвитком синього забарвлення.
31. Внести по 50-100 мкл стоп-розчину (забарвлення змінюється на жовте).
32. Виміряти ОЩ при 450 нм протягом 30 хвилин.

7. КРИТЕРІЇ ВАЛІДНОСТІ ТЕСТУ

Критерій	Вимога	Дія при невідповідності
ОЩ позитивного контролю	> 0.350	Повторити тест
ОЩ негативного контролю	< 0.150	Повторити тест
Співвідношення РС/НС	> 3.0	Повторити тест
CV між дублікатами	< 10%	Повторити зразок

Примітка: Якщо хоча б один з критеріїв не виконується - тест вважається невалідним і повинен бути повторений.

8. РОЗРАХУНКИ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

- 8.1. Розрахувати середнє значення ОЩ для дублікатів.
- 8.2. Відняти значення бланка від усіх результатів.
- 8.3. Розрахувати відсоток позитивності (S/P%):
$$S/P\% = [(OЩ \text{ зразка} - OЩ \text{ НС}) / (OЩ \text{ РС} - OЩ \text{ НС})] \times 100$$
де НС - негативний контроль, РС - позитивний контроль
- 8.4. Інтерпретувати результати згідно з cut-off виробника.

9. ДОКУМЕНТУВАННЯ

9.1. Реєструвати в протоколі ІФА (Форма 1, Додаток В):

- Дату та час проведення
- Номери та серії реагентів
- Схему розміщення зразків
- Результати контролів
- Відхилення від процедури (якщо були)
- Підпис виконавця та перевіряючого

10. БЕЗПЕКА

- 10.1. Працювати в засобах індивідуального захисту.
- 10.2. Вважати всі біологічні зразки потенційно інфекційними.
- 10.3. Субстрат ТМБ - подразнювач шкіри та очей.
- 10.4. Стоп-розчин (H₂SO₄) - корозійна речовина.
- 10.5. Утилізувати відходи як біонебезпечні.

11. ПЕРЕГЛЯД ТА ЗАТВЕРДЖЕННЯ

Перегляд СОП проводиться щорічно або при зміні методики, обладнання, вимог нормативних документів.

ПОГОДЖЕННЯ ТА ЗАТВЕРДЖЕННЯ	
Розроблено: Посада: _____ ПІБ: _____ Підпис: _____ Дата: ____	Перевірено: Посада: _____ ПІБ: _____ Підпис: _____ Дата: ____
Затверджено: Завідувач лабораторії: _____ Підпис: _____ Печатка Дата: _____	

Приклад 2:

СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА			
Вхідний контроль реагентів та витратних матеріалів для імунологічних методів			
№ SOP:	SOP-IML-002	Версія:	02
Галузь застосування:	Імунологічна діагностика у ветеринарії		
Замінює версію:	01 від 2024	Дата набуття чинності:	01.01.2025
ЗАТВЕРДЖЕНО: Завідувач лабораторії Посада: _____ ПІБ: _____ Підпис: _____ Печатка Дата: _____			

ЗМІСТ

1. Цілі та сфера застосування
2. Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів
3. Завдання, відповідальність та підзвітність
4. Обладнання та матеріали
5. Опис виконання процедури
6. Безпека та захист довкілля
7. Документування та реєстрація
8. Додатки

1. ЦІЛІ ТА СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

1.1. Мета процедури

Ця СОП з вхідного контролю нових серій витратних матеріалів та реагентів для імунологічних методів розроблена для підтвердження їхньої якості та функціональності перед використанням у діагностичних дослідженнях.

1.2. Цілі вхідного контролю

Вхідний контроль нових серій реагентів та витратних матеріалів має на меті:

1. Підтвердити відповідність специфікаціям виробника
2. Виключити контамінацію реагентів на виробництві
3. Перевірити якість та стабільність реагентів
4. Оцінити міжсерійну відтворюваність
5. Забезпечити надійність результатів діагностичних досліджень

1.3. Сфера застосування

Процедура застосовується для:

- Нових серій тест-систем ІФА (ELISA)
- Імунохроматографічних тестів
- Реагентів для імунофлуоресценції
- Реагентів для РА, РЗК
- Мікропланшетів та витратних матеріалів
- Буферних розчинів та кон'югатів

2. ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

Скорочення Розшифрування

ІФА	Імуноферментний аналіз
РІФ	Реакція імунофлуоресценції
ІХА	Імунохроматографічний аналіз
СОП	Стандартна операційна процедура
КЛ	Керівник лабораторії / Завідувач лабораторії
ОД	Оптична щільність
CV	Коефіцієнт варіації

3. ЗАВДАННЯ, ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ТА ПІДЗВІТНІСТЬ

3.1. Завідувач лабораторії:

- Затвердження плану вхідного контролю
- Прийняття рішення про допуск реагентів до використання
- Контроль дотримання процедури
- Підпис акту вхідного контролю

3.2. Відповідальний за якість:

- Планування вхідного контролю
- Організація проведення контролю
- Аналіз результатів
- Оформлення документації
- Ведення реєстру вхідного контролю

3.3. Виконавці (лікарі):

- Проведення вхідного контролю згідно з процедурою
- Реєстрація результатів
- Маркування реагентів
- Інформування про виявлені невідповідності

4. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ

4.1. Обладнання:

- Фотометр для мікропланшетів (калібрований)
- Термостат/інкубатор ($37 \pm 1^\circ\text{C}$)
- Холодильник ($2-8^\circ\text{C}$)
- Морозильна камера (-20°C)
- Центрифуга
- Автоматичні піпетки (калібровані)
- Ваги аналітичні
- рН-метр

4.2. Матеріали для контролю:

- Позитивні контрольні зразки (сертифіковані)

- Негативні контрольні зразки
- Референсні стандарти
- Попередня серія реагентів (для порівняння)

4.3. Документація:

- Форма F-IML-002-01 «Протокол вхідного контролю реагентів»
- Форма F-IML-002-02 «Акт вхідного контролю»
- Реєстр вхідного контролю
- Сертифікати якості від виробника
- Інструкції виробника

5. ОПИС ВИКОНАННЯ ПРОЦЕДУРИ

5.1. Прийом та первинна перевірка реагентів

5.1.1. При надходженні нової серії реагентів перевірити:

- Цілісність упаковки
- Наявність сертифікату якості виробника
- Відповідність назви та номеру серії
- Термін придатності (мінімум 6 місяців до закінчення)
- Умови транспортування та зберігання
- Наявність всіх компонентів набору

5.1.2. Зареєструвати надходження в журналі обліку реагентів.

5.1.3. Присвоїти унікальний внутрішньолабораторний номер.

5.1.4. Зберігати реагенти в зоні карантину до завершення вхідного контролю.

5.2. Планування вхідного контролю

5.2.1. Відповідальний за якість складає план вхідного контролю, який включає:

- Дату проведення контролю
- Перелік тестів для виконання
- Кількість повторів (мінімум 3)
- Контрольні зразки для використання
- Критерії прийнятності
- Виконавців

5.3. Виконання вхідного контролю тест-систем ІФА

5.3.1. Відібрати для контролю:

- Один повний набір з нової серії
- Набір з попередньої серії (для порівняння)
- 3 позитивні контрольні зразки
- 3 негативні контрольні зразки

5.3.2. Виконати ІФА згідно з SOP-IML-001, тестуючи:

- Позитивні контролю у 3-х повторах новою серією
- Негативні контролю у 3-х повторах новою серією
- Позитивні контролю у 3-х повторах попередньою серією
- Негативні контролю у 3-х повторах попередньою серією

5.3.3. Оцінити під час контролю:

- Відсутність контамінації (негативні контролю повинні бути негативними)
- Чутливість (позитивні контролю повинні давати очікувані значення ОД)

- Міжсерійну відтворюваність (різниця з попередньою серією < 15%)
- Відповідність критеріям валідності тесту

5.4. Критерії прийнятності

Параметр	Критерій прийнятності
Негативні контролю	Всі 3 повтори негативні
Позитивні контролю	Всі 3 повтори позитивні, ОЩ у межах норми
CV повторів	< 10% для кожного контролю
Міжсерійна різниця	< 15% від попередньої серії
Співвідношення РС/НС	> 3.0
Зовнішній вигляд	Без осаду, помутніння, зміни кольору

5.5. Прийняття рішення

5.5.1. Серія ПРИЙМАЄТЬСЯ для використання, якщо:

- Всі критерії прийнятності виконані
- Результати порівнянні з попередньою серією
- Відсутні ознаки контамінації або дефектів

5.5.2. Серія ВІДХИЛЯЄТЬСЯ, якщо:

- Хоча б один критерій не виконаний
- Виявлено контамінацію
- Значні відхилення від попередньої серії

5.5.3. При відхиленні серії:

- Повторити контроль з іншого набору серії
- При повторному відхиленні - повернути партію постачальнику
- Зареєструвати невідповідність
- Повідомити виробника

5.6. Маркування та зберігання

5.6.1. Після прийняття серії нанести на упаковку:

- Дату вхідного контролю
- Унікальний лабораторний номер
- Штамп «Пройшов вхідний контроль»
- Дату початку використання

5.6.2. Перемістити реагенти з зони карантину до зони зберігання.

5.6.3. Зареєструвати в реєстрі вхідного контролю.

6. БЕЗПЕКА ТА ЗАХИСТ ДОВКІЛЛЯ

6.1. При виконанні процедури дотримуватися:

- SOP з використання ЗІЗ
- SOP з миття рук
- Інструкцій з охорони праці

6.2. Вважати всі біологічні зразки потенційно інфекційними.

6.3. Поводження з відходами:

- Біологічні відходи - як біонебезпечні (категорія Б)
- Хімічні реагенти - згідно з паспортами безпеки

- Пластик та папір - звичайні відходи (категорія А)
- 6.4. Забезпечити вентиляцію приміщення.
- 6.5. Мати доступ до інструкцій з надання першої допомоги.

7. ДОКУМЕНТУВАННЯ ТА РЕЄСТРАЦІЯ

7.1. Заповнити Протокол вхідного контролю (F-IML-002-01):

- Дата контролю
- Назва та виробник реагентів
- Номер серії та термін придатності
- Результати всіх вимірювань
- Виконані розрахунки
- Висновок про відповідність
- Підписи виконавця та перевіряючого

7.2. Оформити Акт вхідного контролю (F-IML-002-02).

7.3. Внести запис у Реєстр вхідного контролю.

7.4. Зберігати документацію мінімум 5 років.

8. ДОДАТКИ

Додаток 1: Форма F-IML-002-01 «Протокол вхідного контролю реагентів»

Додаток 2: Форма F-IML-002-02 «Акт вхідного контролю»

Додаток 3: Блок-схема процедури вхідного контролю

ПОГОДЖЕННЯ ТА ЗАТВЕРДЖЕННЯ ДОКУМЕНТУ		
<p>Розроблено:</p> <p>Посада: _____</p> <p>ПІБ: _____</p> <p>_____</p> <p>Підпис: _____ Дата: _____</p> <p>_____</p>	<p>Перевірено:</p> <p>Відповідальний за якість</p> <p>ПІБ: _____</p> <p>_____</p> <p>Підпис: _____ Дата: _____</p> <p>_____</p>	<p>Затверджено:</p> <p>Завідувач лабораторії</p> <p>ПІБ: _____</p> <p>_____</p> <p>Підпис: _____ Печатка</p> <p>Дата: _</p>

Додаток Е. Нормативно-правова база (національні та міжнародні стандарти)

Міжнародні стандарти та керівництва

Стандарти ВОАН (Всесвітня організація охорони здоров'я тварин)

1. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2024 Edition**

Доступно: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

2. **WOAH Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases, 2024**

Доступно: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/quality-veterinary-products/>

3. **Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases (Chapter 1.1.6).** Керівництво з валідації діагностичних методів для інфекційних хвороб

Стандарти ISO та IEC

4. **ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій

5. **ISO 15189:2022 - Medical laboratories – Requirements for quality and competence.** Медичні лабораторії - Вимоги до якості та компетентності

6. **ISO 10012:2003 - Measurement management systems – Requirements for measurement processes and measuring equipment.** Системи управління вимірюванням - Вимоги до процесів вимірювання та вимірювального обладнання

7. **ISO 5725 series - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.** Точність (правильність та прецизійність) методів та результатів вимірювання

8. **ISO/IEC Guide 98-3:2008 (GUM) - Uncertainty of measurement.** Невизначеність вимірювання - Частина 3: Настанова щодо вираження невизначеності вимірювання

Керівництва ЄС

9. **Regulation (EU) 2016/429 - Animal Health Law.** Регламент ЄС щодо охорони здоров'я тварин
10. **Commission Delegated Regulation (EU) 2020/688 - Supplementing Regulation (EU) 2016/429.** Делегований регламент щодо зоосанітарних вимог до переміщення тварин

Національні стандарти України (ДСТУ)

11. **ДСТУ ISO/IEC 17025:2019 - Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.** (переклад ідентичний ISO/IEC 17025:2017)
12. **ДСТУ ISO/IEC 17043:2017 - Оцінювання відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації** (для організації міжлабораторних порівняльних випробувань)
13. **ДСТУ ISO 10012:2005 - Системи керування вимірюванням. Вимоги до процесів вимірювання та вимірювального обладнання**
14. **ДСТУ EN ISO 15189:2015 - Медичні лабораторії. Вимоги до якості та компетентності**
15. **ДСТУ ISO 5725-1:2005 - Точність (правильність і прецизійність) методів та результатів вимірювання**

Законодавство України

16. **Закон України «Про ветеринарну медицину» від 04.02.2021 № 1206-IX**
17. **Закон України «Про безпечність та гігієну кормів» від 21.12.2017 № 2264-VIII**
18. **Закон України «Про основні засади державного нагляду (контролю) у сфері господарської діяльності» від 05.04.2007 № 877-V**
19. **Постанова Кабінету Міністрів України «Про затвердження Положення про Державну службу України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів» від 02.09.2015 № 667**

Корисні посилання

Організація	Веб-сайт	Ресурси
WOAH (OIE)	www.woah.org	Міжнародні стандарти діагностики, референтні лабораторії
ISO	www.iso.org	Міжнародні стандарти якості, ISO 17025, ISO 15189
ILAC	ilac.org	Міжнародна кооперація з акредитації лабораторій
Eurachem	www.eurachem.org	Керівництва з валідації та невизначеності вимірювань
NAAU (Національне агентство з акредитації України)	naau.org.ua	Акредитація лабораторій в Україні
ДП «УкрНДНЦ»	uas.org.ua	Національний орган стандартизації України
Держпродспо- живслужба	dpss.gov.ua	Ветеринарний контроль, затвердження методик

Список використаних джерел

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). Cellular and molecular immunology (10th ed.). Elsevier.
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (1994). Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*, 308(6943), 1552. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1552>
- Anderson, R. M., & May, R. M. (1991). Infectious diseases of humans: Dynamics and control. Oxford University Press.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clinical Biochemist Reviews*, 29(Suppl 1), S49-S52.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Beer, M., Reimann, I., Hoffmann, B., & Depner, K. (2007). Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine*, 25(30), 5665-5670. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.036>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, 57(1), 289-300.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 327(8476), 307-310.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & Van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495-503.
- Bossuyt, P. M., Reitsma, J. B., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Glasziou, P. P., Irwig, L., Lijmer, J. G., Moher, D., Rennie, D., de Vet, H. C. W., Kressel, H. Y., Rifai, N., Golub, R. M., Altman, D. G., Hooft, L., Korevaar, D. A., Cohen, J. F., & STARD Group. (2015). STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*, 351, Article h5527. <https://doi.org/10.1136/bmj.h5527>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Capua, I., & Alexander, D. J. (2004). Avian influenza: Recent developments. *Avian Pathology*, 33(4), 393-404. <https://doi.org/10.1080/03079450410001724085>
- Cleaveland, S., Laurenson, M. K., & Taylor, L. H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 356(1411), 991-999.
- Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20(1), 37-46.
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200-202.
- Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: An overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 213-221.
- Crowther, J. R. (2009). *The ELISA guidebook* (2nd ed.). Humana Press.
- Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2004). Diagnostic tests 4: Likelihood ratios. *BMJ*, 329(7458), 168-169.
- Dixon, L. K., Sun, H., & Roberts, H. (2019). African swine fever. *Antiviral Research*, 165, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>
- Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn, H. (2009). *Veterinary epidemiologic research* (2nd ed.). VER Inc.
- Donaldson, A. I., & Alexandersen, S. (2002). Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus. *Revue Scientifique et Technique*, 21(3), 569-575.
- Edwards, S. (2000). Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 73(2-3), 175-181.
- Efron, B., & Tibshirani, R. J. (1993). *An introduction to the bootstrap*. Chapman & Hall/CRC.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.

- European Commission. (2020). Commission Delegated Regulation (EU) 2020/688 supplementing Regulation (EU) 2016/429. Official Journal of the European Union, L174, 140-232.
- Ferguson, N. M., Donnelly, C. A., & Anderson, R. M. (2001). The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: Pattern of spread and impact of interventions. *Science*, 292(5519), 1155-1160.
- Fleiss, J. L. (1971). Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin*, 76(5), 378-382.
- Fosgate, G. T., Adesiyun, A. A., & Hird, D. W. (2002). Screening tests for bovine brucellosis in Trinidad: Comparative sensitivities and specificities. *Preventive Veterinary Medicine*, 56(4), 267-276.
- Gardner, I. A., Stryhn, H., Lind, P., & Collins, M. T. (2000). Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1-2), 107-122.
- Godfroid, J., & Käsböhrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 135-145.
- Greiner, M., & Gardner, I. A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1-2), 3-22.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2009). *The elements of statistical learning: Data mining, inference, and prediction* (2nd ed.). Springer.
- Hosmer, D. W., Lemeshow, S., & Sturdivant, R. X. (2013). *Applied logistic regression* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- International Organization for Standardization. (2012). *Medical laboratories—Requirements for quality and competence (ISO 15189:2012)*. ISO.
- International Organization for Standardization. (2017). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2017)*. ISO.
- Jacobson, R. H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue Scientifique et Technique*, 17(2), 469-526.

- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E. H., Machalaba, C. C., Thomas, M. J., & Heymann, D. L. (2012). Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936-1945.
- Kermack, W. O., & McKendrick, A. G. (1927). A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 115(772), 700-721.
- Kitching, R. P., Hutber, A. M., & Thrusfield, M. V. (2005). A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease. *The Veterinary Journal*, 169(2), 197-209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- Last, J. M. (Ed.). (2001). *A dictionary of epidemiology* (4th ed.). Oxford University Press.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology* (2nd ed.). Mosby Elsevier.
- Miller, W. G., Jones, G. R., Horowitz, G. L., & Weykamp, C. (2011). Proficiency testing/external quality assessment: Current challenges and future directions. *Clinical Chemistry*, 57(12), 1670-1680.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology* (9th ed.). Garland Science.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2021). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. OIE.
- Pollock, J. M., & Neill, S. D. (2002). Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, 163(2), 115-127.

- Porta, M. (Ed.). (2014). *A dictionary of epidemiology* (6th ed.). Oxford University Press.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Saunders Elsevier.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L., & Martínez-López, B. (2012). African swine fever: An epidemiological update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(Suppl. 1), 27-35.
- Thrusfield, M., & Christley, R. (2018). *Veterinary epidemiology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.
- Tizard, I. R. (2017). *Veterinary immunology* (10th ed.). Elsevier.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Westgard, J. O., & Westgard, S. A. (2014). *The quality of laboratory testing today*. Westgard QC.
- Wild, D. (2013). *The immunoassay handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques* (4th ed.). Elsevier.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). (2023). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. WOAH.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). (2023). *Terrestrial Animal Health Code* (32nd ed.). WOAH.
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Journal of Clinical Investigation*, 39(7), 1157-1175.