

Звіт

НТЦ імунобіотехнології НАНУ
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

Скорочення, використані в тексті посібника	3
Вступ	4
Епідемічна та епізоотична ситуація в Україні	5
Клінічна картина захворювання	8
Діагностика лептоспірозів	10
Схема проведення ІФА	20
Методика проведення імуноферментного аналізу при використанні тест-системи «ІФА-лептоспіроз-ВРХ»	21
Облік результатів аналізу	27
Обговорення результатів аналізу	30
Оцінка якості імуноферментної тест-системи	30
Основні особливості та переваги тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ”	35
Проблеми, що можуть виникати при проведенні ІФА	36
Література	41

ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК
по роботі з імуноферментною тест-системою
для виявлення антитіл проти лептоспір
“ІФА-лептоспіроз-ВРХ”

Київ, 2003

УДК 616.98-07:578.826.6

Практичний посібник по роботі з імуноферментною тест-системою для виявлення антитіл проти лептоспір "ІФА-лептоспіроз-ВРХ"

Автори: Іванська Н.В., Кучерявенко О-й.О., Кучерявенко О-р.О., Резуненко Є.В., Ганова Л.О.

Під редакцією професора М.Я. Співака

Лептоспіроз – одне з найпоширеніших антропозоонозних захворювань, що викликається лептоспірами. Високий рівень летальності при тяжких генералізованих формах цієї інфекції та значні економічні збитки при захворюванні тварин вимагають постійного контролю епізоотичної ситуації в країні. Останнім часом для діагностики лептоспірозу успішно використовують метод імуноферментного аналізу.

Для мікробіологів, імунологів, працівників діагностичних лабораторій, студентів та аспірантів вищих навчальних закладів та науково-дослідних інститутів медичного та ветеринарного профілю.

Рецензенти – академік УААН доктор біологічних наук, проф. Бойко А.Л., член-кор.УААН доктор ветеринарних наук, проф. Риженко В.П., доктор ветеринарних наук, проф. Волинець Л.К.

Рекомендовано до друку на засіданні Вченої ради Інституту ветеринарної медицини УААН
(протокол № 6 від 10.06.2003 р.)

Київ-2003

інститута удосконалення лікарів, ноябрь 1997г.) - Харьков, 1997, 115-118.

15. Шесточенко М.А., Кузьмин Н.А. Люминесцентный анализ в ветеринарии. М., «Колос», 1979, 344 с. (см.с.104-109).
16. Самсонова А.П., Лю Чжун-Фу, Петров Е.М., Аляпкина Ю.С., Ли Елон, Гинцбург А.Л., Ананьина Ю.В. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для индикации лептоспир в политипических очагах лептоспирозов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1997, № 4, С.С.15- (И-т епидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).
17. Резуненко Є.В., Кучерявенко О-й, О., Еверт В.В. Спосіб концентрування лептоспірозного антигену // Патент України № 2001031538. Бюл. № 7, 2001.
18. Кучерявенко О.О., Еверт В.В. Спосіб інактивації лептоспірозного антигену // Патент України № 2002010385, 2002.

7. Методические рекомендации МЗ РСФСР. Эпидемиология, диагностика, клиника и профилактика лептоспироза». – М., 1987.
8. Корщенко В.А. Состояние заболеваемости и основные эпидемиологические особенности лептоспирозной инфекции Северо-Востока Украины. - Там же, 118-121.
9. Пупкевич-Диамант Я.С. Некоторые итоги изучения патогенеза и патофизиологии лептоспирозного инфекционного процесса и его клинических проявлений.- ЖМЭИ – 1996. - № 1. - 100-104.
10. Настанова з лабораторної діагностики лептоспирозу // Київ, МЗ
11. Волина Е.Г., Дас Чандра, Шкарлат П. Методические аспекты серологической диагностики лептоспироза. – ЖМЭИ. – 2001. - № 4. – С.52-53.
12. Ellis W.A. Leptospirosis. In the: OIE (Office International des Epizooties) Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 1996, 198-204.
13. V.Pope, Larsen S.A, Schrieffer M. Immunologic methods for diagnosis of spirochetal diseases//In the: Manual of Clinical Laboratory Immunology (eds: N.R.Rose, E.C. de Macario, J.D.Folds, H.C.Lane, R.M.Nakamura), ASM Press, Washington (D.C.), 1997, 510-525 {Національна медична бібліотека, шифри 616-092, 616-097 (075), 616-078.7, Z-907}
14. Корщенко В.А. Иммунологическая структура населения в отношении лептоспирозной инфекции. В кн.: Актуальные проблемы теоретической и прикладной эпидемиологии (материалы юбилейной конференции, посвященной 60-летию кафедры эпидемиологии и медицинской паразитологии Харьковского

Скорочення, використані в тексті посібника:

- БСА – бичачий сироватковий альбумін;
 ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
 ВРХ – велика рогата худоба;
 ГЗ – граничне значення;
 ІФА – імуноферментний аналіз;
 К⁻ – позитивний контроль;
 К⁺ – позитивний контроль;
 ОГ – оптична густина;
 о.о. – оптична одиниця;
 ОГсер К⁻ – середнє значення оптичної густини для лунку з негативним контролем;
 ОГсер К⁺ – середнє значення оптичної густини для лунку з позитивним контролем;
 ОФД – о-феніллендіамін;
 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
 РМА – реакція мікроаглютинації;
 РНФ – реакція непрямой імунофлуоресценції;
 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) – Центри контролю та попередження хвороб (у США);
 dot-ELISA – точкова модифікація ІФА;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;
 FDA (USA Food and Drug Administration) – Державна агенція США з питань контролю ліків та харчових продуктів;
 IgA – імуноглобуліни класу А;
 IgG – імуноглобуліни класу G;
 IgM – імуноглобуліни класу M
 IR (initial reactive) – первинно реактивна сироватка;
 RR (repeat reactive) – повторно реактивна сироватка.

ВСТУП

Проблема лептоспірної інфекції останнім часом набуває все більшого значення. Лептоспіроз став найпоширенішим з природно-осередкових антропоозоонозів – інфекцій, що вражають як людей, так і тварин та можуть переноситися від тварини до людини. Нині це одна з найголовніших зоонозних інфекцій світового рівня.

Лептоспіроз поширений на всіх континентах. Оскільки найчастіше джерелом інфекції бувають гризуни, а до деякої міри – також і свійські тварини, формуються міські та природні осередки інфекції, які важко знешкодувати. Контроль лептоспірозу ускладнюється ще й тому, що тварини без клінічних ознак захворювання можуть місяцями виділяти збудника з сечею. Навіть вакциновані тварини можуть бути носіями бактерій та забруднювати ними довкілля. Висока чутливість людей та багатьох тварин до зараження лептоспірами створюють небезпеку зараження й захворювання людини та свійських тварин при перебуванні їх в природних осередках лептоспірозу, а також при наявності збудника в житлових приміщеннях, на фермах, сховищах, в льохах, сараях тощо. За даними обмеженого епідеміологічного дослідження, біля 30-40 % пацієнтів у великих містах стає носіями лептоспір [1].

У нашій країні відзначається виражена тенденція до росту захворюваності на лептоспіроз як серед міського, так і серед сільського населення. У списку захворювань, які небезпечні для життя та впливають на показники смертності в Україні, лептоспіроз за значенням своїм посідає шосте-сьоме місце. Дуже значна смертність при важких генералізованих формах цієї інфекції (в Україні вмирає до 20 % від загального числа осіб з важкими формами лептоспірозу, за даними ж всевітньої статистики цей показник лежить у межах 5-30 %), а також значні

Література

1. Малахов Ю.А. Лептоспіроз животиных // Москва ВО, Агропромиздат, 1992, 267 с.
2. Бобильова О.О., Бережнов С.П., Мухарська Л.М., Падченко А.Г., Некрасова Л.С. Профілактика інфекційної захворюваності залишається актуальною проблемою системи охорони здоров'я та держави. – Сучасна інфекція, 2001, № 1, 4-10.
3. Дикий Б.М., Пришляк О.Я., Пюрлик В.Ф. Диагностичні помилки при лептоспірозі на догоспітальному рівні. В кн.: «Інфекційні хвороби. Збірник наукових робіт», в. V, Львів, «Ескулап», 1997, с.31-32
4. Голубятников Н.И., Редько Е.Д. Особенности дератизационных мероприятий в Ильичевском рыбном морском порту //Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С. 78-79.
5. Баздирева Н.Г., Ігнатенко В.О., Крамаренко С.С., Немцев Ф.І., Федорченко І.Д. Спалах лептоспірозу в Миколаївській області //Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С.16.
6. Близнюк В.Д., Кузнецов В.Л. Некоторые аспекты эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозов в Луганской области//Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С.17-18.

інструкції.		
	5.2. Термін придатності тест-системи закінчився.	5.2.1. Перевірити результати на тест-системі з належним терміном придатності.

економічні збитки, пов'язані з захворюваністю та з загибеллю сільськогосподарських тварин, роблять цей важкий зооноз одним з найістотніших для нашої країни в соціально-економічному плані [2].

Люди та тварини можуть захворіти на лептоспіроз через споживання інфікованих продуктів харчування і при контакті з предметами домашнього вжитку, забрудненими сечою тварин-носіїв лептоспір (звичайно пацюків, рідше мишей, свиней, великої рогатої худоби, собак і т.д.), у яких захворювання дуже часто перебігає у безсимптомній формі [3].

Епідеміологічні, епізоотичні, клінічні й ветеринарні особливості лептоспірозу свідчать про необхідність контролю цієї інфекції, постійної оцінки епідеміологічної ситуації та безпеки лептоспірозу для людей та тварин у тому або іншому біотопі. Наявні дані доводять актуальність проблеми лептоспірозу для нашої країни, вказуючи, що ця інфекція мала б потрапити у зону підвищеної уваги робітників охорони здоров'я та ветеринарної служби. Тим часом численні дані [3] доводять, що справа стоїть зовсім інакше. Поки що в медиків відсутня належна увага до лептоспірозу, і він найчастіше, особливо спочатку, не діагностується правильно. Відсутність своєчасного правильного діагнозу та своєчасного належного лікування – одна з головних причин важких проявів і смертельних наслідків лептоспірозу в людини.

Епідемічна та епізоотична ситуація в Україні

Як відомо з офіційних джерел [4], Україна, як і Росія, перебуває у групі країн з найскладнішою епідемічною та епізоотичною ситуацією щодо лептоспірозу. Хвороба в Україні має тенденцію до загострення. Проведені дослідження доводять, що кількість серопозитивних тварин в Україні зросла у 2001 р. більш як утричі

порівняно з 1990-м роком. Так само зросла доля випадків, коли тварини безсимптомно переохворіли на лептоспіроз. Найбільше неблагополучних пунктів та хворих тварин у 1994-2001 рр. виявлено у Харківській, Донецькій, Дніпропетровській, Житомирській та Одеській областях, а також у Києві. У 1999 р. найбільша кількість серологічно реактивних особин великої рогатої худоби припала на Дніпропетровську область (31,2 %) та Крим (24 %); серед свиней пальма першості належала Миколаївській (31,2 %), Київській (34 %) та Черкаській (24 %) областям. В Україну завезли свиней, позитивних при серологічній пробі на лептоспіроз, з Австрії та Німеччини; в Київську область такі тварини потрапили з Черкаської, Полтавської, Житомирської та Запорізької областей [5,6].

Так само невтішна й медична статистика. Якщо в 1998 р. занедужали на лептоспіроз 1537 чол. (11 з них померли), то вже в першому півріччі наступного року зареєстрували підйом захворюваності на 27 % порівняно з попереднім роком [2].

Серогрупи лептоспір

Кожна з серогруп лептоспір звичайно найбільш пристосована до якогось певного хазяїна; проте вона може заражати також і тварин інших видів, що стають випадковими хазяями (accidental hosts). У нашій країні захворювання на лептоспіроз серед тварин найчастіше зумовлюють представники таких серогруп: у великої рогатої худоби – Hebdomadis, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Tarassovi; у свиней – Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, рідше – Grippotyphosa, Canicola; у дрібної рогатої худоби – Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Tarassovi; у коней переважають серогрупи Pomona, Tarassovi; у собак – Icterohaemorrhagiae, Canicola; у гризунів Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona. У людини лептоспіроз виникає переважно через зараження

	піпетки розчином кон'югату.	мікропіпетки. При відсутності достатньої кількості мікропіпеток треба після внесення кон'югату і зняття наконечників звільнити піпетку від можливих залишків кон'югату та протерти її фільтрувальним папером.
4. Після внесення проявика та закінчення часу інкубації немає кольору в лунках всього планшету.	4.1. Не внесено один з реагентів – кон'югат або проявик.	4.1.1. Переставити аналіз. Внести, відповідно до "Інструкції", необхідні реагенти.
Немає забарвлення в окремих лунках планшету (рядів).	4.2. Не внесено один з реагентів – сироватку, кон'югат або проявик.	4.2.1. Переставити ці проби. Внести, відповідно до "Інструкції", необхідні реагенти.
5. Слабке забарвлення всього планшета. Значення ОГ контрольних зразків не відповідають вимогам	5.1. Зменшено час інкубації.	5.1.1. Інкубацію проводити згідно з "Інструкцією".

окремих лунках.	розчину з лунки планшету вошером.	порушення.	представниками Icterohaemorrhagiae та Giiproturphosa, рідше Rotona та Canicola. Основні носії легтоспір Icterohaemorrhagiae в Україні – мишоподібні гризуни. Взагалі ж носійство легтоспір описано для дев'яти з 18 рядів класу ссавців; однак основне епідеміологічне значення в Україні мають гризуни, комахоїдні та хижаки [7].
	2.2. Використання для дослідження гемолізованих зразків.	2.2.1. Повторно взяти кров.	Легтоспірна інфекція часто пов'язана з тваринництвом та використанням шпучних водойм, розташованих в населених пунктах, для напування тварин. Від початку 90-х рр. XX століття дуже поширився легтоспіроз, викликаний збудниками серологічної групи Canicola. Трапляються групові (сімейні випадки) такого легтоспірозу. Важлива роль у цьому належить бродячим собакам, що контактують з різними сілськостодарськими тваринами. Раніше вважалося, що легтоспіроз не передається людям від собак через сечу завдяки кислотній реакції собачої сечі, яка призводить до інактивації збудника. Проте ймовірно, що серед бактерій є мутанти, які не знешкоджуються в кислому середовищі, або що внаслідок захворювання та пов'язаної з ним зміни обмінних процесів рН сечі змінюється в лужний бік.
3. Високий фон в окремих рядах.	3.1. Повторне внесення проявника. 3.2. Повторне використання наконечників. 3.3. Переливання рідини з одного ряду в другий під час промивання. 3.4. Забруднення конусу автоматичної	2.3.1. Отримати сироватку. Повторно взяти пробу крові. 2.4.1. Повторно взяти кров. 2.5.1. Використовувати окремі наконечники для кожної сироватки. 3.1.1. Розчин проявника вносити одноразово. 3.2.1. Наконечники використовувати одноразово. 3.3.1. Відрегулювати подачу промивного розчину. 3.4.1. Для внесення кон'югату та проявника обов'язково мати окремі	Останнім часом у деяких областях України у собак та в людей зареєстровано хворобу, викликану серогрупами Sejroe та Nebdomadis. Взагалі ж у медицині й у ветеринарії найістотніше значення, за даними спеціальної літератури, мають збудники, що належать до (серо)груп Rotona (для свиней), Tarassovi, Giiproturphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Neptomadis, Bataviae; серед патогенів виявляють також представників серогруп Australis, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Hardjo (для великої рогатої худоби), Javanica, Medanensis, Panama, Pyrogenes, Shermani, Wolffii.
			Відповідно до результатів епідеміологічних досліджень, проведених на Північному Сході України,

лептоспірами різноманітних серогруп інфіковано біля 20 % осіб, що працюють у м'ясо-молочній промисловості; при цьому біля 81 % загальної захворюваності на лептоспіроз серед цього контингенту припадає на серогрупи Pomona, Hertomadis, Tarassovi, Icterohemorrhagiae. Істотно також, що відзначено деяку специфіку зараженості лептоспірами серед осіб певних професій. Якщо, наприклад, серед доярок позитивні реакції на лептоспіроз припадали в основному на серогрупи Hertomadis і Ggrrpocyphosa, то серед свинарів – на серогрупи Pomona, Tarassovi і Icterohemorrhagiae, які особливо розповсюджені серед свиней і пацюків. Таким чином, зрозуміло, що оздоровлення всього поголів'я сільськогосподарських тварин і боротьба з гризунами (дератизація) – це заходи, дуже важливі не тільки у ветеринарному і господарському відношенні (наприклад, з погляду продуктивності тваринництва в нашій країні), але і з погляду епідеміології й охорони здоров'я в цілому [8].

Клінічна картина захворювання

Клінічна картина захворювання значною мірою залежить від виду зараженої тварини. Звичайно в дефінітивного хазяїна хвороба перебігає субклінічно, без видимих ознак, переходячи часто у хронічну форму; у випадкового хазяїна захворювання проявляється у гострій формі [9].

Лептоспіроз клінічно дуже різноманітний і характеризується багатогранними проявами на рівні багатьох органів і систем – від захворювання легкого і середнього ступеню, що нагадує застуду, гостру респіраторну інфекцію чи грип, до найтяжкого враження печінки й нирок (так званої хвороби Вейля-Васильєва, або іктерогеморрагічного лептоспірозу; при поверхневому огляді лікаря-діагноста це захворювання можна сплутати з гепатитом), і навіть до лімфоцитарного менінгіту.

	1.4. Використання того ж самого посуду для різних реагентів.	1.4.1. Використовувати для розчину кожного реагенту окремих посуд.
	1.5. Наявність і використання на робочому місці дезрозчинів, що містять хлор.	1.5.1. Не використовувати і не зберігати дезрозчини з вмістом хлору в приміщеннях, де проводяться дослідження методом ІФА.
	1.6. Повторне використання наконечників.	1.6.1. Наконечники використовувати одноразово.
	1.7. Контакт хромогену з металами (пінцет, скальпель тощо).	1.7.1. Усунути контакт хромогену з металами.
	1.8. Зменшено кількість циклів промивок планшету.	1.8.1. Промивати планшет згідно з вимогами даної "Інструкції".
	1.9. Закінчився термін придатності тест-системи.	1.9.1. Заборонити використання тест-системи.
	1.10. Забруднені посуд.	1.10.1. Мити посуд, дезінфікувати його відповідно до "Інструкції."
	1.11. Збільшено температуру або термін інкубації.	1.11.1. Дотримуватися режиму інкубації.
2. Високий фон в		Відрегулювати промивач, виключити можливі

ПРОБЛЕМИ, ЩО МОЖУТЬ ВИНΙΚАТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Засоби усунення проблем
1. Високий фон (забарвлення) в лунках всього планшету.	1.1 Низька якість дистильованої води.	1.1.1. Промити дистильатор 10 % розчином соляної кислоти, а потім 5 разів дистильованою водою. 1.1.2. Прокип'ятити дистильовану воду у відкритій посудині протягом 10-15 хв., вистояти перед використанням. 1.1.3. Використовувати бідистильовану воду.
	1.2. Бактеріальне забруднення води.	1.2.1. Зберігати дистильовану воду в закритому посуді. 1.2.2. Дистильовану воду використовувати протягом дня.
	1.3. Забруднений промивач (вошер).	1.3.1. Почистити голівку промивача за допомогою голки та промити промивач 30 % розчином етилового спирту, а потім декілька разів дистильованою водою.

Жовтяниця проявляється тільки приблизно у 10 % випадків лептоспірозу людини (icteric leptospiroses), інші ж 90 % ставляться до форм без жовтяниці (anicteric leptospiroses). Хвороба може не тільки сильно вражати інфікованих людей і тварин, приводячи іноді й до смерті, але й протікати в безсимптомній формі. При цьому все ж відбувається виділення лептоспір у зовнішнє середовище (shedding) із сечею, що сприяє подальшому їх поширенню, зараженню нових хазяїв. Звичайно людина буває тупиковим хазяїном для лептоспір (dead end host), а тому передача даного захворювання від людини до людини описана як явище дуже рідкісне [3].

Інкубаційний період при лептоспірозі (в залежності від особливостей і стану організму, від серогрупи і серовару збудника та дози бактеріальних клітин, що викликали зараження) триває від двох до 20 днів, у середньому біля 10 днів.

Часто лептоспіроз у людей і тварин протікає в дві стадії. Перша з них (вона триває 7-10 днів) характеризується появою збудника у крові (септицемія та антигенемія), у спинномозковій рідині й у багатьох тканинах; клінічно ця стадія проявляється у важких випадках як тяжкий васкуліт. Ендотоксини лептоспір, що утворюються внаслідок розпаду збудника під дією літичних антитіл, викликають ураження клітин крові та паренхіматозних органів. При руйнуванні еритроцитів у людей та тварин розвивається анемія; при цьому у крові накопичується вивільнений гемоглобін, який не може бути повністю використаний клітинами печінки для утворення жовчного пігменту білірубину. Тоді цю функцію беруть на себе клітини ретикулоендотеліальної системи; білірубін, поглинутий тканинами, забарвлює їх у жовтий колір.

Під час другої, так званої імунної фази лептоспірозу (вона триває 10-30 днів), бактерії зникають з крові та з

спинномозкової рідини, час від часу з'являючись у сечі і внутрішньоочній рідині [9].

Діагностика лептоспірозів

Для проведення повноцінних епідеміологічних досліджень, для планування стратегії й тактики протиепідемічних заходів, для профілактики лептоспірозу в людей і оздоровлення тваринництва в Україні неможливо обійтися без своєчасної діагностики.

У медицині та ветеринарії для постановки діагнозу вдаються до бактеріологічного та біохімічного аналізу крові (на білірубін, активність деяких ферментів), дослідження сечі (на наявність крові, визначення питомої ваги сечі) та фекалій (для виявлення крові) [7,10].

Мікроскопія в темному полі дозволяє виявляти лептоспір незабаром після захворювання при дослідженні зразків крові (лептоспір видно через тиждень після зараження) та сечі (де бактерії присутні після 8-го-16-го дня після зараження). Треба підкреслити, що кисла реакція сечі незабаром знезаражує збудника. Через короткий час після забою тварин з першою стадією захворювання на лептоспіроз бактерій виявляють у багатьох зразках тканин і в спинномозковій рідині (при наявності ознак менінгіту). Завдяки дії трупного автолізу (активації лізосомних ферментів, яка супроводжує відмирання клітин) бактерії незабаром гинуть, і їх вже не виявляють у тканинах загиблих та забитих тварин. Тому матеріал, призначений для досліджень, варт якомога швидше зафіксувати (звичайно його обробляють формаліном) [7].

Інший, іноді застосовуваний діагностичний підхід – біопроба. Для цієї мети беруть звичайно золотистих хом'ячків у віці 20-30 днів та кроленят-сисунців у віці 10-20 днів, рідше дорослих кролів та мурчаків. Досліджуваний матеріал вводять під шкіру або ж у черевну порожнину. Біопробу вважають за позитивну, якщо при виражених

- Відкрита система, яка легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- Загальноновизнана стандартизація обліку результатів.
- Різні варіанти комплектації наборів за вибором замовника: стриповий або монолітний планшет, хромоген – ТМБ або ОФД.
- Один набір розрахований на 192 аналізи.
- Термін придатності - 6 місяців.

осіб, що містять антитіла проти збудників хвороби Лайма³, повортного тифу, фрамбезії⁴, сифілісу, клітинні оболонки яких мають спільні антигени з клітинними оболонками лептоспір. Тому тільки достатнє очищення імунодомінантних лептоспірних антигенів, сумлінна їх ідентифікація забезпечать належну інформативність реакції і дозволять проводити її при задовільних фонових значеннях оптичної густини в ІФА.

Для визначення чутливості та специфічності тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ” було досліджено 955 зразків сироваток позитивних до різних сероваріантів лептоспір, які були охарактеризовані в РМА як позитивні; а також 1414 зразків, які охарактеризовані в РМА як негативні. Всі позитивні в РМА сироватки були позитивними і в ІФА. В той же самий час серед негативних сироваток в РМА – 154 зразка були позитивними в тест-системі “ІФА-лептоспіроз-ВРХ”, що у подальшому підтвердилося в РМА в 120 випадках при повторному дослідженні через 14-28 днів.

Основні особливості та переваги тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ”

- Висока чутливість та специфічність.
- Використання високоспецифічних антигенів у складі імуносорбента, які отримані з патогенних штамів лептоспір, актуальних в Україні.
- Можливість виявляти антитіла до всіх патогенних для великої рогатої худоби штамів лептоспір.
- Тривалість аналізу 2 години.

³ Інакше його називають кліщовим борреліозом чи кліщовим спірохетозом.

⁴ Тропічний сифіліс (“уав”), викликаний збудником, що належить до спірохет роду Тгеронета.

клінічних проявах та відповідних патолого-анатомічних змінах у заражених тварин виявлено лептоспіри або ж антитіла проти них чи коли збудника виділено в культурі.

Основний нині поширений підхід для діагностики захворювання та для ідентифікації збудника - культурально-серологічний. З цілого арсеналу описаних у літературі серологічних проб на практиці звичайно застосовують реакцію мікроаглотинації (РМА, microscopіc agglutination test, МАТ) з використанням живих бактерій [10]. Це поки що “чинний” стандартний тест, у порівнянні з яким оцінюють усі інші діагностичні методи. Щоб одержати гранично чіткий та безпомилковий результат, при постановці проби треба якомога повніше використовувати культури лептоспір саме тих сероварів, які найчастіше виявляють у даній країні чи в даній місцевості, а також бактерії з найважливіших «патогенних серогруп». Чутливість проби іноді зростає, якщо крім «всесвітніх» стандартних штамів узяти для роботи також і місцеві ізоляти. Більше того: часом негативні результати дослідження обумовлені саме тією обставиною, що певні антигени лептоспір чи антитіла проти них відсутні в тестах, за допомогою яких досліджували матеріали від певних осіб або тварин. Обійтися без таких помилок можна за допомогою РМА, поставленої з сапрофітними лептоспірами виду *L.biflexa* (ці бактерії не викликають захворювань, працювати з ними цілком безпечно): завдяки спільності родоспецифічних антигенів можна встановити, що йдеться саме про патологію, викликану лептоспірами. Проте в усіх випадках без стандартних штамів не варто обходитися при постановці проби, бо використання їх при необхідності допомагає порівнювати й оцінювати результати, одержувані в різних лабораторіях, що знаходяться часом у різних місцевостях або й у різних країнах [11].

Штами лептоспір, використовувані для постановки РМА, вирощують звичайно при температурі 29 °С (28-30 °С для різних штамів) у рідкому живильному середовищі з полісорбатом-80 і бичачим сироватковим альбуміном (БСА) або на інших стандартних середовищах, як, наприклад, ЕМЖН (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), РМЛ-5 (Amprut Pharmaceutical Company, Kankakee, Ill.). Найголовніша обставина, що обумовлює успіх роботи (інформативність реакції, тобто точність, специфічність, відтворюваність одержуваних результатів) при проведенні РМА (та й всіх інших серологічних реакцій) – це чистота й ідентичність використовуваних антигенів. В авторитетних клінічних та ветеринарних посібниках з діагностики лептоспірозу сказано, що ідентичність лептоспірних антигенів має оцінюватися принаймні двічі на рік за допомогою гіперімунних кролячих сироваток або ж препаратів моноклональних антитіл [12]. Причому застосування нестандартних живильних середовищ, яких не вказано серед тих середовищ, на яких дозволено вирощувати лептоспіри з метою подальшого використання їх для серологічних робіт, може призвести до відсутності в клітинній оболонці культивованих бактерій усіх належних діагностично важливих антигенів (або їхніх імунодомінантних епітопів) з причин загальновідомої модифікаційної мінливості прокаріотичних (та й інших) клітин. Така пристосувальна (адаптаційна) мінливість (йдеться про вірулентність¹, рівень синтезу різних антигенів, укладку поверхневих антигенів, експонування

¹ Деякі культури лептоспір можуть втратити вірулентність після декількох пересівів при культивуванні поза організмом, на живильних середовищах. Механізм втрати вірулентності до кінця не з'ясували, хоча більшість дослідників схильні пов'язувати таку мінливість з явищем мікробної дисоціації та впливом кисню. Після дисоціації на штучному середовищі проходить селекція невірулентних клонів. За літературними даними, відновити вірулентність, втрачену *in vitro*, не завжди вдається.

при тестуванні проб, що входять до “негативної вибірки”, для якоїсь проби отримано позитивний результат, то перш ніж вважати його за хибно-позитивний, слід провести додаткові дослідження.

Досить часто при використанні стандартних охарактеризованих панелей сироваток чутливість і специфічність імунодіагностикумів наближаються або дорівнюють 100 %, але досягти таких показників в умовах повсякденної лабораторної роботи практично неможливо. Взаємозв'язок між чутливістю і специфічністю такий, що поліпшення одного показника супроводжується погіршенням іншого. Таким чином, не існує діагностикумів, які гарантують абсолютну чутливість і специфічність при проведенні масових обстежень.

Кількість хибно-позитивних результатів при виявленні антитіл до деяких збудників може коливатися в межах від 0,02-0,5 % до 2-40 % усіх позитивних результатів обстежень. Так, за зведеними даними, існує біля 70 хвороб або інших чинників, які призводять до отримання хибно-позитивних результатів при дослідженні серологічними методами (не обов'язково ІФА). Це можуть бути перехресні реакції з аутоантитілами, антитілами до ревматоїдного фактору, короткочасна сероконверсія (після вакцинації, введення імуноглобулінових препаратів), наявність інфекційної патології, пухлин, імунодефіцитних станів, тощо.

Обговорюючи загалом питання про специфічність серологічних тестів, слід вказати, що клітинні оболонки лептоспір містять також ще й антигени, спільні з деякими іншими збудниками. Хибно-позитивну реакцію на лептоспіроз виявлено при роботі з сироватками здорових людей (в одному дослідженні в 7 % контрольних сироваток, отриманих від практично здорових осіб, знайшли «протилептоспірні» антитіла) і з сироватками

Хібно-негативний результат – це негативний результат, отриманий у даній тест-системі для проби, яка насправді позитивна.

Хібно-позитивний результат – це позитивний результат, одержаний у даній тест-системі для проби, яка в дійсності негативна.

Таким чином, більш чутливою буде та тест-система, що дає меншу кількість хібно-негативних результатів, а більш специфічною – та, що дає меншу кількість хібно-позитивних результатів.

Метод ІФА цінний насамперед через його високу чутливість (окремі його модифікації дозволяють визначати до 10^{-18} моль/л антигену) та високу специфічність (близько 100 %).

Визначення чутливості й специфічності тест-систем, відповідно до рекомендацій ВООЗ, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA Food and Drug Administration), здійснюється шляхом оцінки здатності діагностикумів виявляти позитивні або негативні сироватки, які входять до складу стандартних контрольних панелей (наборів) сироваток. При цьому зразки сироваток позитивних контрольних панелей повинні бути представлені в усьому діапазоні імунореактивності до збудника – від сироваток з ранньою сероконверсією до сироваток осіб з клінічною картиною хвороби. Показник специфічності тест-систем визначають при дослідженні рандомізованої вибірки сироваток донорів крові (random blood donors), сироваток осіб, які належать до груп високого ризику інфікування збудником, та пацієнтів з іншими патологіями. При цьому беруться до уваги показники первинної (IR - initial reactive) і повторної (RR - great reactive) реактивності позитивних зразків, отриманих на цій тест-системі, з наступною верифікацією результатів.

Оцінюючи специфічність імунферментних тест-систем, слід брати до уваги їхню високу чутливість. Якщо

різних епітопів, міру глікозилювання антигенів, інші особливості цього процесу тощо²) може відбуватися при зміні культурального середовища. Антигенна (імуногенна) активність лептоспир порівняно легко змінюється в залежності від складу середовища. Тому у директивних документах ВООЗ та в посібниках Міжнародного епізоотичного бюро провідні фахівці з проблеми лептоспірозу наголошують, що використання стандартних живильних середовищ – одна з основних вимог успішної серологічної роботи; порушення цієї вимоги найчастіше не дозволяє одержати повноцінних антигенів, потрібних для створення тест-системи [13].

Для роботи беруть рідкі культури у віці 4-8 днів, густину яких контролюють фотометрично при довжині хвилі 400 нм, причому коефіцієнт пропускання антигену має дорівнювати 60-70 %. У цьому випадку для постановки реакції антиген розводять у 50 разів. У кожному лунку планшету вносять об'єм антигену, рівний об'ємові розведеної сироватки; кінцеве розведення сироватки при постановці тесту дорівнює 1:100. Планшети з досліджуваними пробами ставлять на 2 години при температурі 28-30 °С. Потім проби розглядають у темному полі мікроскопа. Результат реакції описують у відсотках в залежності від міри аглютинації лептоспир (4+ при 100 %-ній аглютинації, 3+ - при приблизно 75 %-ній, 2+ - при 50 %-ній і 1+ - у тому випадку, коли аглютиновано менш як 50 % бактерій). При проведенні масових досліджень будь-яку сироватку, що дає 50 %-ну аглютинацію при розведенні в 100 разів, титрують до кінцевої точки у двох повторностях, розводячи її далі (до 12.800 разів і більше).

² Є відомості про роль наявних у середовищі жирних кислот, пірувату, Твіну 80 та сироваткового альбуміну для збереження антигенної структури лептоспир, але отримані дані досить суперечливі. Питання про антигенну мінливість лептоспир, походження серологічних варіантів та про спонтанну мінливість досі не опрацьовано в достатній мірі.

За титр вважають те найвище розведення сироватки, при якому вона ще склеює 50 % лептоспирних клітин.

У ветеринарній практиці вважають, що діагноз на лептоспіроз встановлено і що господарство неблагополучне щодо лептоспірозу, у випадках, коли:

– лептоспіри виявлено при мікроскопічному дослідженні у крові чи у суспензії органів хворої тварини, в абортваному плоді, сечі чи органах лабораторної тварини, яка загинула після зараження досліджуваним матеріалом;

– з патологічного матеріалу чи з органів лабораторної тварини, зараженої досліджуваним матеріалом, виділено культуру лептоспір;

– лептоспіри знайшли на гістологічних зрізах нирок чи печінки після імпрегнації сріблом за методом Левадиті;

– титр антитіл нарастає п'ятикратно чи більше при повторному дослідженні сироваток в РМА через 7-10 днів або при виявленні антитіл у тварин, які раніше були серонегативними;

– при однократному обстеженні в РМА специфічні антитіла виявлено у сироватках крові більш як у 25 % обстежених тварин у титрах 1:100 чи вищих [12].

Лептоспіроз вважають за причину викиднів у тих випадках, коли:

– збудника знаходять у органах чи тканинах недоношеного плоду;

– титр антитіл у матки, що не змогла доносити плоду, нарастає більш як у п'ять разів;

– у таких маток виявлено високі титри антитіл проти лептоспір (1:2.500 та вищі), тоді як у здорових тварин титри низькі (1:50) чи реакція негативна.

Наявність антитіл у низьких титрах при виражених клінічних проявах хвороби свідчить про високу вірулентність збудника або/та про слабкий опір проти нього через ослаблення інфікованого організму. Коли ж

Оцінка якості імуноферментної тест-системи

Основними показниками якості імуноферментної тест-системи, її надійності є чутливість, специфічність та відтворюваність отримуваних результатів.

Чутливістю називають показник, який виражає долю позитивних відповідей при наявності даної патології, тобто кількість вражених осіб, які можуть бути виявлені при використанні даної тест-системи:

$$\text{Чутливість} = \frac{П}{П + ХН} \times 100 \%,$$

де *П* - кількість позитивних результатів ІФА, *ХН* – кількість хибно-негативних результатів ІФА.

Хибно-негативні результати тестування обумовлені багатьма причинами: можливе носійство збудника без клінічних проявів хвороби та продукції антитіл, не виключається негативний результат дослідження, якщо беруть кров у період сероконверсійного "вікна", коли в організмі ще немає специфічних антитіл, тощо.

Специфічністю називають показник, що характеризує здатність тест-системи визначати лише той компонент, який вона має визначати, тобто, негативність тесту за умов відсутності патології:

$$\text{Специфічність} = \frac{Н}{Н + ХП} \times 100 \%,$$

де *Н* – кількість негативних результатів ІФА, *ХП* – кількість хибно-позитивних результатів ІФА.

Поняття про "чутливість" та "специфічність" тісно пов'язані з поняттями про "хибно-позитивний результат" та "хибно-негативний результат".

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ більше за 10 x ГЗ (>1,4), така сироватка вважається високо-позитивною.

Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш як у двох лунках тест-системи; при цьому:

- Зразки, позитивні в одній або більше лунках, слід вважати позитивними;
- Зразки, негативні в двох або більше лунках, слід вважати негативними.

У випадку, коли повторно отримали невизначений результат, тварин необхідно ще раз дослідити на лептоспіроз через 14 днів.

Обговорення результатів аналізу

Застосування тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ” дозволяє проводити масові обстеження тварин, якісно виявляти сумарні антитіла проти 7 основних серогруп лептоспір, які актуальні в Україні, а саме Roman, Tarassovi, Grippotyphosa, Icterohemorrhagiae, Canicola, Kabuta, Polonica.

Дана тест-система не призначена для виявлення рівня антитіл до певної окремої серогрупи лептоспір, а тому кількісне визначення антитіл проти окремих збудників лептоспірозу за допомогою даної тест-системи неможливе. Це значить, що порівнювати результати ІФА (значення оптичної густини) з титрами антитіл проти якогось окремого штаму лептоспір в РМА неприпустимо. За допомогою тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ” можливо проводити скринінг великої кількості тварин на наявність антитіл проти лептоспір, а потім у відібраних позитивних зразках іншими методами, наприклад РМА, ідентифікувати збудника.

виявляють низькі титри антитіл при відсутності клінічних ознак лептоспірозу, можна припустити, що організм інфіковано штамми зі слабкою вірулентністю або думати про перенесену хворобу чи/та про переживання збудника. Високі титри РМА (1:400-1:800) характеризують давнє зараження й легкий перебіг хвороби, а також добрий захист організму. У тварин, які перехворіли на лептоспіроз, пожиттєво зберігається слабо-позитивна реакція (1:5-1:10) [10].

Антигенна структура лептоспір

Антигенну структуру лептоспір характеризують як “дуже мозаїчну”. Кожен серовар має декілька антигенів, якісно нерівноцінних. Трапляється, що штамми, які суттєво не відрізняються за антигенною структурою, бувають дуже різні за своєю патогенністю для різних тварин. Важливо знати, що родоспецифічні антигени збудника лежать всередині клітини бактерій [13].

Антитіла проти збудника з'являються через декілька днів після початку хвороби. Серед цих антитіл є такі, що склеюють бактерії (аглютиніни), осаджують (преципітини) та розчиняють їх (лізини), а також специфічні антитіла, які зв'язують комплекс.

Відомості про тривалість зберігання антитіл у крові дуже суперечливі. Є дані про виявлення сироваткових антитіл протягом декількох тижнів, місяців або навіть років. Описано тривале (навіть до 16 років) зберігання специфічних IgG в крові осіб, які перехворіли на лептоспіроз, і про те, що часом при клінічно доведеному зараженні і достовірному діагнозі лептоспірозу антитіла цього класу в сироватках не з'являються зовсім. Відомі досить несподівані (але підтвержені декількома незалежними групами авторів) дані про тривале зберігання в сироватках перехворілих осіб і носіїв антитіл класу IgM, виявлення яких сприяє також і більш ранній діагностиці

збудників. Але водночас накопичуються також і переконливі повідомлення про те, що коли інфекція у людей і тварин набуває хронічного перебігу, то у більшості випадків титри антитіл незабаром падають до дуже низьких рівнів [14]. Тому для якісної діагностики, безсумнівно, потрібні достатньо високочутливі методи.

Заключний діагноз лептоспірозу залежить від появи та від рівня антитіл у крові, а також від успішного виділення бактерій з клінічних зразків (пряме знаходження бактерій у сечі, крові й молочці, а іноді, по смертно – в різноманітних органах тварин).

Як уже зауважено, РМА поки що незамінна при діагностиці лептоспірозів саме тому, що вона дозволяє не лише встановити наявність збудника, але й одночасно визначити його серогрупу. Проте нерідко при роботі з культурами людей та сільськогосподарських і свійських тварин в РМА виявляють міжгрупові реакції з бактеріями різних серогруп. Щорічно кількість сироваток, взятих від різних тварин, що мають позитивні реакції з лептоспірами декількох серогруп, достовірно зростає. Експерти ВООЗ рекомендують у таких випадках вважати за збудника лептоспір тієї серогрупи, для якої встановлено найвищі титри сироватки. Якщо титри антитіл проти збудників різних серогруп однакові чи дуже близькі, становить ускладнюється, і необхідно проводити додаткові дослідження [12].

Діагностичні тест-набори для визначення лептоспір та антитіл до них

Міністерство сільського господарства та продовольства Російської Федерації дозволило до вжитку набір для діагностики лептоспір в мікрореакції латекс-аглотинації на склі [7]; у даному наборі антиген (полісахаридну фракцію з клітин лептоспір семи епідеміологічно актуальних серогруп - Potom, Canicola,

	Величина ОГ зразка	Результат
1	Менша за 0,9xГЗ	негативний
2	0,9xГЗ — 1,1xГЗ	невизначений, сумнівний
3	1,11xГЗ — 3xГЗ	слабопозитивний
4	3,01xГЗ - 10xГЗ	позитивний
5	Більша за 10xГЗ	високопозитивний

Наприклад, для трьох лунок з негативним контролем (С1, D1 та E1) маємо значення ОГ, що дорівнюють 0,020, 0,022 та 0,018, відповідно. Тоді:

$$\text{ОГсер К} = 0,020$$

$$\text{ГЗ} = \text{ОГсер К} + 0,12 = 0,020 + 0,12 = 0,14$$

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ менше за 0,9 x ГЗ, наприклад, 0,9 x 0,14 = 0,126, її слід вважати негативною.

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ в інтервалі між 0,9-1,1 x ГЗ

(наприклад, 1,1 x 0,14 = 0,154), таку сироватку з ОГ в межах 0,126-0,154 слід вважати невизначеною, або сумнівною.

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ в інтервалі 1,11-3,0 x ГЗ

(0,155-0,420), така сироватка вважається слабопозитивною.

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ в інтервалі 3,01-10,0 x ГЗ

(0,421-1,4), така сироватка вважається позитивною.

Як виняток, ОГ можна визначати в одноквільшовому режимі (492 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно залишити порожню лунку при аналізі. При роботі в одноквільшовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

Облік результатів аналізу

- Розраховують середнє значення оптичної густини (ОГ) для лунки з негативним контролем (ОГсер К⁻) і позитивним контролем (ОГсер К⁺).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К⁻ не перевищує 0,1 оптичної одиниці (о.о.), а значення ОГсер К⁺ не нижче за 0,6 о.о.
- Якщо одне з трьох значень ОГ К⁻ перевищує 0,1 о.о. або більш як удвічі перевищує ОГсер К⁻, його відкидають, а ОГсер К⁻ розраховують за рештою значень ОГ К⁻.
- Граничне значення (ГЗ) ОГ. ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,12** до значення ОГсер К⁻.
- “Сіра зона” – це область значень ОГ, яка охоплює ГЗ та величини ОГ, менші за ГЗ на 10 %.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше за нижній рівень ОГ “сірої зони”.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка вище за ГЗ.
- Зразки з величинами ОГ, що лежать у межах “сірої зони”, вважаються **невизначеними**.
- Для більш достовірного обліку результатів і можливості порівнювати дані ІФА з результатами, які отримано за допомогою інших методів тестування, введено такі коефіцієнти:

Gripotyrphosa, Icterohepatitiae, Sejroe, Hebdomadis, Tarassovi) пришито до латексних часточок, суспендованих у гліциновому буфері. Як і в РМА, тварин вважають інфікованими, якщо виявлено позитивну реакцію при розведенні позитивної сироватки в титрі 1:50 у невакцинованих особин та в титрі 1:100 та вище – у вакцинованих.

На основі тих самих епідеміологічно актуальних серогруп у РФ (у НДІ епідеміології та мікробіології ім. М.Ф.Гамалєї, Москва) та в Білорусії (НДІ епідеміології та мікробіології, Мінськ) запропоновано діагностичні тести системи для виявлення антигену та антитіл у реакції непрямої імунофлуоресценції (РНІФ); антиген іммобілізовано на дні заглиблень у спеціальних предметних скельцях. Опрацьовано технологію отримання комплексного антигену з широким діапазоном внутрішньородових та внутрішньогрупових антигенних зв'язків. У науково-дослідній роботі з лептоспірами використовують іноді реакцію непрямої імунофлуоресценції (РНІФ)[15].

Крім того, в РФ (у НДІ епідеміології та мікробіології ім. М.Ф.Гамалєї, Москва) опрацьовано діагностичний набір “Амплітест Іер” на основі методу ампліфікації ДНК (полімеразної ланцюгової реакції, ПЛР). Як вважають автори [16], даний набір особливо потрібен при діагностиці захворювання на лептоспіроз у пролікованих осіб з ускладненими ураженнями центральної нервової системи. Звичайно поставити діагноз лептоспірозу в таких осіб за допомогою інших діагностичних підходів не вдається. Чутливість та специфічність пропонованого тесту не поступаються відповідним показникам набору, який продає (у декілька разів дорожче) швейцарська фірма “Hoffman LaRoche”, та дозволяє виявити 100 мікробних клітин/мл. Аналогічні за чутливістю тест-системи, опрацьовані за кордоном, базуються на ампліфікації генів,

що кодують 23S рРНК. В Канаді (Agriculture & Agri-Food, Alberta, Canada) опрацьовано тест-систему на основі ПЛР для діагностики лептоспірозу ВРХ при використанні клінічних зразків, таких як сеча, ниркова тканина, перикардіальна і/або перитонеальна рідина плоду. ПЛР може послужити прекрасною підмогою для діагностичної мети, але метод поки що занадто дорогий для масових досліджень у ветеринарії й медицині.

Найбільш поширені у сучасній лабораторній діагностиці методи імуноферментного аналізу (ІФА) порівняно мало застосовуються для виявлення протилептоспірних антитіл; їх опрацьовано в декількох модифікаціях і варіантах. Зокрема, не так давно в Інституті імені Адольфа Лютца в Сан-Паулу (Бразилія) запропоновано точкову, технічно спрощену напівкількісну модифікацію ІФА (dot-ELISA), призначену саме для виявлення протилептоспірних антитіл класу IgM. Запропонована тест-система добре себе зарекомендувала також при проведенні діагностичної роботи поза лабораторією, у польових умовах; як твердофазний носій застосували традиційну для такої мети нітроцелюлозу. Йй притаманна, як відомо, дуже висока сорбційна ємність у порівнянні з полістиролом та полівінілхлоридом, з яких звичайно виготовляють планшети для ІФА. Автори вказують, що дана модифікація важлива ще й з тієї точки зору, що в деяких хворих на лептоспіроз зовсім не з'являється антитіл класу IgG. Крім того, чутливість точкової модифікації ІФА виявилася вищою, ніж чутливість РМА, тому її застосування дозволяє виявити додатково лептоспірозу інфекцію у 38-43 % осіб на стадії гострої фази (IgM при лептоспірозі рано з'являються і довго зберігаються); при класичному ж підході (РМА) протилептоспірні антитіла в цих осіб виявилися значно пізніше. Таким чином, виявлення протилептоспірних антитіл при наявності клінічних ознак лептоспірозу

- Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином № 1, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату згідно з п. 1.2.
- У лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 37 °С у термостаті протягом 30 хвилин.
- Після закінчення інкубації видаляють розчин кон'югату з лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином № 1, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин проявника згідно з п. 1.3.
- Вносять у лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 18-22 °С у темряві протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 50 мкл стоп-реагенту.
- Не пізніше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину в лунках у двоохвильовому режимі (при 492 нм відносно 620 нм).

Цей розчин необхідно оберегати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин проявника повинен бути безбарвним.

2. Проведення імуноферментної реакції

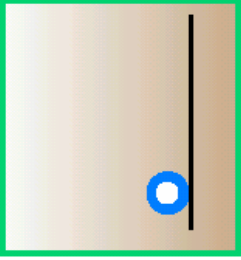
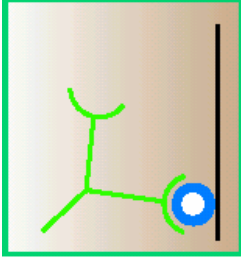
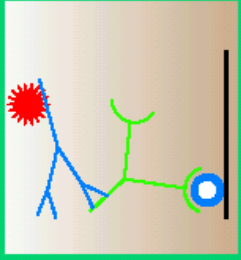
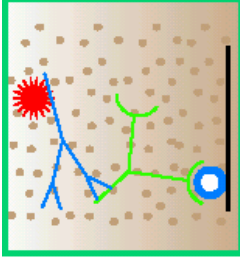
- Перед проведенням аналізу звільняють від упаковки необхідну кількість стрипів, вставляють їх у рамку. Стрипи, які не використовуються у даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8 °С протягом 1 місяця.
- Готують розчин № 1 згідно з п. 1.1.
- Вносять в усі лунки по 350 мкл розчину № 1, витримують стрипи залитими протягом 30-40 секунд та видаляють розчин за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- У кожную лунку стрипів вносять по 80 мкл розчину № 3 для розведення сироваток.
- В лунки стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- У дві лунки (A1, B1) вносять по 20 мкл позитивного контролю (K⁺), а в три інші (C1- E1) - по 20 мкл негативного контролю (K⁻). *При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.*
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.

дозволяє раніше почати до лікування і знизити можливість генералізованого захворювання. Однак в точкових модифікаціях ІФА використовуються антиген тільки одного актуального для даної місцевості серовару лептоспір, що значно звужує діагностичні можливості тест-системи.

Імуноферментну тест-систему для виявлення антитіл проти *L. interrogans* серовара Harjo в сироватках крові та молочі великої рогатої худоби виробляє фірма Curgress Diagnostics (Curgress). Ця тест-система базується на використанні полістиролових планшетів, в яких сорбовано незаражений антиген. Досліджувані сироватки й молоко попередньо розводяться (відповідно 1:200 та 1:4). Антитіла, що містяться в сироватках або молочі, зв'язуються з антигеном на носії. Такий комплекс потім виявляють за допомогою моноклонального кон'югату антивидових антитіл з пероксидазою хрому та проявника – суміші хромогену з субстратом.

На такому ж принципі створена імуноферментна тест-система виробництва НВК “Діапроф-Мед”. Однак як антигени тут використовуються 7 серогруп лептоспір, актуальних в Україні, а саме Romona, Tarassovi, Giprotyrphosa, Icterohemorrhagiae, Canicola, Kabuga, Polonica. Виділення, концентрування та інактивація лептоспірних антигенів запатентовані в Україні працівниками Українського інституту ветеринарної медицини УААН та НВК “Діапроф-Мед” [17,18]. Нижче приведено схема проведення ІФА для виявлення лептоспірних антитіл за допомогою тест-системи “ІФА-лептоспіроз-ВРХ”.

Схема проведення ІФА

Процедура	Формування комплексу
<p>Полістиролові стрипи, сенсibilізовані антигенами лептоспiр.</p>	
<p>Внесення в лунки стрипів по 80 мкл розчину для розведення зразків і по 20 мкл зразків контролів та досліджуваних сироваток. Інкубація протягом 60 хв. при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ). Промивання лунок буферним розчином (4 рази).</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату (формування комплексу з кон'югатом). Промивання лунок буферним розчином (6 разів).</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника перекису водню і хромогену) Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (поява забарвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація ОГ.</p>	

Проведення аналізу

1. Підготовка до аналізу (з розрахунку на 32 лунки)

Витримують компоненти набору при температурі 18-22 °С протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину № 1 для промивання планшетів

Вміст одного флакону з концентратом розчину № 1 інтенсивно потрушують. Відбирають 8 мл розчину і розводять його в 350 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37 °С до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8 °С не більш як 5 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

У чистий флакон відбирають 4 мл розчину № 4 для розведення кон'югату та додають 80 мкл кон'югату (50-кратного концентрату). Вміст флакона ретельно перемішують, не допускаючи утворення піни.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування розчину проявника

В чистий флакон вносять таблетку хромогену (ОФД) і додають 9 мл дистильованої води, інтенсивно потрушують і залишають флакон у темряві до повного розчинення хромогену. Безпосередньо перед внесенням в лунки стрипів до розчину хромогену додають 3 мл концентрату розчину № 5Ф для приготування проявника; суміш інтенсивно потрушують.

Розчин проявника готують безпосередньо перед використанням.

- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшетів:

- неякісне промивання планшета призводить до некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач – вошер; при відсутності чи поганій роботі вошера лунки можна промивати за допомогою 8-канальної піпетки;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись вщерть (350 мкл промивної рідини в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

Підготовка зразків

Зразки сироваток зберігають при температурі 2-8 °С протягом 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури, нижчої за 20 °С) не більш як двічі. Зразки сироваток, які містять агрегати та осад, необхідно освітлювати за допомогою центрифугування.

Зразки, де помітні гемоліз, гіперліпідемія або бактеріальне забруднення (прорости), а також зразки, куди додано як консервант азид натрію, не годяться для аналізу.

Методика проведення імуноферментного аналізу при використанні тест-системи «ІФА-лептоспіроз-ВРХ»

«ІФА-лептоспіроз-ВРХ» тест-система імуноферментна для визначення протилептоспірних антитіл в сироватці крові великої рогатої худоби.

Призначення набору

Набір призначено для аналізу сироватки крові великої рогатої худоби на наявність протилептоспірних антитіл методом імуноферментного аналізу.

Принцип аналізу

Головні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані очищеними антигенами патогенних лептоспір. Імуноферментний кон'югат – моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу IgG великої рогатої худоби, кон'юговані з пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток специфічні антитіла проти патогенних лептоспір, що містяться в сироватці, зв'язуються з антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного імуноферментного кон'югату. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника – субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген (ортофенілдіамін – ОФД). Пероксидазну реакцію зупиняють, додавши стоп-реагент (2 М розчин сірчаної кислоти), і вимірюють оптичну густину (ОГ) суміші у лунках, яка при довжині хвилі 492 нм пропорційна концентрації специфічних антитіл у досліджуваних зразках сироваток крові.

Склад набору

N	Назва компонента	Кількість
1	Концентрат розчину № 1 для промивання планшета	1 фл., 25 мл
2	Імуносорбент	1 планшет
3	Розчин № 3 для розведення сироваток	1 фл., 15 мл
4	Розчин № 4 для розведення кон'югату	1 фл., 15 мл
5	Концентрат розчину № 5Ф для приготування проявника	1 фл., 12 мл
6	Хромоген ОФД	3 табл.
7	Кон'югат імуноферментний	1 амп., 0,5 мл
8	Позитивний контроль (K ⁺)	1 амп., 0,15 мл
9	Негативний контроль (K ⁻)	1 амп., 0,3 мл
10	Стоп-реагент	1 фл., 8 мл
11	Клейка плівка	3 шт.

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перепис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гіроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реактивів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат на 37°С;
- апарат для промивання планшетів (вошер);

- фотометр для вимірювання оптичної густини у планшеті;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливання відпрацьованих забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі використані розчини обробляти 6 % розчином перепису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати у спеціальний контейнер, стерилізувати його в автоклаві протягом 1 години при температурі 120 °С;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати для приготування реагентів чисто вимитий посуд, сполоснутий дистильованою водою;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;