



VetAgro Sup
Campus Vétérinaire de Lyon



ELISA in veterinary immuno diagnostics

Імуноферментний аналіз ELISA у ветеринарній імунодіагностиці

Методичні вказівки зі спеціальності ветеринарна імунологія
для студентів факультету ветеринарної медицини.

Напрямок підготовки 8.11.101 – ветеринарна медицина, освітній рівень – магістр.

УДК 619:57.083.3

Затверджено Радою ФВМ (протокол № 3 від 12.10.2017)

ELISA in veterinary immuno
diagnostics

September 2017

Document élaboré dans le cadre de
la convention de Jumelage
entre les facultés vétérinaires de Bila
Tserkva et VetAgro-Sup

Contributors :

Michel PEPIN
Claire Milard
Rublenko I.O.
Andriichuk A.V.
Kostecka Y.P.
Zotsenko V.M.
Taranukha S.I.
Ostrovsky D.M.Імуноферментний аналіз ELISA у
ветеринарній імунодіагностиці
Вересень 2017Документ підготовлений в рамках
твінінг-угоди між факультетом
ветеринарної медицини
Білоцерківського НАУ та VetAgro-
Sup

Укладачі:

Мішель Піпен
Клер Мілард
Рубленко І.О.
Андрійчук А.В.
Костецька Ю. П.
Зоценко В.М.
Тарануха С.І.
Островський Д.М.

Методичні рекомендації «Імуноферментний аналіз ELISA у ветеринарній імунодіагностиці» розроблені для студентів ветеринарного факультету та слухачів факультету підвищення кваліфікації. Дані рекомендації містять інформацію про суть методу ELISA, коротку історію його розробки. Описані методи, підходи та обладнання, що потрібне для проведення дослідження. Охарактеризовані фактори, які спричиняють отримання хибних результатів та вказані шляхи їх усунення, що є корисним для практикуючих фахівців.

A teaching guide on the ELISA in veterinary immune diagnostics was developed for students of the veterinary faculty and students of the faculty of advanced training. These recommendations contain information about essence of the ELISA method, a short history of its development. The methods and approaches, equipment that is needed for the research was described. Factors that lead to the receipt of false results and the ways to eliminate them have been characterized, which is useful to practitioners.

Content	Зміст	P. Ст.
ELISA, the principle of the method	Імуноферментний аналіз (ELISA). Принцип методу	4
Equipment for ELISA	Обладнання для ELISA	5
ELISA for detection of antibodies	ELISA для виявлення антитіл	7
ELISA for detection of antigens	ELISA для виявлення антигенів	8
Characteristics of methods and approaches in ELISA	Характеристика методів та підходів у ELISA	9
The factors, that lead to the receipt of false results and their elimination	Фактори, що спричиняють отримання хибних результатів та їх усунення	13

Імуноферментний аналіз. Принцип методу.

Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA) (англ. enzyme-linked immuno sorbent assay) – ферментний імуносорбентний аналіз, імунологічний метод для визначення наявності певних антигенів, шляхом реакції антиген-антитіло, що широко використовується в науково-дослідній роботі та клінічній лабораторній діагностиці.

Першим застосуванням імуноферментних методик вважають появу повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі і до імуноглобулінів. Розроблялись методи кількісного імунохімічного аналізу, заснованого на використанні антигенів (Аг) та антитіл (Ат), мічених ферментами. На початку 1970-х років вперше був застосований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що призвело до розробки імуноферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, з допомогою якого ідентифікується утворений комплекс.

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

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

Існує цілий ряд підходів, що дозволяють визначити, чи відбулося зв'язування антитіла з антигеном-мішенню.

Суть реакції можна відобразити у вигляді наступної схеми (Рис. 1):

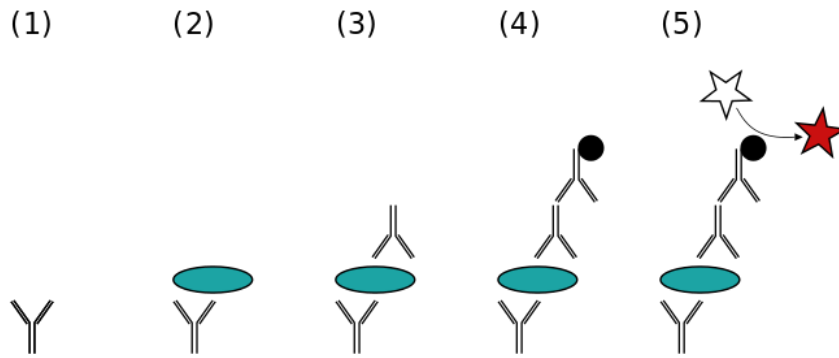


Рис. 1 Схема проведення аналізу

1. Підготовка підкладки для фіксації досліджуваного зразка;
2. Зразок, у якому хочуть виявити специфічну молекулу або мікроорганізм, фіксують на твердій підкладці, наприклад на пластиковій мікротитрувальній плашці, що зазвичай має 96 лунок;
3. У лунки з фіксованим зразком додають антитіла, специфічні до маркерної молекули (первинне антитіло), потім промивають лунку, щоб видалити молекули первинних антитіл, які не зв'язалися;
4. Вносять вторинні антитіла, що специфічно зв'язуються з первинними. До цього антитіла приєднаний фермент (наприклад, лужна фосфатаза, пероксидаза або уреаза), що може каталізувати перетворення незабарвленого субстрату в забарвлений. Лунку промивають для видалення молекул, які не зв'язалися;
5. Додають незабарвлений субстрат, що ідентифікується та взаємодіє з ферментом із зміною кольору;
6. Проводять якісне або кількісне визначення пофарбованого продукту, за допомогою оцінки оптичної щільності.

Обладнання для ELISA.

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

1. Мікроплашковий дозатор-промивач (вошер) (Рис. 2)

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



Рис. 2. Вошер для ELISA



Рис. 3. Інкубатор-шейкер для ELISA

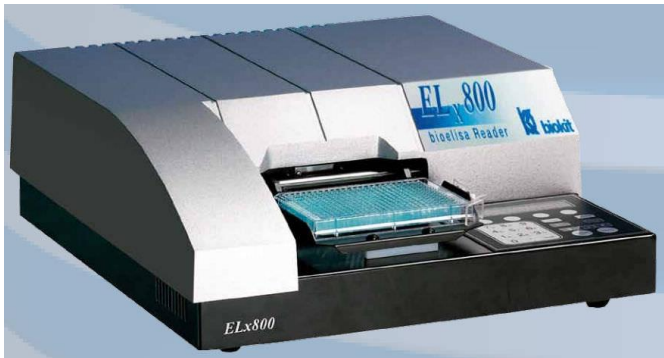


Рис. 4. Рідер для ELISA



Рис. 5 Мікроцентрифуга-струшувач

На ринку представлені різні виробники обладнання для ІФА це такі країни як США (Awareness Technology, Inc, HTI.), Італія (ATOM, Maroche) дуже широко розповсюджене обладнання вироблене в Китаї (LabAnalyt, Rayto) та ін.

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

ELISA для виявлення антитіл

Виявлення специфічних антитіл у фізіологічних рідинах відіграє важливу роль у клінічній діагностиці різноманітних захворювань. Завдяки опрацюванню ІФА з'явилася можливість кількісно визначати антитіла у широкому діапазоні концентрацій із використанням лише одного розведення сироватки, плазми або молока. ІФА дозволяє також легко розрізняти антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів. Об'єктивність кількісних оцінок забезпечується інструментальною фотометрією; при цьому інтенсивність реєстрованих сигналів безпосередньо корелює з рівнем визначених антитіл. При правильному доборі відповідного антигену, що зв'язується з носієм, та оптимального кон'югату з ферментною міткою можна створити системи тестування дуже багатьох різноманітних антитіл.

У прямому варіанті твердофазного ІФА (ТІФА) для виявлення антитіл на тверду фазу (частіше планшети) сорбують досліджуваний матеріал,

що містить антиген (сироватку крові, концентровану сечу, молоко або іншу біологічну рідину, культуру клітин або лізат клітин тощо). Після сорбції і промивання, щоб видалити компоненти, які не зв'язалися з планшетом, у лунки додають специфічні антитіла, мічені ферментом. Після утворення комплексу АГ-АТ його виявляють за допомогою ферментативної реакції з проявником.

Конкурентний метод використовують у двох варіантах. У одному з них антитіла до шуканого антигену іммобілізуються на твердій фазі. Досліджуваний антиген вносять у лунки в присутності антигену, міченого ферментом. Що більше антигену міститься в досліджуваному зразку, то менше ферменту (кон'югованого з антигеном) зв'яжеться з твердою фазою, і інтенсивність забарвлення візуально буде знижена.

ELISA для виявлення антигенів

Можливі різні варіанти ТІФА для виявлення антигенів. За однією класифікацією, ТІФА включає як прямі, так і непрямі методи виявлення антигенів – в залежності від того, яким чином відбувається детекція аналізованого об'єкту. За іншою класифікацією, існує два основні види ТІФА – неконкурентний (якщо в системі присутня лише аналізована сполука та відповідні їй центри зв'язування) та конкурентний метод (якщо в системі присутня аналізована сполука та її аналог, який конкурує за обмежену кількість наявних місць специфічного зв'язування).

Визначення антигенів при застосуванні конкурентного ТІФА найчастіше проводять таким чином. Антитіла проти певного антигену іммобілізуються на твердій фазі. Досліджуваний матеріал, де може бути присутній досліджуваний антиген (наприклад, сироватку, сечу чи іншу біологічну рідину тощо), вносять у лунки в присутності тотожного очищеного антигену, міченого ферментом. Що більше антигену міститься в досліджуваному зразку, то менше ферменту (кон'югованого з антигеном) зв'яжеться з твердою фазою та нижчою виявиться інтенсивність забарвлення.

Найбільш розповсюджений, чутливий та специфічний варіант ТІФА для виявлення антигенів є сендвіч-метод, у якому на тверду фазу сорбують антитіла проти досліджуваного антигену. Останнім часом частіше використовують моноклональні антитіла, що дає можливість підвищити специфічність методу. Потім у лунки планшету вносять досліджуваний матеріал і кон'югат (моно- або поліклональні антитіла, мічені ферментом). Значення оптичної густини (ОГ) зразку прямо пропорційне концентрації антигену.

Характеристика методів та підходів у ELISA

Методи ІФА розділяються на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. В світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*, що означає дослівно “ферментзв’язаний імуносорбентний аналіз”). В цьому методі використовується принцип іммобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носії. Гомогенні методи аналізу (“EMI”, *enzyme multiplex immunotechnic*) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. Суть цих методів полягає в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність. Додавання в цю систему вільного гаптену призводить до пропорційного збільшення активності ферменту в результаті витіснення антитіла з комплексу. Як ферменти в таких системах використовують лізоцим, малатдегідрогеназу та ін. Це високочутливий тест, який дозволяє виявляти білки, що містяться в кількості декількох нанограм в 1 мл.

Широко ввійшов в практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістирола. Аналіз проводиться в декілька основних етапів, що були згадані вище.

Тому, процес ІФА можна умовно розділити на три основні стадії: формування комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) і її візуалізація тим чи іншим фізичним способом.

Перед постановкою ІФА проводиться: вирощування біологічно чистого матеріалу з моноінфекцією, отримання очищених вірусних препаратів, приготування антисироваток з високим титром специфічних антитіл або отримання моноклональних антитіл, виділення IgG і кон'югування з ферментами.

Кількість адсорбованої речовини на полістиролі залежить від багатьох факторів (температури, рН, іонної сили, часу інкубації, присутності в суміші інших компонентів) і змінюється при їх варіюванні. Зв'язування білку з носієм залежить і від його концентрації, причому сумісний вплив рН та іонної сили найбільш чітко проявляється при більш високих концентраціях білку в розчинах. Зв'язування з полістироловим носієм безпосередньо залежить від часу і температури обробки. Після з'єднання антигену або антитіла з твердим носієм можна проводити реакцію прямого, непрямого, конкурентного і сендвіч-типу.

При прямому варіанті ІФА лунки мікроплат покривають тестуючим антигеном, інкубують, потім надлишок антигену видаляють і додають вірусспецифічне антитіло, кон'юговане з ферментом. Після інкубації надлишок кон'югату видаляють і додають субстрат (хромоген). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену. Метод потребує мінімальної кількості операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований.

При непрямому варіанті ферментну мітку вводять не в антивірусні імуноглобуліни, а в антитіла до них. Імунний комплекс Аг-Ат, імобілізований на твердому носії інкубують з антивидовими антитілами, які мають ферментну мітку Ат₂-Ф. Головна перевага методу – простота підготовки реагентів. Виключається складна процедура підготовки сироватки – очистка, виділення IgG і зв'язування їх з ферментом; можливе використання неочищеного вірусного препарату.

При використанні сендвіч-методу або його модифікації на тверду підкладку послідовно сорбують первинні антитіла, досліджуваний антиген і вторинні антитіла. У випадку простого варіанту сендвіч-методу ферментна мітка вводиться до складу вторинних антитіл, а при модифікованому методі – вторинні антитіла проявляються комплементарними до них антивидовими ензим-міченими (ЕМ) імуноглобулінами (кон'югатом). Сендвіч-метод з використанням поліклональних антитіл проводять в три стадії інкубації і декілька стадій відмивки. Однак, при використанні моноклональних антитіл, специфічних до різноманітних ділянок антигену, число стадій інкубації та промивання можна скоротити. Останнім часом ця модифікація знаходить все більш широке використання, так як для постановки реакції немає необхідності отримувати специфічні для кожного конкретного випадку ЕМ антитіла.

Серед методів ІФА можна виділити два типи – це так званий послідовний, або неконкурентний, та конкурентний аналіз.

При конкурентному гетерогенному аналізі присутні в реакційному середовищі зв'язані і не зв'язані з ферментом антигени одночасно вступають в конкурентну взаємодію з імобілізованими на твердому носії антитілами. При інкубації надлишок незв'язаних компонентів відмивають і в систему додають відповідний субстрат.

Одна з важливих переваг ІФА – висока чутливість, яка досягається, як правило, за рахунок ферментного кон'югату, збільшення періоду інкубації, особливо на стадії ферментативної реакції, і здійснення такої послідовності етапів, при якій антиген зв'язується з імобілізованими на носії антитілами, а потім взаємодіє з доданими на останній стадії кон'югованими антитілами. Слід відмітити, що збільшення часу інкубації далеко не завжди приводить до підвищення чутливості реакції. В кожному випадку необхідно перевіряти, чи відбувається при більш довготривалій інкубації подальший розвиток забарвлення або її послаблення, особливо у випадку проведення реакції при підвищеній температурі.

Приклад постановки сендвіч-методу

1. Наносять специфічні IgG по 100 мкл в кожен лунку, інкубують 14-18 год за 4°C, 3- або 5-кратно промивають буфером з твін-20.

2. В лунки, що містять іммобілізовані антитіла, додають по 100 мкл досліджуваного вірусу, розведеного в буфері з БСА (бичачий сироватковий альбумін), витримують 30-60 хв за 37°C або ніч за 4°C, відмивають лунки, як і в першому випадку.

3. Вносять кон'югат по 100 мкл, інкубують 60 хв за 37°C, відмивають.

4. Додають субстратну суміш по 100 мкл, витримують 30-90 хв при кімнатній температурі.

5. Зупиняють реакцію за рахунок внесення відповідного STOP-реагенту.

6. Вимірюють результати спектрофотометрично при відповідній довжині хвилі.

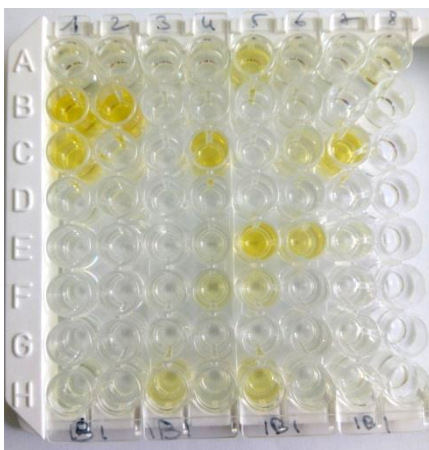
Конкурентний варіант ІФА

Метод заснований на конкуренції між сорбованим на твердій фазі антигеном і конкурентним (спорідненим) антигеном за центри зв'язування антитіл, гомологічних сорбованому антитілу.

Приклад постановки конкурентного варіанту ІФА:

1. В лунки вносять по 200 мкл антигену в буфері, що використовують для сорбції, інкубують суміш 18 год за 4°C, реагенти, які не зв'язались, тричі відмивають.

2. Послідовно вносять по 50 мкл розчину досліджуваного антигену (спорідненого або конкурентного) і 150 мкл сироватки в буфері-БСА, гомологічної сорбованому на планшеті антигену. Після інкубації за 37°C 4-5 год вміст лунок промивають.



3. В лунки вносять по 200 мкл розчину антивидового кон'югату (наприклад, IgG віслюка

проти IgG кролика, мічені ферментом). Вміст лунок інкубують 1-1,5 год за 37° С і промивають.

4. Наносять субстрат, після інкубації зупиняють реакцію внесенням STOP-реагенту і вимірюють ферментативну активність як в сендвіч-методі. Лунки після завершення ІФА мають наступний вигляд (Рис. 6). Аналіз проводиться в рівноважному режимі, час його проведення обмежений часом досягнення рівноваги між АГ-АТ.

Рис. 6. Лунки після завершення ELISA.

Для досягнення порогової чутливості використовують мінімальну кількість сорбованого антигену і концентрацію антитіл, що забезпечують зв'язування 50% сорбованого антигену при відсутності конкуренту.

Фактори, що спричиняють отримання хибних результатів та їх усунення.

Температура. Під час постановки ІФА потрібно враховувати температуру повітря в приміщенні. В інструкціях багатьох тест-систем проведення аналізу рекомендується проводити інкубацію за кімнатної температури (мається на увазі температура 18 – 25° С). На практиці температура в приміщенні варіює від 12 до 30° С, що може призвести до хибних результатів тестування. Тому, способом уникнення негативного впливу температурного фактору на проведення ІФА є установка планшетів в термостат, якщо температура нижче кімнатної, або припинення досліджень, якщо температура вище.

В склад тест-систем входять концентрати розчинів, які перед постановкою потрібно розвести дистильованою водою. Застосовуючи холодну (нижче кімнатної температури) дистильовану воду для розведення сироваток і кон'югата можна отримати неправильний результат, незалежно від температури інкубації.

Посуд, промивка і розведення компонентів. Посуд має бути чистим. Необхідно виділити окремий посуд для розчинів кон'югата, ТМБ і ОФД, та мити його більш ретельно, оскільки вплив забруднень на ці розчини сильніше відображається на результатах аналізу.

Перед промивкою вміст лунок бажано відбирати піпеткою чи вошером, після чого, у ході промивки, лунки заповнюються до самого верху. Таким чином, різко знижується ймовірність отримання хибних результатів, пов'язаних з забрудненням бокових поверхонь лунок розчинами сироваток чи кон'югата.

Слід враховувати, що сироватки, типові розчини розчинників та інші компоненти можуть відрізнятися за щільністю та в'язкістю. Готуючи розведення їх слід ретельно перемішувати піпетуванням.

Підготовка зразків та компонентів. Не правильна підготовка зразків та компонентів може вплинути на послідовні результати аналізу. Сироватку рекомендовано відстоювати 0,5 – 1 год. за температури 37° С в термостаті для швидкого формування фібринового згустку (фібриноген, що не перетворився в фібрин є джерелом хибнопозитивних реакцій) центрифугування 10 хв за 3000 об/хв. або 20 хв за 1500 об/хв.

Для приготування реагентів слід використовувати дистильовану чи деіонізовану воду, яку зберігають у неметалевих ємкостях. Тривале зберігання дистильованої води може призвести до розвитку у ній мікроорганізмів. Тому бажано не зберігати дистильовану воду більше 2-3 діб. Якщо дистильована вода чи компоненти зберігались у холодильнику то перед приготуванням розчинів їх потрібно прогріти до кімнатної температури, а після роботи повинні зберігатися при температурі від 2 до 8 °С. При окремому використанні набору варто скоротити до мінімуму розташування розчинів при кімнатній температурі, особливо у відкритому посуді.

Не варто використовувати реагенти пізніше вказаного терміну придатності. Перед використанням впевніться, що розчини і реагенти гомогенні.

Планшети (стріпи) можна використовувати для постановки ІФА тільки один раз. Перед відкриттям пакета з планшетом його варто витримати при кімнатній температурі приблизно 30 хвилин для запобігання конденсації вологи на планшеті. Якщо планшет розкладний і використовуються не всі стріпи одразу, то після відкриття стріпи, що залишилися, варто помістити в пакет, який необхідно закрити. Розповсюджений спосіб – край пакета звертається вдвоє і затискається скріпками. Закордонні фірми-виробники додають до наборів спеціальні зажими для цієї мети або ж вкладають поліетиленові пакети із зір-застібкою і вологоутримувачем всередині в яких за необхідності невикористаних стріпів можна продовжити їх зберігання, а паперовий пакетик з волого утримувачем підтримує всередині необхідну вологість в закритому зір-пакеті. Їх можна використовувати і для пакування пакетів з планшетами вітчизняних виробників.

Постановка реакції. Потрібно впевнитись у тому, що досліджуваний зразок або реагент внесений у лунку.

При використанні одноканальної піпетки для внесення досліджуваних зразків необхідно використовувати новий наконечник для кожного зразка. При використанні багатоканальної піпетки варто використовувати нові наконечники для кожного окремого реагенту.

Реакція зв'язування антитіл з антигенами починається одразу після внесення сироватки в лунку, тому бажано, за можливості, зменшити період між внесенням першої та останньої сироваток на планшет.

Якщо допущена помилка при внесенні досліджуваних зразків (наприклад, дві сироватки внесені в одну лунку), не можна, звільнивши цю лунку, вносити до неї новий зразок. Така лунка вибраковується.

Не варто допускати підсихання лунок в період між інкубаціями та промивками – можлива поява погано розчинної плівки на їх поверхні. У випадку необхідності довготривалої паузи варто покласти планшет догори дном лунок на змочену водою марлю чи фільтрувальний папір, в нормі – не

допускати довготривалої паузи. Не варто торкатися дна лунок – відбитки пальців чи рукавиць можуть спричинити до неправильної реєстрації.

При використанні стріп вварто працювати з обов'язковою фіксацією їх у рамці. Варто обережно протерти дно лунок за допомогою м'якої, безворсової серветки, яка не залишає волокон (при наявності на дні краплин вологи, пилу та інших забруднень). У випадку отримання даних відмінних від контрольних зразків, що потрапляють у інтервал, описаний у відповідному розділі інструкції, варто рахувати, що наявні помилки при підготовці чи постановці реакції, або тест-система не є придатною до експлуатації.