

Національна Академія наук України
Технологічний парк ІМК
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

**ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК
З ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ**

Київ-2005

УДК 616.98-07:578.826.6

“Практичний посібник з імуноферментного аналізу”

Автори: Іванська Н.В., Кислих О.М., Максименок О.В.,
Сергеева Т.А., Раєвська Г.Є., Пилипенко В.Г.

Під редакцією професорів А.Л.Гураля та М.Я.
Співака

Для діагностики різних інфекційних захворювань, для виявлення специфічних антигенів та антитіл у біологічних рідинах (плазма та сироватка крові, сеча, слина, молоко тощо) широко застосовують метод імуноферментного аналізу, який став надійним помічником лікарів-лаборантів медичних та ветеринарних закладів. Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”, використовуючи новітні досягнення генної інженерії, молекулярної біології, гібридомної технології та імунобіотехнології, опрацювала повний цикл виробництва імуноферментних тест-систем для діагностики інфекційних захворювань людини та сільськогосподарських тварин і нині випускає такі тест-системи.

Для лікарів, вірусологів, імунологів, мікробіологів, лабораторних працівників, студентів вищих учбових закладів та аспірантів.

Київ, 2005

Скорочення, використані в тексті посібника:

- АБТС – 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота;
- АГ – антиген;
- АТ – антитіло;
- ГЗ – граничне значення (показника оптичної густини);
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- К⁺ – позитивна контрольна проба;
- К⁻ – негативна контрольна проба;
- НПЗ – негативне прогнозоване значення;
- ОГ – оптична густина;
- ОГ сер К⁻ – середнє значення оптичної густини для проб негативного контролю;
- ОГ сер К⁺ – середнє значення оптичної густини для проб позитивного контролю;
- ОФД – ортофенілендіамін (*o*-фенілендіамін);
- ППЗ – позитивне прогнозоване значення;
- РА – радіоімунний аналіз;
- ТІФА – твердофазний імуноферментний аналіз;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;
- CV – coefficient of variation, коефіцієнт варіації;
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз, ТІФА;
- HBcAg (core antigen of the hepatitis B virus) – серцевинний (“коровий”) антиген вірусу гепатиту В;
- HBsAg (surface antigen of the hepatitis B virus) – поверхневий антиген вірусу гепатиту В;
- IR (initial reactive serum) – первинно-реактивна сироватка;
- RR (repeat reactive serum) – повторно-реактивна сироватка;
- U.S.A. FDA (U.S.A. Food and Drug Administration) – Агенція США з питань продовольства та медикаментів.

Вступ

Останнім часом для діагностики різних захворювань все ширше застосовують імуноферментні тест-системи. У багатьох клінічних лабораторіях, санітарно-епідеміологічних станціях, станціях переливання крові, ветеринарних установах успішно використовують імуноферментний аналіз (ІФА). Він стає повсякденним методом виявлення специфічних антигенів та антитіл у біологічних рідинах (сироватці крові, сечі, слині, спинномозковій рідині, молоці тощо).

Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед” – це підприємство, яке використовує новітні досягнення біотехнології для виробництва діагностичних імуноферментних тест-систем медичного та ветеринарного призначення. У практиці науково-виробничої діяльності підприємства широко застосовуються сучасні методи імунології, генної інженерії, біотехнології. Сьогодні рівень розвитку наукової та виробничої бази компанії “Діапроф-Мед” дає змогу здійснювати замкнений цикл виробництва – від створення генно-інженерних конструкцій для отримання рекомбінантних білків, що використовуються як антигени, моноклональних антитіл і кон’югатів, до поставок готових імуноферментних тест-систем споживачам.

На підприємстві розроблені та виробляються біля 20 тест-систем медичного призначення для діагностики ВІЛ-інфекції, гепатитів В та С, сифілісу, хламідіозу, комплексу TORCH-інфекцій (ЦМВ, червонички (краснухи) та простого герпесу першого та другого типів) і чотири тест-системи ветеринарного призначення для діагностики лептоспірозу, туберкульозу, бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ).

Підприємство “Діапроф-Мед” – це колектив висококваліфікованих фахівців, мета яких – становлення та розвиток вітчизняної біотехнології для потреб охорони здоров’я та сільського господарства. На підприємстві організовано систему підготовки лабораторних співробітників України в галузі імуноферментної діагностики. З 1997 р. проведено 23 науково-практичних семінари як на базі НВК “Діапроф-Мед”, так і в ряді областей України. В роботі семінарів взяли участь більш як 500 лікарів-лаборантів.

Даний практичний посібник з імуноферментного аналізу розпочинає серію публікацій методичних рекомендацій. Цей матеріал опрацьовано з метою систематизувати та розширити знання у галузі імуноферментного аналізу, уникнути помилок при проведенні

досліджень, оцінити достовірність отриманих результатів після постановки імуноферментної реакції.

Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ІФА) виник на пограниччі двох наук – імунохімії й інженерної ензимології та став одним з найпоширеніших методів дослідження.

Завдяки успіхам біотехнології та генної інженерії вдається одержувати високоочищені білки-антигени, різноманітні полі- та моноклональні антитіла заданої специфічності та афінності, ферменти-маркери та кон'югати ферментів з антигенами та антитілами.

Увесь процес імуноферментного аналізу можна розділити на три основних стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло (імунохімічний процес), введення в нього (приєднання до нього) мітки та її виявлення (візуалізація).

Найпоширеніший нині твердофазний метод ІФА (ELISA, тобто enzyme-linked immunosorbent assay, ТІФА) розроблено вперше у 1971 р. [1]. В основі його лежать принципи, застосовувані раніше у радіоімуному аналізі (RIA), де використовують радіоактивні мітки; у випадку ІФА замість радіоактивної використовують ферментну мітку. Ферменти, застосовувані в ІФА, характеризуються тривалим періодом напівінактивації (при 4 °С вони зберігаються більш як 12 місяців); зрозуміло, що вони не створюють радіаційної небезпеки, дають можливість отримувати кількісні та візуальні якісні тести для масового аналізу зразків.

ІФА нині найпоширеніший завдяки ряду безперечних переваг. До них відносять високу чутливість, специфічність та відтворюваність результатів, можливість використання мінімальних об'ємів досліджуваних зразків біологічних рідин, доступність та стабільність реагентів, простоту та швидкість проведення реакції, інструментальний облік кінцевих результатів та автоматизацію майже всіх етапів ІФА, можливість проведення масових аналізів і, не в останню чергу, відносно низьку вартість діагностичних наборів. Слід зазначити, що хоча існує декілька варіантів ІФА (прямий, непрямий, конкурентний, "сандвіч"), в усіх них використовують кон'югат ферменту зі специфічними або антивидовими антитілами чи антигенами та проявник (суміш субстрату з хромогеном); в результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється. Це дає змогу візуально або

автоматично оцінювати наявність антигенів або антитіл в досліджуваному матеріалі.

Термінологія

Антиген (“імуноген”) – речовина, що викликає виникнення специфічної імунної відповіді та специфічно реагує з антитілами, які виникають при введенні антигену в організм.

Антитіло – складна природна сполука (глікозильований поліпептид – імуноглобулін), яка виникає як результат імунної відповіді організму при введенні в організм чи потраплянні в нього чужорідних речовин, а також збудників інфекційних хвороб, різноманітних паразитів тощо.

Кон’югат – штучна молекула, що складається принаймні з двох хімічно об’єднаних компонентів, часто різного походження; для проведення ІФА звичайно використовують кон’югати, які містять ферментну (чи іншу) мітку, пришиту до антигену (антигенів), антитіл чи білку *A Staphylococcus aureus*.

Проявник – суміш ферментного субстрату з хромогеном, яка служить для виявлення (проявлення) імуноферментної реакції; в результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється.

Субстрат – речовина, на яку специфічно направлена дія ферменту. В результаті взаємодії ферменту з субстратом виникає продукт реакції.

Хромоген (у контексті нашого викладу) – речовина, звичайно безбарвна (лейкоформа), але здатна давати кольорову сполуку (хромоформу) в результаті взаємодії з продуктом, який виникає при ферментативній реакції.

Імуноферментний аналіз для виявлення антитіл

Виявлення специфічних антитіл у фізіологічних рідинах відіграє важливу роль у клінічній діагностиці широкого кола захворювань як інфекційного, так і аутоімунного характеру. Завдяки опрацюванню ІФА з’явилася можливість кількісно визначати антитіла в широкому діапазоні концентрацій із використанням лише одного розведення сироватки або плазми. ІФА дозволяє також легко розрізнити за

активністю антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів. Об'єктивність якісних та кількісних оцінок забезпечується інструментальною фотометрією; при цьому інтенсивність реєстрованих сигналів безпосередньо корелює з рівнем визначених антитіл. При правильному доборі відповідного специфічного антигену, що зв'язується з носієм, та оптимального кон'югату з ферментною міткою можна створити системи тестування дуже багатьох різноманітних антитіл.

На сьогодні для визначення антитіл найчастіше застосовують непрямий варіант ТІФА та “сандвіч-метод”. При непрямому ТІФА на тверду фазу сорбують АГ, а потім вносять у реакційну суміш досліджуваній матеріал, що містить специфічні АТ. Після інкубації та відмивання незв'язаних компонентів в лунки додають противидові антитіла, мічені ферментом (АТ*). Внаслідок реакції утворюється потрійний комплекс АГ1-АТ1-АТ2*, який потім візуалізується шляхом ферментативної реакції після додавання проявника.

“Сандвіч-метод” (іноді його називають також “подвійним антигенним сандвічем”) базується на застосуванні однакових антигенів (або різних імунодомінантних антигенів того самого збудника) – немічених (у складі сорбенту) та мічених ферментом (у складі кон'югату). Внаслідок реакції виникає потрійний комплекс АГ-АТ-АТ*, який потім візуалізується шляхом ферментативної реакції після внесення проявника.

Імуноферментний аналіз для виявлення антигенів

Можливі різні варіанти ТІФА. 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, що конкурує за обмежену кількість наявних місць специфічного зв'язування).

Визначення антигенів при застосуванні конкурентного ТІФА проводять таким чином. Антитіла проти певного антигену іммобілізуються на твердій фазі. Досліджуваній матеріал, де може бути присутній шуканий антиген (наприклад, сеча, сироватка крові,

спинномозкова рідина), вносять в 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 буде інтенсивність забарвлення.

Найбільш розповсюджений, чутливий та специфічний варіант ІФА для виявлення антигенів – це так званий «сандвіч»-метод. 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 зразку прямо пропорційне концентрації антигену.

Імуносорбенти

У тест-системах на основі ТІФА застосовують імуносорбенти, тобто тверду фазу (найчастіше полістиролові), із нанесеними на неї антигенами або антитілами. Білки, використані для приготування імуносорбенту, багато в чому визначають чутливість і специфічність імуноферментної тест-системи. Як антигени використовують лізати очищених віріонів, бактерій, окремі фракції білків, виділених з клітин, де культивували інфекційний агент, а також синтетичні специфічні пептиди та рекомбінантні поліпептиди. Сьогодні як антигени для ІФА все частіше використовуються синтетичні пептиди та рекомбінантні білки.

Рекомбінантні, як і синтетичні антигени, включають звичайно антигенні детермінанти (епітопи) природних антигенів. Використання рекомбінантних білків та синтетичних пептидів має ту перевагу, що працювати з ними набагато безпечніше (отримуючи антиген, персонал не контактує з інфекційним агентом); спрощується процедура очищення і підвищується чистота антигену, а, значить, і специфічність тест-системи [3]. При створенні рекомбінантних білків можна одержувати так звані злиті (сполучені, "складані") антигени, що містять ковалентно пов'язані фрагменти амінокислотних послідовностей різних білків або ділянок одного білку, розміщених на різних епітопах; можна також вносити в лунки планшету точно дозовані кількості різних білків.

Технологія одержання рекомбінантних білків дозволяє отримати достатньо очищений аналог будь-якого антигену. Для створення високоякісної тест-системи на основі рекомбінантних сполук необхідно з великої кількості наявних антигенів збудника вибрати такі, що характеризувалися б високою імуногенністю, тобто здатністю викликати утворення значної кількості антитіл в організмі інфікованої людини або тварини. Бажано, щоб такі антитіла були присутні у крові хворого протягом усього захворювання. Обрані антигени мають бути високоспецифічні, характерні лише для даного збудника і не давати перехресних реакцій з антитілами проти інших збудників.

Крім того, велике значення для специфічності та чутливості реакції має ступінь очистки рекомбінантних білків від домішок.

Твердофазні носії

Один з найважливіших компонентів систем на основі ТІФА – це носій, на поверхні якого відбувається перебіг реакцій. Носії, що використовуються в ТІФА, повинні відповідати ряду вимог, обумовлених специфікою методу; йдеться насамперед про:

- нерозчинність носія в умовах проведення аналізу;
- достатню сорбційну ємність (її визначає кількість іммобілізованого білку на одиницю маси чи площі поверхні носія);
- мінімальна здатність до неспецифічного зв'язування;
- міцне зв'язування білків та стабільність препарату при зв'язуванні;
- зручність носія для аналізу в методичному плані, зокрема, можливість його застосовувати для автоматизованих методів;
- однорідність сорбційної ємності на всій поверхні носія, що гарантує відтворюваність отримуваних результатів [4].

Деякі носії відповідають цим вимогам. Для іммобілізації антигенів та антитіл в ТІФА застосовують синтетичні полімери – полістирол, поліпропілен, полівініл, дакрил та ін. Найзручнішими для роботи виявились планшети з полістиролу на 96 лунок. Вони дають змогу одночасно аналізувати велику кількість зразків, використовувати невелику кількість діагностичних препаратів; їх

легко промивати; для внесення зразків та реагентів на планшети застосовують автоматичні дозатори.

Зв'язування імунореагентів з твердою фазою досягається двома основними шляхами:

- по-перше, за рахунок пасивної сорбції, яка відбувається завдяки гідрофобним, донорно-акцепторним взаємодіям чи водневим зв'язкам. Зв'язування залежить від концентрації білку, рН, іонної сили, складу розчину, температури та властивостей самого носія, що суттєво впливає на точність та відтворюваність результатів ТІФА;
- по-друге, методом ковалентного зв'язування, який базується на тому, що реакційно здатні гідроксильні, амідні чи карбоксильні групи твердої фази ковалентно зв'язуються зі специфічним реагентом.

Як твердофазний носій у тест-системах найчастіше використовують полістиролові мікропланшети з плоским дном із задалегідь визначеною сорбційною ємністю. Звичайно це або монолітні планшети з 96 лунками, або стрипи (тобто окремі ряди планшету), які містять 8, 12 чи 16 лунок. Зараз для виробництва тест-систем на підприємстві “Діапроф-Мед” використовують планшети виробництва фірми Nunc (Данія), які за своєю сорбційною ємністю поділяються на PolySorp, MediSorp та MaxiSorp.

Пластик MaxiSorp має підвищену сорбційну ємність завдяки тому, що поверхню його спеціально оброблено; на ній можна сорбувати білки та інші молекули, що містять як гідрофільні, так і гідрофобні ділянки, наприклад, антитіла. Теоретично підраховано, що цей тип пластику може максимально зв'язати 650 нг/см^2 білку. Планшети типу MediSorp з сорбційною ємністю 400 нг/см^2 теж призначені для зв'язування білків, що мають і гідрофільні, і гідрофобні ділянки; зокрема, ці планшети рекомендують для сорбування імуноглобулінів класу G. У планшетів типу PolySorp сорбційна ємність менша та теоретично не перевищує 220 нг/см^2 . На поверхні планшетів типу PolySorp добре зв'язуються гідрофобні білки [5].

Відмінності в сорбційній ємності обумовлені складом носія та технологією його виробництва. Відрізняються один від одного не тільки планшети різних типів; сорбційна ємність часом значно коливається у межах одного типу; можуть бути відхилення поміж

лунками одного планшета, яка впливає на відтворюваність результатів ТІФА (див. нижче).

Імобілізація антигенів або антитіл

При вивченні процесу сорбції необхідно розрізнити як сорбційну здатність внесених речовин, так і сорбційну ємність носія. Перша обумовлена просторовою структурою молекули, яка, в свою чергу, залежить від природи речовини (білку, вуглевода, ліпопротеїну тощо), рН, іонної сили буфера, на якому розводять антигени або антитіла (найчастіше використовують карбонатний буфер, рН 9,6, якщо він не змінює конформації засорбованих молекул); концентрації і ступеню чистоти матеріалів, що сорбують у лунки планшета; часу і температури інкубації, а також від способів висушування та герметичності пакування (запаювання) планшетів.

Зв'язування матеріалу з твердою фазою досягають шляхом «пасивної» сорбції: розчин відповідного антигену або антитіл вносять у лунки планшета на декілька годин. При цьому зв'язування матеріалу з поверхнею носія забезпечується завдяки гідрофобним взаємодіям. Після такого нанесення надлишок внесеного матеріалу видаляють; у деяких випадках, для запобігання наступного неспецифічного зв'язування, планшети обробляють блокувальними розчинами. Зв'язування білку з носієм залежить від концентрації сорбованого білку. Оптимальна концентрація білку для покривання твердої фази складає 1-10 мкг/мл [6].

Доля речовини, що зв'язується з носієм, безпосередньо залежить від часу і температури, при якій відбувається сорбція. Так, за однаковий час при температурі 37 °С на поверхні полістиролу зв'язується приблизно вдвічі більше білку, ніж при 4 °С. Крім того, якщо сорбція триває всього лише три години, то рівень її досягає лише 80 % від максимального значення, що спостерігається після 18-24 год інкубації.

Кон'югати, використовувані в ІФА

Кон'югати у широкому значенні цього слова – це штучні структури, отримані внаслідок хімічного зшивання двох чи більше різних молекул. Для проведення ІФА застосовують кон'югати, які

містять антиген або антитіла, звичайно противидові, та фермент. Іноді замість противидових антитіл використовують А-білок золотистого стафілокока, що зв'язується з Fc-фрагментом першого антитіла в утвореному комплексі.

Для ковалентного пришивання індикаторного ферменту до антитіл запропоновано декілька різноманітних методик.

Сьогодні найчастіше використовують метод періодатного окислення з різноманітними модифікаціями; даний метод придатний для ферментів, що містять вуглеводні залишки, таких як пероксидаза.

В останні роки для підвищення чутливості ІФА розроблено метод молекулярного підсилення ферментативної реакції на основі біотин-стрептавідинової взаємодії, де поряд з біотинільованими специфічними антитілами використовують пероксидазний кон'югат стрептавідину.

Порівняно висока стабільність імуноферментного кон'югату належить до найважливіших переваг методів ІФА над радіоімунним аналізом. У присутності стабілізаторів кон'югати здатні зберігати свою активність протягом 1-2 років.

Важлива умова успішного проведення ІФА – відповідна концентрація кон'югату. Визначення оптимальної концентрації кон'югату при створенні тест-системи – одне з основних завдань виробництва. При занадто високій концентрації кон'югату спостерігається його надлишкове неспецифічне зв'язування з носієм, і тоді значно підвищуються значення ОГ, включаючи й підвищення фону. При занадто низьких концентраціях кон'югату чутливість аналізу може помітно знижуватися в результаті уповільненого перетворення субстрату на продукт [7].

Субстрати та хромогени

Один з основних біологічних феноменів, на якому базується ІФА – висока каталітична активність ферментів, які використовуються в ІФА як індикатори. До ферментів, що застосовуються для мічення, пред'являється ряд загальних вимог. Ці ферменти повинні:

а) мати значну питому каталітичну активність, що дозволяє виявляти ферментативну мітку в низьких концентраціях;

б) бути доступними у достатньо очищеній формі та зберігати високу ферментативну активність після хімічної модифікації при отриманні кон'югату з антитілами або антигенами;

в) бути стабільними за оптимальних умов взаємодії антигену з антитілом;

г) кількісно визначатися за допомогою простих та чутливих методів [8].

Оскільки фермент взаємодіє з субстратом специфічно, вибір субстрату та хромогену залежить від ферменту-мітки. Основні вимоги до субстрату – забезпечення чутливості методу при виявленні ферменту, що входить до складу кон'югату; використаний хромоген має забезпечити утворення яскраво забарвлених продуктів реакції фермент-субстрат. Проявник (суміш субстрату з хромогеном) при роботі на планшетах має давати повністю розчинні продукти з високим коефіцієнтом поглинання (екстинкції), тобто високу інтенсивність забарвлення на одиницю використаного субстрату.

Через це найчастіше в ІФА використовують ферменти - пероксидазу хрому, лужну фосфатазу та β -D-галактозидазу. У всіх трьох випадках концентрації продуктів визначаються на рівні пікомолів (10^{-12}). Лужна фосфатаза та її кон'югати мають високу стабільність та низький поріг виявлення, однак цей фермент досить дорогий. Зрідка в комерційних тест-системах на основі ІФА використовують також β -D-галактозидазу. Найчастіше до складу кон'югатів входить пероксидаза хрому.

Субстратом для пероксидази служить перекис водню. Фермент містить легко окислювані періодатом вуглеводні залишки, через які фермент пришивається до антитіл (або антигенів). Реєструвати активність ферменту в аналізі можна фотометричним, флуориметричним (індикаторна система – п-оксифенілпропіонова кислота), хемілюмінесцентним (індикаторна система – H_2O_2 , люмінол, п-йодфенол) та електрохімічним методом. При кількісному фотометричному визначенні продукту, який утворюється під дією пероксидази, до складу проявника вносять речовини (хромогени), що утворюють кольорові сполуки під впливом атомарного кисню, вивільненого ферментом з перекису водню. Серед таких речовин слід назвати ортофенілєндіамін (ОФД), тетраметилбензидин (ТМБ), 2,2'-

азино-біс(-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота) (АБТС), діамонійну сіль цієї сполуки та інші.

Продукт окислення ОФД максимально поглинає світло при 435 нм. Але при додаванні в реакційну суміш сірчаної кислоти для зупинки реакції максимум спектру поглинання зсувається на 50 нм в довгохвильову область, тому реєстрацію ОГ проводять при 492 нм.

У ТІФА широкого застосування набув хромоген ТМБ, оскільки його метаболіти в порівнянні з іншими хромогенами не проявляють мутагенної та канцерогенної дії. Блакитне забарвлення, що розвивається в результаті реакції, добре контрастує з фоном та дозволяє досягти високої чутливості аналізу в тих випадках, коли облік результатів проводять візуально. Після додавання у реакційну суміш стоп-реагенту блакитний колір змінюється на жовтий. ОГ кольорових продуктів з використанням ТМБ визначають при довжині хвилі 450 нм

Хромоген АБТС в присутності пероксидази та перекису водню утворює стабільний катіон-радикал, що надає розчиніві зелено-блакитного забарвлення. Основними перевагами АБТС над іншими хромогенами є можливість проводити реакцію при освітленні та не зупиняти ферментативної реакції. Вимірювання ОГ здійснюють при довжині хвилі 405-414 нм [9].

Облік результатів ІФА, як вже зазначалось, можна провести візуальним та інструментальними методами, хоча до візуальної оцінки вдаватися вкрай не бажано. При крайній необхідності (при відсутності ридера) слід впевнитися, що інтенсивність забарвлення у реакції між усіма позитивними та негативними зразками чітко й суттєво відрізняється.

Більш інформативні результати отримують при інструментальній реєстрації ОГ. У цьому випадку необхідно постійно калібрувати ридери (спектрофотометри) – пристрої, що вимірюють ОГ кольорових продуктів реакції. Щоб не вдаватися до постійного калібрування приладів, можна проводити вимірювання величини ОГ при двох довжинах хвиль – основній, при якій сумарно реєструються ОГ забарвлених сполук та полістиролу, та референс-хвилі, коли реєструється лише ОГ полістиролу. Істинний результат отримують, віднявши друге значення ОГ від першого.

Більшість сучасних ридерів автоматично здійснюють цю операцію, якщо ОГ продуктів реакції визначають при двох довжинах хвиль.

Типи імуноферментних тест-систем

Сучасні тест-системи базуються на численних модифікаціях ТІФА з використанням різноманітних схем проведення реакції та великого розмаїття кон'югатів.

У найперших запропонованих комерційних тест-системах для визначення антитіл проти збудників інфекційних захворювань (і від таких систем поки що повністю не відмовились) на твердій фазі засорбовують природні антигени, отримані з лізатів очищених вірусів і бактерій, а також окремі фракції специфічних білків, виділених із заражених клітин. Як імуноферментний кон'югат беруть антивидові антитіла, мічені ферментом.

Недоліки таких тест-систем – використання небезпечних інфекційних матеріалів як антигенів; це ускладнює виробництво тест-систем, бо доводиться культивувати, вирощувати та знезаражувати віруси чи бактерії. На підприємстві НВК “Діапроф-Мед” виробляють тест-системи такого типу (на основі природних антигенів) для визначення IgG людини проти збудника токсоплазмозу (DIA-Toxo-IgG), вірусу червонички (DIA-Rubella-IgG). На цьому принципі базуються також деякі тест-системи ветеринарного призначення для виявлення антитіл проти збудників лептоспірозу, бруцельозу, туберкульозу в сироватках крові та молоці ВРХ. На рисунку 1 подано принципову схему такої модифікації ІФА.

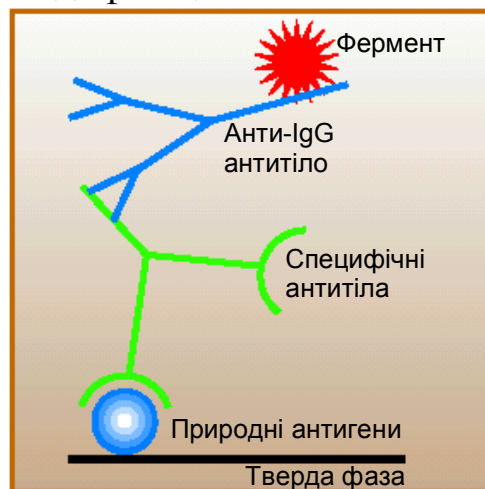


Рис. 1

Наступним етапом розвитку ІФА тест-систем стало використання замість природних білків рекомбінантних антигенів. На рисунку 2 показано принципову схему ІФА з рекомбінантними антигенами в складі імуносорбенту, схожу на попередню.

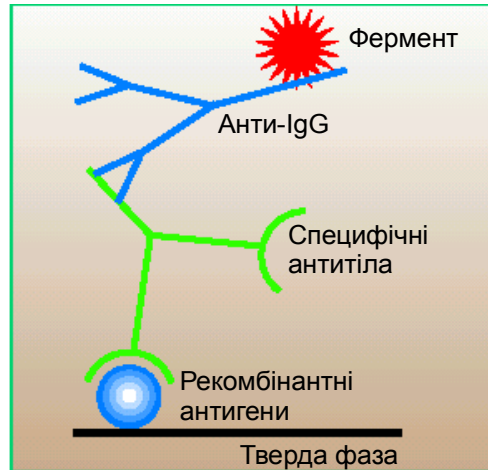


Рис. 2.

На НВК “Діапроф-Мед” випускається ряд тест-систем на основі рекомбінантних антигенів; ці системи призначені для виявлення антитіл проти вірусів гепатиту В (DIA-HBscore) та гепатиту С (DIA-HCV), герпесу 1 і 2 типів (DIA-HSV $\frac{1}{2}$), лейкозу ВРХ (DIA-BLV-Ab), цитомегаловірусу (DIA-CMV-IgG), збудників хламідіозу (DIA-Chlamydia) та сифілісу (DIA-Trep). Такі тест-набори безпечніші при виготовленні та роботі з ними. На схемі 1 приведена методика проведення аналізу на тест-системі „DIA-HCV”.

При подальшому вдосконаленні тест-систем рекомбінантні та синтетичні антигени не лише сорбують на твердій фазі, але й вводять до складу кон’югату, пришивши їх до ферменту замість антивидових антитіл. Це дає змогу одночасно виявляти імуноглобуліни класів А, М, G, підвищити чутливість та специфічність тест-системи. На рисунку 3 представлено принципову схему ІФА при роботі з такою тест-системою.

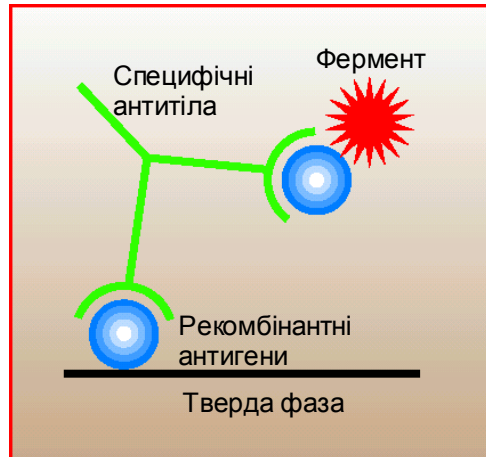


Рис. 3

Компанія “Діапроф-Мед” випускає тест-системи з рекомбінантними антигенами у складі кон’югату для виявлення антитіл проти вірусу імунодефіциту людини (“DIA-HIV 1/2”) та збудників сифілісу (“DIA-SYPH”). На схемі 2 приведена методика проведення аналізу на тест-системі „DIA-HIV 1/2”.

Для визначення антигенів частіше використовують „сандвіч”-варіант ІФА, принципову схему якого подано на рисунку 4.

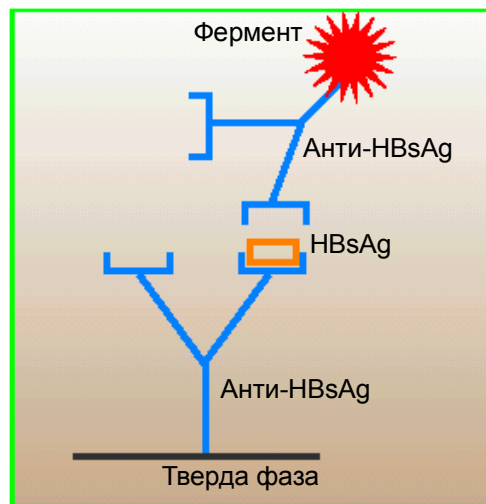


Рис. 4

У цьому варіанті на тверду фазу сорбують антитіла проти досліджуваного антигену (частіше моноклональні антитіла), а як кон’югат використовують полі- або моноклональні антитіла, мічені ферментом. За цим принципом створено тест-система для визначення

HBsAg вірусу гепатиту В (DIA-HBV). На схемі 3 приведена методика проведення аналізу на тест-системі „DIA-HBV”.

Для визначення антигену р24 ВІЛ (DIA-HIV-p24) також застосовують „сандвіч”-варіант ІФА, але для підвищення чутливості використовують метод молекулярного підсилення на основі біотин-стрептавідинової взаємодії, де поряд з біотинільованими антитілами проти ВІЛ використовують пероксидазний кон’югат стрептавідину. Імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibiliзовані моноклональними антитілами до р24 ВІЛ-1; кон’югат №1 – кролячі поліклональні афіноочищені біотинильовані антитіла до білку р24 і кон’югат №2 – стрептавідин, кон’югований з ферментом пероксидазою хрому. На схемі 4 показано принцип проведення аналізу на тест-системі „DIA-HIV-p24”.

Для визначення імуноглобулінів класу М розроблено модифікацію ІФА, так звану “IgM-пастку”, схему якої представлено на рисунку 5.

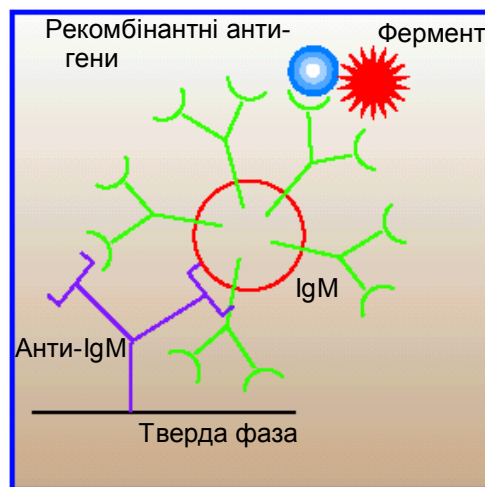


Рис.5

Моно- або поліклональні антитіла проти імуноглобулінів класу М сорбують на полістиролових планшетах. Досліджуваний матеріал, в якому шукають антитіла класу IgM проти певного збудника, інкубують з анти-IgM на твердій фазі, після відмивання додають мічені пероксидазою хрому рекомбінантні білки-аналогі поверхневих антигенів даного збудника. На цьому принципі базуються такі тест-системи НВК “Діапроф-Мед”, як “DIA-IgM-SYPH”, “DIA-HSV1/2-

IgM”, “DIA-Toxo-IgM” та “DIA-Rubella-IgM”. На схемі 5 показано принцип проведення аналізу на тест-системі „DIA-Toxo-IgM”.

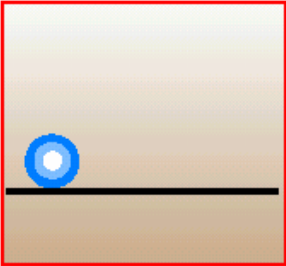
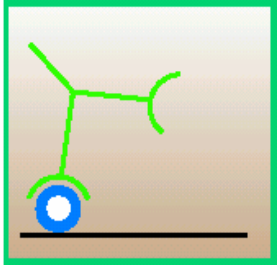
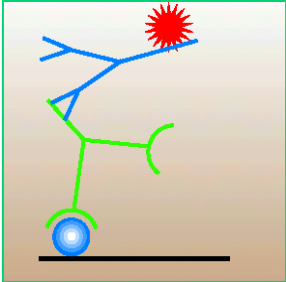
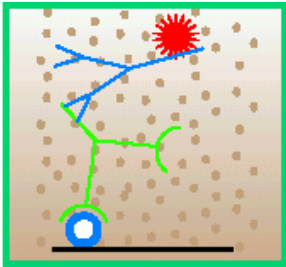
На сучасному етапі розроблено і впроваджено для діагностики ВІЛ-інфекції – модифікацію ІФА за принципом одночасного визначення специфічних антитіл та антигену в сироватці крові (DIA-HIV-Ab/Ag). Такий аналіз виявляє ВІЛ-інфекцію на 4-8 днів раніше, ніж інші тест-системи з рекомбінантними антигенами у складі кон’югату.

Характерною особливістю тест-системи є використання рекомбінантних білків-аналогів оболонкових антигенів ВІЛ-1 і ВІЛ-2 - env1 (gp120, gp41) та env2 (gp36), відповідно. Для виявлення корового антигену ВІЛ – p24 застосовуються моноклональні антитіла до p24 (в складі імуносорбенту) та біотинільовані поліклональні афінноочищені антитіла до антигену p24 (антитіла детекції).

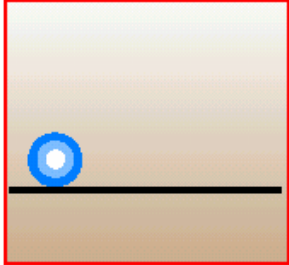
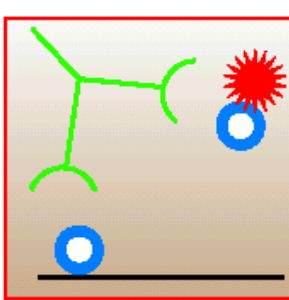
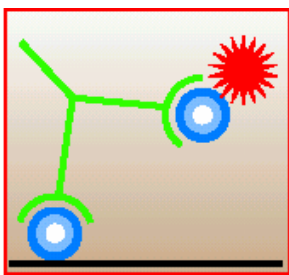
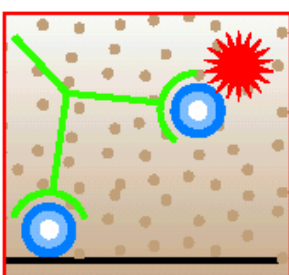
Для визначення антигену p24 в цієї тест-системі застосовано метод молекулярного підсилення на основі біотин-стрептавідинової взаємодії, де поряд з біотинільованими антитілами використовуються пероксидазний кон’югат стрептавідину. Анти-ВІЛ специфічні антитіла виявляють за принципом “сендвіч”-варіанту ІФА, де Fab-фрагменти анти-ВІЛ специфічних антитіл зв’язуються як з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, так і з антигенами в складі імуноферментного кон’югату. На схемі 6 показано принцип проведення аналізу на тест-системі „DIA-HIV-Ab/Ag”.

Є ще багато модифікацій ІФА; тут ми згадали ті лише, на яких базуються діагностичні тест-системи НВК “Діапроф-Мед”. Далі буде представлено більш детальні схеми проведення ІФА, вказано, яке обладнання потрібне для роботи, та обговорено помилки, можливі при проведенні аналізу та обліку результатів.

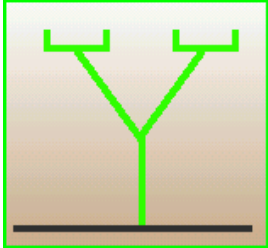
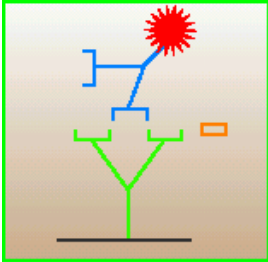
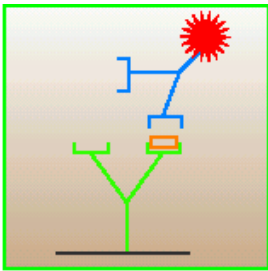
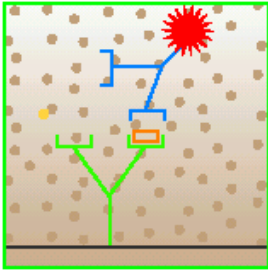
**Схема 1. Проведення ІФА на прикладі
тест-системи “DIA-HCV”
Етапи проведення аналізу**

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані рекомбінантними білками	
Внесення в лунки по 80 мкл розчину для розведення зразків і по 20 мкл зразків контролів і сироваток. Інкубація 60 хв. при 37 °С – формування комплексу АГ-АТ. Промивання лунок 4 рази буферним розчином.	
Внесення в лунки розчину кон'югату. Інкубація 30 хв. при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ- кон'югат). Промивання 6 разів буферним розчином.	
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація оптичної густини.	

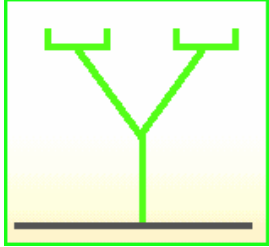
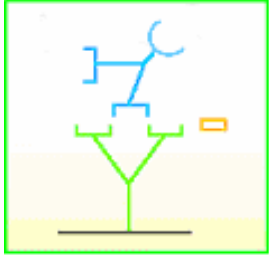
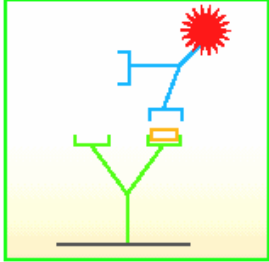
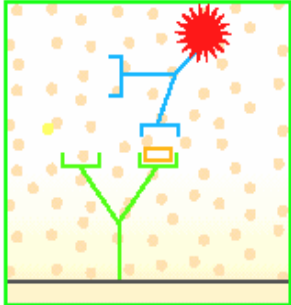
**Схема 2. Проведення ІФА на прикладі
тест-системи “DIA-HIV 1/2”
Етапи проведення аналізу**

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані рекомбінантними білками.	
Внесення в лунки по 60 мкл розчину кон'югату і по 30 мкл зразків контролів і сироваток.	
Інкубація протягом 90 хв при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ з кон'югатом). Промивання 8 разів буферним розчином.	
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинення реакції стоп-реагентом Реєстрація оптичної густини	

**Схема 3. Проведення ІФА на прикладі тест-системи “DIA-
HBV” для виявлення
HBs-антигену вірусу гепатиту В**
Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані моноклональними антитілами до HBsAg	
Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток Внесення в лунки по 50 мкл розчину кон'югату	
Інкубація протягом 120 хв при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ з кон'югатом) Промивання 6 разів буферним розчином	
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену) Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинення реакції додаванням стоп-реагенту Реєстрація оптичної густини	

**Схема 4. Проведення ІФА на тест-системі
“DIA-HIV-p24”
Етапи аналізу**

Процедура	Формування комплексу
<p>Полістиролові стрипи, сенсibilізовані моноклональними антитілами до p24</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток та по 50 мкл розчину кон'югату № 1. Інкубація протягом 60 хв при 37 °С (формування комплексу МКА-p24-АТ+біотин).</p>	
<p>Промивання 6 разів буферним розчином. Внесення в лунки розчин кон'югату № 2. Інкубація протягом 30 хв. Приєднання стрептавідину, міченого ПХ до біотину.</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену). Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (зabarвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація оптичної густини.</p>	

**Схема 5. Проведення ІФА
на прикладі тест-системи “DIA-Toxo-IgM”
для визначення IgM проти T.gondii**
Етапи проведення аналізу

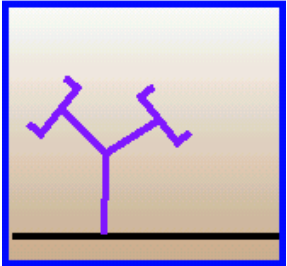
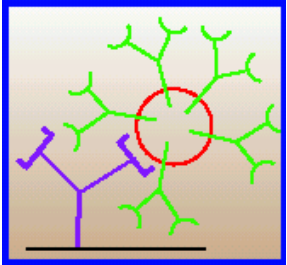
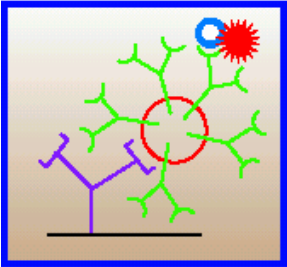
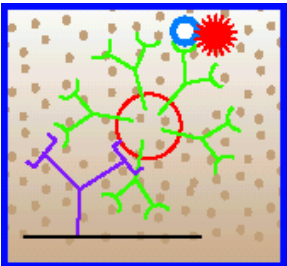
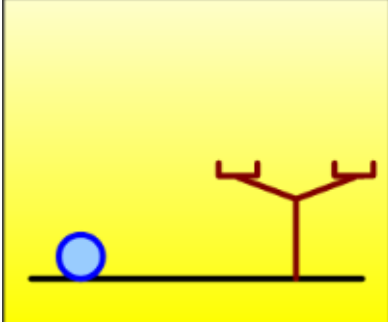
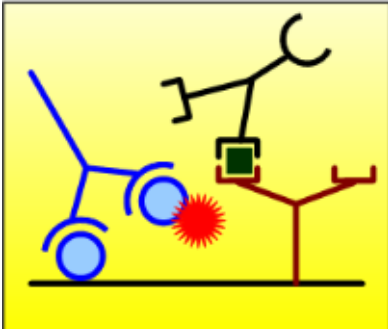
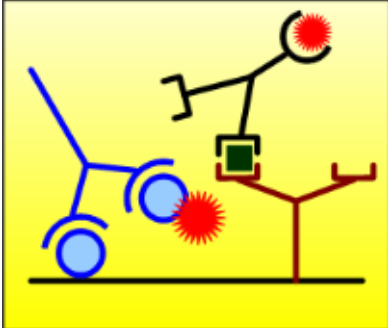
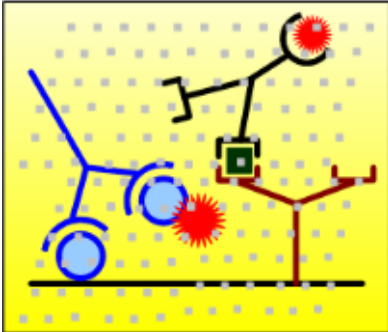
Процедура	Формування комплексу
<p>Полістиролові стрипи, сенсibilізовані моноклональними антитілами до IgM людини</p>	
<p>Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розчину для розведення зразків і по 10 мкл зразків контролів і сироваток Інкубація 60 хв при 37 °С формування комплексу анти-IgM-IgM) Промивання лунок 4 рази</p>	
<p>Внесення в лунки розчину кон'югату Інкубація 30 хв при 37°С (формування комплексу з кон'югатом) Промивання лунок буферним розчином (6 разів)</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинення реакції стоп-реагентом Реєстрація оптичної густини</p>	

Схема 6. Проведення ІФА на тест-системі „DIA-HIV-Ag/Ab”

Етапі проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
<p>Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані рекомбінантними білками і моноклональними антитілами до p24</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток та по 50 мкл антитіл детекції з біотином, а також рекомбінантних білків, мічених ПХ. Інкубація протягом 60 хв. при 37 °С (формування комплексів МКА-p24-МКА+біотин та АГ-АТ-АГ+ПХ)/</p>	
<p>Промивання 6 разів буфером. Внесення розчину стрептавідину +ПХ. Інкубація протягом 30 хв. Приєднання стрептавідину до біотину.</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація оптичної густини/</p>	

Обладнання, необхідне для роботи з імуноферментними тест-системами

Лабораторії, де проводять імуноферментний аналіз, мають бути укомплектовані таким устаткуванням:

- термостатом, розрахованим на підтримання температури 37 °С;
- холодильником з морозильною камерою;
- промивачем для планшетів (вошером);
- спектрофотометром багатоканальним (ридером);
- дистилятором лабораторним для отримання дистильованої води;
- набором автоматичних піпеток (мікродозаторів), до якого входять одноканальні піпетки змінного об'єму, розраховані на дозування 5-40, 40-200 та 200-1000 мкл рідини, а також 8-канальні піпетки змінного об'єму на 5-50 та 50-200 мкл;
- наконечниками для автоматичних піпеток;
- набором мірного хімічного посуду,
- ванночками для робочих розчинів
- центрифугою для приготування зразків.

Вимоги та рекомендації при проведенні досліджень методом ІФА

Коректна постановка аналізу досягається при обов'язковому дотриманні перерахованих нижче умов і вимог.

Якісна підготовка посуду

Посуд необхідно добре мити, використовуючи рідини для миття, що не містять біодобавок, та ретельно ополіскувати його проточною, а потім дистильованою водою. Посуд, використовуваний для розчину ОФД, не можна мити, застосовуючи засоби для миття. Такий посуд слід щоразу ополіскувати 70 %-ним розчином етилового спирту, а потім дистильованою водою. Слід неодмінно виділити окремі ємності для роботи з розчинами проявників та кон'югатів.

Особливо високі вимоги слід ставити до чистоти посуду та наконечників, які використовуються для маніпуляцій з розчинами кон'югатів та проявників, оскільки навіть незначне забруднення їх може призвести до зниження активності кон'югату і, як наслідок, до підвищення фонових значень та зниження чутливості проведеного аналізу. Слід використовувати лише одноразові наконечники.

Підготовка досліджуваних зразків [10]

Зразки сироваток досліджують після осадження еритроцитів (центрифугування). Відокремлення сироватки від еритроцитів здійснюють таким чином: пробірку із зразком крові ставлять в термостат на 30 хв при температурі 37 °С для швидкого формування фібринового згустку (фібриноген, який не потрапив у згусток, може стати джерелом хибно-позитивних реакцій в деяких тест-системах), після чого обводять згусток від стінок пробірки стерильною пастерівською піпеткою і на 1 год. ставлять у холодильник при температурі 2-8 °С. Зразки центрифугують 10 хв. при 3.000 об/хв. Збирають сироватку. Таку сироватку можна зберігати 72 год. у холодильнику при 2-8 °С.

Якщо проби сироваток чи плазми не вдається проаналізувати протягом терміну, вказаного вище, їх слід заморозити при мінус 20 °С

або при ще нижчих температурах (при цьому не слід допускати повторного заморожування та розморожування проб). Розморожені сироватки, які потребують повторного аналізу, не слід знову заморожувати.

Зразки сироваток мають бути прозорі, без ознак гемолізу, вираженої гіперліпідемії (хільозу), бактеріємії. Не слід проводити ІФА з пробами сироваток, де видно згустки крові, а також із сироватками, куди додано азид натрію (інгібітор пероксидази).

Необхідно виключити можливість потрапляння навіть мікрокількостей однієї проби до іншої, що часто трапляється при маніпуляціях з сироваткою над штативом з пробірками та над робочим планшетом; для кожної проби слід використовувати окремий наконечник для автоматичної піпетки.

Слід уважно ставитися до маркування зразків, щоб уникнути помилок.

Дотримання інструкції щодо застосування тест-системи

Як правило, в інструкції вказано найсуттєвіші моменти, істотні для отримання правильних результатів при проведенні ІФА з використанням даної тест-системи, тому треба уважно прочитати інструкцію перед тим як проводити аналіз. Прогрес в ІФА можна порівняти з прогресом в обчислювальній техніці, тому практично всі тест-системи повсякчас вдосконалюються, що може відбитися на методиках підготовки реактивів та проведення реакції.

Дотримання інструкції щодо стану приміщень, де зберігаються тест-системи та проводяться дослідження методами ІФА

При проведенні аналізу температура в приміщенні лабораторії має бути 18-25 °С.

Неприпустима присутність в лабораторії парів будь-яких окислювачів (відкритих ємностей з розчинами перекису водню, гіпохлориту тощо). Не дозволяється зберігати і використовувати розчини з хлором в приміщеннях, де проводиться дослідження методом ІФА.

Дотримання термінів та умов зберігання наборів

Якісну роботу діагностичних наборів гарантовано виробником лише у межах вказаного терміну придатності та при дотриманні вказаних умов зберігання.

Неприпустимість змішування компонентів з наборів різних серій

Ні в якому разі неприпустимо змішувати компоненти з наборів різних серій, оскільки всі компоненти тест-системи та умови проведення аналізу (зокрема, робоче розведення кон'югату) визначаються виробником окремо для кожної серії наборів.

Загальні рекомендації, дотримання яких сприяє якісному проведенню аналізу

Для розведення реагентів і промивки приладів необхідно використовувати якісну дистильовану воду, що зберігається не більш як 24 год.

Неприпустимо повторно використовувати планшети тест-систем для будь-якої іншої роботи.

Оскільки при постановці ІФА одночасно досліджують велику кількість проб, може виникнути плутанина при внесенні їх в лунки планшета. Щоб цього уникнути, необхідно перед початком аналізу заповнити протокол дослідження, де на схемі планшета показати заплановану послідовність внесення зразків. Такий бланк схеми необхідно внести у поліетиленовий прозорий файл (щоб не забруднити інфекційним матеріалом); схема допоможе лаборантові зосереджено працювати і буде далі використана при інтерпретації результатів аналізу та їх документуванні в протоколі дослідження. Крім того, рекомендують використовувати додатковий штатив, щоб переставляти туди пробірки з відпрацьованим матеріалом.

Правила роботи з автоматичними піпетками подано в наступному розділі.

Планшет з сироватками бажано поставити на білому фоні, щоб краще спостерігати за внесенням компонентів. Крім того, для коректного проведення аналізу необхідно обмежити попадання прямого світла на лунки планшета.

Вносити контрольні та досліджувані зразки необхідно обережно, пропіпетувавши суміш в лунках. У більшості випадків при роботі з тест-системами НВК “Діапроф-Мед” під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках.

Якщо при внесенні аналізованого зразку припустилися помилки, наприклад, дві сироватки внесено в ту саму лунку, така лунка бракується. При цьому в схемі внесення зразків необхідно обов’язково зробити помітку, яка саме лунка містить брак.

Реакція зв’язування антитіл з антигеном починається відразу після внесення сироватки в лунку планшета, тому необхідно якомога швидше вносити матеріал в лунки, щоб час взаємодії антигенів з антитілами був однаковий для всіх зразків.

Закінчивши роботу, слід занести до протоколу результати аналізу (вклеїти дані, надруковані на принтері ридера, разом зі схемою внесення зразків сироваток). Таким чином, лабораторія отримує документ, необхідний для зберігання інформації про здійснене дослідження.

Правила роботи з автоматичною піпеткою [11]

Автоматичні піпетки – це піпетки з регульованим об’ємом; вони широко застосовуються для взяття та розподілу точних об’ємів рідини. Принцип дії піпетки – переміщення визначеного об’єму повітря між поршнем і рідиною. Для взяття та розподілу об’ємів рідини використовують змінні наконечники, що мають стояти в штативі. Піпетки обладнано механізмом для скидання наконечників.

При роботі з автоматичною піпеткою дотримуйтесь таких правил:

1. Встановіть потрібний об’єм як вказано в інструкції до піпетки.
2. Переконайтесь, що наконечник чистий, а всередині його немає сторонніх пластикових часточок; щільно насуньте його на конус піпетки.
3. При роботі з сироватками або іншими біологічними рідинами тонка плівка рідини лишається на стінках наконечника; це може змінити піпетований об’єм. Цього можна уникнути, якщо попередньо змочити наконечник в рідині, яку піпетуватимуть.
4. В ході роботи тримайте піпетку вертикально (максимальне відхилення від вертикалі 10°).

5. Для кращої роботи щільно тримайте піпетку в руці, великий палець має лежати на операційній кнопці. Послідовність роботи при внесенні біологічної рідини в буфери для розведення зразків наведено на рис. 6 та 7.

Початкове
положення

Перший упор

Другий упор

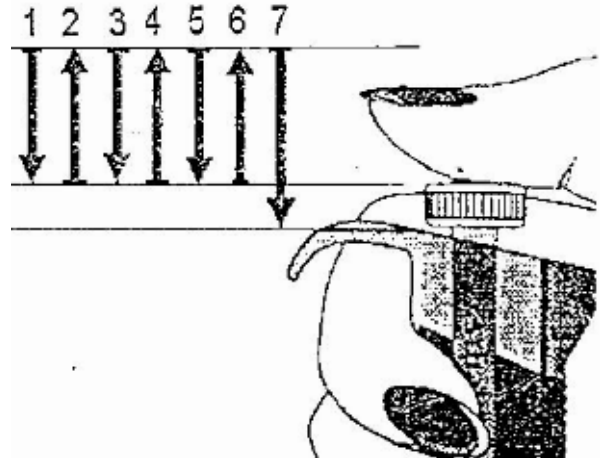
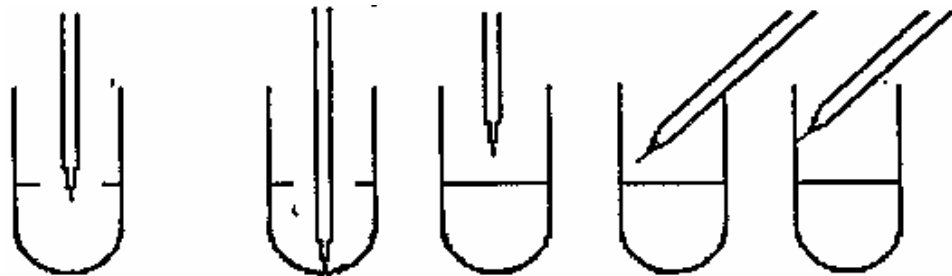


Рис.6

- Занурте наконечник на 2-3 мм в біологічну рідину та натисніть на операційну кнопку до першого упору (рис.4).

- Не витягуючи наконечника з рідини, обережно відпустіть кнопку у початкове положення.

- Занурте наконечник на 2-3 мм в розчин, куди необхідно перенести набрану рідину, натисніть на операційну кнопку до першого упору. Уникайте дотиків наконечнику до стінок та дна лунок (рис.7).



Правильне
положення
піпетки

Неправильна робота з
піпеткою

Рис. 7

- У положенні, коли наконечник трохи занурений в розчин, плавно відпустіть операційну кнопку (до початкового її положення). Таким чином наконечник наповнюють для розмішування. Повторіть цю процедуру 2-3 рази.

- Наостанку натисніть операційну кнопку до другого упору для повного звільнення наконечника від рідини. Витягніть наконечник з розчину і відпустіть операційну кнопку в початкове положення.

- Зніміть наконечник з піпетки, не торкаючись до нього, за допомогою механізму для зняття наконечників.

- Замініть наконечник і продовжуйте роботу з наступним зразком біологічної рідини.

Дотримання температурного режиму та часу інкубації

Згідно з інструкцією, інкубація досліджуваних сироваток та кон'югату має проводитися в термостаті при 37 °С. Для рівномірного прогріву планшетів рекомендують класти на металеву полицю термостату аркуш паперу.

Інкубація проб з розчином проявника, що містить хромоген, має проходити при кімнатній температурі. При цьому необхідно знати, що стандартно за кімнатну вважають температуру 18-25 °С. Саме на таку температуру розраховано тривалість інкубації, вказану в інструкції. Якщо температура в кімнаті нижча за 18 °С, ферментативна реакція уповільнюється, що може призвести до зниження чутливості проведеного аналізу. В такому разі рекомендують проводити інкубацію з проявником, який містить хромоген, в термостаті, настроєному на температуру 20-25 °С.

Відмивання планшета на кожному етапі проведення ІФА

Режим промивання планшета на кожному етапі ІФА має відповідати інструкції до тест-системи; для різних тест-систем вимоги неоднакові. Слід мати на увазі, що якість відмивання планшета – один з вирішальних факторів при проведенні ІФА, а тому слід дуже уважно підходити до цієї процедури. Необхідно слідкувати за рівномірністю заповнення та видалення розчинів з усіх лунок планшета. Тривалість часу між заповненням лунок промивним розчином та видаленням рідини має бути не менша за 30 с.

Правила роботи з кон'югатами та проявниками

Працювати слід лише зі щойно отриманими розчинами кон'югату та проявника (не більш як за 10-20 хв до використання).

Для внесення кон'югату та проявника слід мати окремі, відповідно позначені мікропіпетки та ванночки.

Необхідно виключити можливість щонайменшого контакту проявника з синтетичними засобами для миття та з хлораміном. Тому для роботи з проявником слід використовувати окремий посуд та окремі наконечники для мікропіпеток. Дезінфекцію інструментів та допоміжних матеріалів слід проводити 6 %-ним розчином перекису водню чи 70 %-ним етиловим спиртом.

Неприпустимий контакт хромогену та розчину проявника з металами.

Розчин проявника безпосередньо перед використанням має бути прозорий та безбарвний. Планшет зі внесеним субстратом та хромогеном інкубувати у темряві. Рештки розчину, що залишаються у ванночці, рекомендують не виливати до закінчення інкубації планшету з проявником. Проявник, що залишився у ванночці, не повинен змінювати забарвлення протягом 30 хв, поява забарвлення у ванночці з розчином проявника свідчить про його забруднення.

Періодичний контроль роботи обладнання

Дуже важливий фактор, що впливає на проведення ІФА та дає можливість отримувати достовірні результати – це точність роботи обладнання. Тому слід неодмінно проводити періодичні перевірки роботи автоматичних піпеток, термостатів, спектрофотометрів (ридєрів), промивачів.

Автоматичні піпетки. Допустима похибка при вимірюванні об'ємів автоматичними піпетками при виконанні ІФА – 2 %. Використовувані піпетки мають відповідати діапазонові потрібних об'ємів. При проведенні аналізу кожна операція з використанням піпетки має ретельно контролюватися, оскільки будь-яка неточність чи помилка (особливо при перенесенні малих об'ємів) може вплинути на правильність отриманих результатів.

Слід неодмінно щомісяця перевіряти точність роботи піпетки гравіметричним способом. Для цього наконечник щільно насаджують на піпетку. Піпетки змінних об'ємів встановлюють при цьому на середній об'єм. Слід 5 разів набрати дистильовану воду, щоразу зважуючи випущену краплю на терезах з точністю до 0,1 мг. Оцінюючи точність роботи піпетки, виходять з того, що 1 мл дистильованої води при кімнатній температурі має масу 1 г. Якщо всі

вимірювання вкладаються у допустимий проміжок ($\pm 2\%$ від встановленого), то вважають, що піпетка придатна для використання. Якщо це не так, піпетка потребує змащування та настройки або заміни.

Термостати. Для отримання правильних результатів аналізу важливо також, щоб термостат підтримував потрібну температуру, вказану в інструкції до даної тест-системи. Припустимі відхилення до ($\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$); при нижчій температурі знижується чутливість проведеного аналізу, а при вищій – його специфічність. Показання зовнішнього термометра, вмонтованого в термостат (при наявності такого термометра), часом можуть не відповідати дійсній температурі на полицях приладу. Тому необхідно періодично контролювати роботу термостата, вмістивши ртутний термометр у камеру термостата, туди, де звичайно розміщують планшети.

Автоматичні промивачі для планшетів (вошери). Якісне промивання планшета на кожному етапі роботи забезпечує коректне проведення аналізу. Всі лунки планшета мають рівномірно заповнюватися промивним розчином у потрібному об'ємі; потім розчин слід повністю видаляти. Крім того, слід суворо та чітко дотримуватись всіх вимог, вказаних в інструкції до тест-системи, щодо кількості промивок та часу між заповнюванням лунок та видаленням розчину.

Найпоширеніше джерело помилок – забруднення каналів промивача або простору між голками шматочками марлі чи вати, а також осідання на них кристалів солей. Через забруднення розчин може потрапити з однієї лунки до іншої. Використовуючи автоматичні промивачі, важливо контролювати якість промивання планшетів.

За рівномірністю заповнення та випорожнення всіх лунок планшета необхідно слідкувати у ході промивання. Крім того, слід періодично перевіряти об'єм заповнення лунок, використовуючи піпетку, настроєну на потрібний об'єм.

Щоб запобігти неякісній роботі автоматичних та ручних промивачів, необхідно щодня після закінчення роботи промивати їх дистильованою водою, не допускаючи осідання солей промивного

розчину та забруднення каналів промивної системи. Один раз на тиждень слід знезаражувати внутрішні канали промивача, пропустивши через усю систему приладу 30 %-ний розчин етилового спирту, а потім п'ятикратно її промити дистильованою водою.

Спектрофотометри багатоканальні (ридери, імуноферментні аналізатори)

Спектрофотометри використовуються, щоб отримати як якісну, так і кількісну оцінку результатів аналізу, а тому вони підлягають періодичному (принаймні раз на рік) метрологічному контролю. Ретельна перевірка аналізатора метрологом забезпечує правильність отримуваних результатів.

У повсякденній практиці ІФА не слід забувати, що прилад перед роботою має прогрітися (час прогрівання для кожного конкретного приладу вказано в інструкції до приладу). Існують прості прийоми для перевірки точності роботи спектрофотометра.

Щоб перевірити відтворюваність спектрофотометричної оцінки результату в кожній лунці планшета, слід декілька разів повторити визначення ОГ у тих самих лунках.

Щоб оцінити рівномірність результатів вимірювання по всій поверхні планшета, слід в усі лунки порожнього чистого планшета внести однакові об'єми стандартного зафарбованого розчину. Такий розчин можна приготувати, додавши до розчину проявника (виготовленого згідно з інструкцією для тест-системи) невелику кількість пероксидазного кон'югату. Кількість кон'югату при цьому підбирають експериментально, так щоб ОГ отриманого забарвленого розчину знаходилась в інтервалі від 0,3 до 1,0 оптичної одиниці (ОО). Після внесення такого розчину в усі лунки планшета та додавання кислоти проводять спектрофотометричне визначення ОГ. Відхилення від середнього результату вимірювань в межах одного планшета не повинно перевищувати 10 %.

Для більш коректної оцінки результатів імуноферментної реакції необхідно працювати на ридері у двохвильовому режимі (492 нм відносно 620 нм для проявника з ОФД та 450 нм відносно 620 нм для ТМБ). При основній довжині хвилі визначають сумарну ОГ кінцевих продуктів ферментативної реакції та носія в досліджуваній пробі, а при відсічній – ОГ носія (полістиролу). Ридер фіксує різницю

між ОГ при цих двох довжинах хвиль. Це дозволяє точніше оцінити отримані результати.

Дії при несподіваних порушеннях робочого режиму

У випадку несправності спектрофотометра або при відсутності світла можливий вихід для збереження результатів ІФА – швидке заморожування планшета зі зразками після додавання сірчаної кислоти в розчин проявника (при температурі мінус 18-20 °С) з наступним швидким розморожуванням перед вимірюванням ОГ наступного дня при кімнатній температурі. Слід зауважити, що ОГ все ж зростає, а відносний приріст сигналу буде більший для невеликих значень ОГ.

Якщо термостат не забезпечує необхідної температури, треба припинити роботу. Найрозповсюдженіша помилка – проведення ІФА при пониженій температурі з подовженням часу інкубації. Однак різні тест-системи реагують на зниження температури та на зміну тривалості інкубації по-різному, тому однозначної рекомендації щодо роботи при несправному термостаті немає.

Облік результатів ІФА

У тих випадках, коли існує стандартний зразок очищеного антигену, для визначення концентрації даного антигену в досліджуваній пробі готують його стандартні розчини з відомою концентрацією антигену і будують калібрувальну криву. Користуючись цією кривою, можна розрахувати концентрацію досліджуваного антигену (в нг/мл, молях/л або МО/мл), знаючи ОГ досліджуваної проби. Концентрація ж неочищеного антигену виражається у відносних величинах – титрах, що являють собою ступінь розведення антигену.

Щоб коректно проводити визначення антитіл (чи антигенів) у досліджуваних сироватках, встановлюють пороговий рівень ОГ (тобто фоновий рівень, так зване граничне значення – ГЗ, або cut off), вимірюваний на негативних зразках. Для цього розраховують середнє значення сигналу негативних сироваток і обчислюють величину стандартного відхилення (σ) (див. далі). Перевищення величини сигналу для досліджуваної сироватки на 2-3 σ дозволяє вважати цю

сироватку позитивною. У більшості комерційних тест-систем при обчисленні ГЗ додають до середнього значення ОГ негативних контрольних сироваток константну величину, яка відповідає значенню $2-3 \sigma$ негативних сироваток (звичайно розраховують стандартне відхилення величин ОГ для 40 та більше негативних сироваток).

Оцінка діагностичних характеристик імуноферментної тест-системи [12]

Основні діагностичні характеристики імуноферментної, як і будь-якої іншої тест-системи – це її чутливість, специфічність та відтворюваність отримуваних результатів, які свідчать про надійність (інформативність) оцінюваної тест-системи. Отже, ці характеристики – головні медичні критерії вибору діагностикуму, які сукупно (комплексно) визначають його інформативну діагностичну цінність.

При користуванні тест-системами отримують як правильні (істинні) позитивні та негативні результати, так іноді й помилкові результати – хибно-позитивні та хибно-негативні. Хибно-позитивний результат – це помилковий позитивний результат, отриманий у даній тест-системі для проби, яка насправді негативна. Навпаки, хибно-негативний результат – це помилковий негативний результат, отриманий у даній тест-системі для проби, яка в дійсності позитивна.

Визначення чутливості й специфічності тест-систем, відповідно до рекомендацій ВООЗ здійснюють, оцінюючи здатність діагностикумів виявляти позитивні або негативні сироватки стандартних контрольних панелей. При цьому зразки сироваток позитивних контрольних панелей мають 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), 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 - repeat reactive) реактивності позитивних зразків, отриманих на цій тест-системі, з наступною верифікацією результатів.

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 діагностикуму, який гарантує абсолютну чутливість і специфічність при проведенні скринінгових досліджень.

Чутливістю називають показник, який виражає долю позитивних відповідей при наявності даної патології, тобто кількість інфікованих 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.

Специфічністю називають показник, що характеризує здатність тест-системи визначати лише той компонент, який вона призначена виявляти; отже, ми маємо отримати негативний результат 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.

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

Наступний науковий критерій вибору діагностикумів – показник відтворюваності, який включає:

- близькість результатів аналізу, що виконувався за різних умов (ступінь збіжності результатів повторних визначень для тієї самої проби у різний час, у різних лабораторіях, руками різних працівників однієї лабораторії тощо); розрізняють, зокрема, відтворюваність внутрішньосерійну, міжсерійну та міжлабораторну;

- число сироваток, які однаково реагують у двох постановках;
- ступінь відповідності результатів повторних досліджень тих же зразків.

Кількісно відтворюваність можна оцінити за розбіжностями результатів. Статистично цей показник виражається величиною стандартного, або так середнього квадратичного відхилення – (SD, standard deviation). Цю величину необхідно знати для підрахунку граничного рівня ОГ (як сказано вище, ГЗ = ОГ + 3 σ) та коефіцієнту варіації (coefficient of variation, CV).

Обчислення середньоквадратичного відхилення

Значення σ обчислюють за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, \quad d = X_i - X_{cp}$$

де d – різниця між окремими показниками ОГ і середньою арифметичною величиною ($X_i - X_{cp}$); n – кількість досліджуваних сироваток; X_i – значення ОГ окремої сироватки; X_{cp} – середнє арифметичне значення ОГ усіх досліджуваних зразків.

Оскільки при дослідженні сироваток показник σ дає узагальнену характеристику коливання усіх варіантів ОГ для даного діагностичного, то для порівняння показників різних тест-систем, а також для визначення внутрішньосерійних та міжсерійних відхилень рекомендують користуватися коефіцієнтом варіації (CV, coefficient of variation) – відносною мірою розбіжності результатів, вираженою у відсотках.

Коефіцієнт варіації між лунками одного планшету та між планшетами обчислюють за формулою:

$$CV = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100 \%,$$

де σ – середньоквадратичне відхилення, X_{cp} – середнє арифметичне значення ОГ всіх досліджуваних зразків.

Вище значення CV свідчить про більші коливання ознаки (у даному випадку – ОГ) у досліджуваній сукупності проб. Величини, які характеризують показник відтворюваності – стандартне відхилення (σ) та внутрішньо серійні й міжсерійні відхилення (CV) – враховуються при дослідженні стандартних панелей позитивних сироваток з різними рівнями антитіл до збудника (низько-, середньо- і високотитражних сироваток). Крім того, досліджують показники негативних і позитивних контролів тест-системи (не менш як 20

повторів для кожного). При цьому CV стандартних відхилень від середнього значення позитивних контролів не повинен перевищувати 10 %, а негативних – 20 %.

Крім основних діагностичних характеристик тест-систем, необхідно враховувати й інші чинники, зокрема, стабільність (стійкість проти впливу різних факторів довкілля), простоту проведення аналізу, вартість тестів, тобто враховувати економічні критерії вибору. Для того щоб визначити ці критерії, необхідно провести масштабне, ретельно сплановане дослідження роботи тест-систем в умовах їх застосування. На практиці перевагу, звичайно, слід віддавати тим системам, які мають оптимальні показники, що характеризують їхню діагностичну цінність, з урахуванням епідемічної ситуації в конкретному регіоні, у певній популяції, а також враховувати економічні міркування.

Показники чутливості й специфічності тест-систем – це величини постійні й задані; вони не змінюються в залежності від рівня поширеності захворювання в популяції. Показником, який описує залежність результатів дослідження від поширеності інфекції та якісних характеристик діагностикому (тобто, чутливості і специфічності), є прогностична цінність тесту (predictive value). Прогностична цінність позитивного тесту або позитивне прогнозоване значення результатів тесту (ППЗ) – це ймовірність того, що особи з позитивними результатами скринінгового аналізу дійсно містять у крові антитіла до збудника:

$$\text{ППЗ} = \frac{\text{дійсно позитивні результати ІФА}}{\text{дійсно позитивні} + \text{хибно-позитивні}} \times 100 \%$$

Прогностична цінність негативного тесту, або негативне прогнозоване значення (НПЗ) – це ймовірність того, що особи з негативними результатами дослідження дійсно не мають в крові антитіл до збудника:

$$\text{НПЗ} = \frac{\text{дійсно негативні результати ІФА}}{\text{дійсно негативні} + \text{хибно-негативні}} \times 100 \%$$

Таким чином, прогностична цінність тесту, крім чутливості, специфічності, передбачуваної поширеності інфекції, залежить і від

кількості правильних результатів досліджень (і позитивних, і негативних) порівняно з помилковими. Що вищий рівень розповсюдження інфекції в популяції, то вища ймовірність того, що особа з позитивним результатом тестування дійсно інфікована (тобто тим вище значення ППЗ). Зі зростанням поширеності інфекції доля зразків сироваток із хибно-позитивними результатами тестування знижується, а ймовірність того, що особа з негативними результатами аналізу дійсно неінфікована, зменшується (тобто знижується значення НПЗ). Отже, при обстеженні осіб, які належать до контингентів із значною розповсюдженістю інфекції, більш ефективними є діагностикуми з високим значенням ППЗ. Якщо ймовірність інфекції низька, то зростає цінність тест-систем із високим показником НПЗ. Обчислення показників ППЗ і НПЗ дозволяє, з одного боку, оцінити, якому діагностикуму слід віддати перевагу для застосовування в конкретній епідемічній ситуації у визначеному регіоні, а разом з тим розрахувати, скільки тестів необхідно для підтвердження результатів первинного скринінгу.

Переваги та недоліки діагностикумів на основі ІФА

Метод ІФА цінний насамперед через його високу чутливість (окремі його модифікації дозволяють визначати до 10^{-18} моль/л антигену) та високу специфічність (близько 100 %). Якщо 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. Те саме слід зробити при отриманні негативного результату при тестуванні проб(и) з “позитивної вибірки”.

Кількість хибно-позитивних результатів при виявленні антитіл проти деяких збудників може коливатися (для різних тест-систем та для різних контингентів) 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. Що з більшим числом чужих антигенів та збудників контактує обстежувана особа, то більша ймовірність отримати хибно-позитивний результати. Наведемо деякі приклади для ілюстрації цього твердження.

Хибно-позитивну відповідь у серологічній реакції може викликати наявність якихось інших “природних антитіл” проти невідомих антигенів; через такі антитіла виникають перехресні реакції. У ряді випадків доведено, що причиною таких результатів була так звана антигенна мімікрія¹. Так, відомі хибно-позитивні реакції на ВІЛ в осіб, хворих на шистозоматоз, оскільки виявлено тотожні епітопи у дуже віддалених представників живого світу – гельмінта *Schistosoma mansoni* та ВІЛ-1. Ідентифіковано спільний для обох видів В-епітоп, що складається з 14 амінокислот. Моноклональні антитіла проти нього реагують і з поверхневим антигеном *Sch.mansoni*, і з ВІЛ-1 (з його регуляторним білком Vif). Є немало випадків присутності у сироватках крові антитіл проти споріднених вірусів чи мікроорганізмів. Наприклад, позитивний результат дослідження на антитіла проти ВІЛ можна отримати при наявності в організмі інших ретровірусів; позитивні відповіді на присутність антитіл проти сифілісу можливі, наприклад, при таких інфекціях, як хвороба Лайма (борреліоз, або кліщовий спірохетоз) та хвороба содоку (викликана зараженням при укусі пацюка завдяки передачі від пацюка до людини збудника содоку – *Spirillum minus*).

Інші можливі причини – прогрівання досліджуваних сироваток, наявність у сироватках антитіл проти вуглеводів, випадки пасивної імунізації (це особливо стосується препаратів антитіл, виготовлених до 1985 р.), високі рівні антитіл та імунних комплексів, що циркулюють у крові, наявність аутоантитіл при численних аутоімунних захворюваннях (наприклад, ревматоїдного фактора, антитіл проти колагену тощо), при численних патологічних процесах, що викликають поліклональну активацію лімфоцитів, при злякисних пухлинах, імунодефіцитних станах, вагітності, високому вмісті ліпідів

¹ Антигенна мімікрія – випадки наявності у білків різного походження дуже подібної або цілком тотожної первинної амінокислотної послідовності (та структури). Така мімікрія може виникати завдяки горизонтальній передачі генетичної інформації (наприклад, через віруси, плазміди чи у ході так званої генетичної трансформації у бактерій).

та білірубін у досліджуваних сироватках, постановці реакції з гемолізованими сироватками².

З наведених даних витікає, що результати ІФА можуть бути надзвичайно корисним допоміжним засобом при постановці діагнозу, але клініцист повинен брати до уваги багато інших обставин, крім даних лабораторного аналізу. Лише всебічне обстеження хворого та увага до всіх даних анамнезу дозволяє коректно поставити діагноз та розпочати правильне лікування.

Порівняння тест-систем

Як правило, важко оцінювати всі доступні тест-системи певного призначення, тому найчастіше просто порівнюють чутливість та специфічність двох-трьох тест-систем різних виробників, щоб вибрати найкращу з них.

Щоб порівняти дві тест-системи за їхньою чутливістю та специфічністю, слід використати певну панель сироваток (наприклад, панель А); аналіз сироваток в обох тест-системах має провести один працівник. Якщо можливо, варто, щоб інший лаборант повторив порівняння наступного дня. Потім все це слід повторити з використанням вже іншої панелі сироваток (наприклад, панелі В), отриманої від іншого виробника. Можливі варіанти одержаних результатів подано в таблиці 1.

У варіанті I треба вибрати тест-систему № 1 (її чутливість та специфічність показано вище).

У варіанті II необхідно провести перевірку на додаткових панелях (чутливість та специфічність тест-системи № 3 виявились вищими при перевірці за допомогою панелі А та нижчими - при перевірці на панелі В).

У варіанті III слід вибрати тест-систему № 5 (чутливість тест-системи № 5 вища при перевірках на обох панелях, специфічність її нижча, але при цьому різниця в чутливості набагато перевищує різницю у специфічності)

² Коли працюють з пероксидазою, це відбувається через так звану "псевдопероксидазну активність гемоглобіну".

У варіанті IV вибір здійснити важко. Звичайно у таких випадках враховують інші фактори (особливості інфекції, відтворюваність та ін.)

Таблиця 1. Порівняння тест-систем з метою вибору

Варіант	Тест-система, №	Панель сироваток	Чутливість, %	Специфічність, %
I	1	A	98	96
		B	96	96
	2	A	94	95
		B	92	96
II	3	A	98	96
		B	94	92
	4	A	93	91
		B	95	96
III	5	A	98	92
		B	95	91
	6	A	82	98
		B	85	98
IV	7	A	98	92
		B	95	91
	8	A	94	96
		B	90	96

Типові помилки при порівнянні тест-систем, оцінці чутливості та специфічності

Приклад 1. За допомогою тест-системи № 1 перевіряють великий контингент пацієнтів (наприклад, 1000); сироватки 40 осіб визнано позитивними. Зразки, що дали позитивний результат у тест-системі № 1 (40 зразків), досліджуються з використанням тест-системи № 2; в цій тест-системі 30 сироваток з 40 визнані позитивними, а 10 – негативними; потім ці ж зразки передаються для підтвердження методом К; в якому позитивними визнаються 30 сироваток.

На підставі цих даних робиться **помилковий** висновок про те, що специфічність тест-системи № 1 складає 75 % ($30/40 \times 100$ %), а специфічність тест-системи № 2 — 100 % ($30/30 \times 100$ %): значить, тест-система № 2 краща за тест-систему № 1.

Подібні висновки можна часом зустріти у доповідях багатьох наукових конференцій та у наукових публікаціях.

Насправді специфічність тест-системи № 1 складає 98,9 % - $960/(960+10) \times 100$ %. Щодо специфічності тест-системи № 2 важко щось сказати, оскільки за допомогою її досліджено усього тільки 40 зразків.

Якщо хвороба мало поширена і проби брали у випадкових хворих (не у групі ризику), то можна припустити, що з 1.000 обстежених не менш як 950 – здорові. Тоді з 950 здорових тест-система № 1 визнала здоровими 940 осіб (10 осіб помилково визнані хворими, що не підтвердилося методом К); таким чином, специфічність тест-системи № 1 не нижча за 98 % ($940/950 \times 100$ %). Що можна сказати про тест-систему № 2? З наведених даних можна оцінити її чутливість. Тест-система № 2 визнала хворими 30 осіб, що були визнані такими при застосуванні тест-систем № 1 та методом К; таким чином, чутливість тест-системи № 2 близька до 100 %. Якби за допомогою тест-системи № 2 перевірили всіх 1.000 пацієнтів, то можна було б порівняти специфічності обох тест-систем. Ще точніші розрахунки можна було б провести, якби всіх пацієнтів перевірили, застосувавши метод К (референтну тест-систему).

Тому на підставі наведених даних можна зробити приблизно такий висновок:

«Тест-система № 1 має специфічність, більшу за 98 %, а тест-система № 2 – чутливість біля 100 %. При цьому слід взяти до уваги, що специфічність тест-системи № 1 оцінено точніше (на 1.000 зразків), ніж чутливість тест-системи № 2 (оцінену на 30 зразках). Отримані дані не дають змоги коректно порівняти якість тест-систем».

Приклад 2. Лабораторія перевіряє за допомогою панелі А чутливість та специфічність тест-системи № 1. Потім інша лабораторія перевіряє за допомогою тієї ж панелі А чутливість та специфічність тест-системи № 2. Чи можна на основі отриманих результатів порівнювати тест-системи № 1 та № 2? Найчастіше цього робити не слід, бо лабораторії можуть значно відрізнятись як за наявним обладнанням, так і за кваліфікацією персоналу.

Приклад 3. За допомогою тест-систем № 1 та № 2 перевіряють достатньо великий контингент пацієнтів. Отримані результати заносять у таблицю, що виглядає приблизно так:

Тест-система, №	Кількість зразків, визнаних	
	Негативними	Позитивними
1	980	20
2	970	30

На підставі табличних даних робиться висновок про те, що тест-система № 2 чутливіша за тест-систему № 1, а тест-система № 1 більш специфічна.

За даними цієї таблиці нічого не можна сказати ані про чутливість обох тест-систем, ані про їхню специфічність, оскільки невідомо, хто з пацієнтів хворий (інфікований), а хто здоровий. Цілком можлива ситуація, коли всі 20 зразків, визнаних позитивними в тест-системі № 1, взято від хворих людей, яких усього 20 (чутливість тест-системи № 1 = 100 %). У той же час з 30 зразків, визнаних позитивними в тест-системі № 2, лише 10 взято від хворих, яких усього 20 (чутливість тест-системи № 2 = 50 %).

Приклад 4. Тест-система № 1 при перевірці на двох-трьох позитивних сироватках дає вищий сигнал, ніж тест-система № 2. Обидві тест-системи діагностують сироватки як позитивні. Робиться висновок про те, що тест-система № 1 чутливіша за тест-систему № 2.

Такий висновок мало обґрунтований: цілком можливо, що на більшій виборці атестованих позитивних сироваток тест-система № 2 може правильно виявити таку саму чи більшу кількість сироваток, ніж тест-система № 1.

**ПРОБЛЕМИ, ЩО МОЖУТЬ ВИНИКАТИ
ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА**

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Засоби усунення проблем
1. Високий фон (забарвлення) в лунках всього планшета.	1.1. Низька якість дистильованої води.	1.1.1. Промити дистильатор 10 %-ним 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 її 30 %-ним розчином етилового спирту, а потім кілька разів дистильованою водою.
	1.4. Використання того ж самого посуду для різних реагентів.	1.4.1. Використовувати для розчину кожного реагенту окремий посуд.

	1.5.Наявність і використання на робочому місці дезрозчинів, що містять хлор.	1.5.1.Не використовувати і не зберігати дезрозчини, що містять хлор, 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 "Інструкції".
	1.9.Закінчився термін придатності тест-системи.	1.9.1.Заборонити використання тест-системи.
	1.10.Забруднений посуд.	1.10.1.Мити посуд, дезінфікувати його відповідно до "Інструкції."
	1.11.Підвищено температуру або подовжено термін інкубації.	1.11.1.Дотримуватися режиму інкубації.
2.Високий фон в окремих лунках.	2.1.Переливання промивного розчину з лунок планшету вошером.	Відрегулювати вошер, виключити можливі порушення.
	2.2.Використання для дослідження гемолізованих зразків.	2.2.1. Повторно взяти кров.

	2.3. Використання нефракціонованої крові.	2.3.1. Отримати сироватку, повторно взявши пробу крові.
	2.4. Бактеріальне забруднення сироваток.	2.4.1. Повторно взяти кров.
	2.5. Використання того самого наконечника для декількох сироваток.	2.5.1. Використовувати окремі наконечники для кожної сироватки.
3. Високий фон в окремих рядах	3.1. Повторне внесення проявника.	3.1.1. Розчин проявника вносити одноразово.
	3.2. Переливання рідини з одного ряду в другий під час промивання.	3.2.1. Відрегулювати подачу промивного розчину.
	3.3. Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату.	3.3.1. Для внесення кон'югату та проявника мати <u>окремі</u> мікропіпетки. При відсутності достатньої кількості мікропіпеток слід після внесення кон'югату і зняття наконечників видалити з піпетки можливі залишки кон'югату та протерти її фільтрувальним папером.

4. Після внесення проявника та закінчення інкубації немає забарвлення в лунках всього планшету.	4.1. Не внесено один з реагентів – кон'югат або проявник.	4.1.1. Переставити аналіз. Внести відповідно до "Інструкції" необхідні реагенти.
Немає забарвлення в окремих лунках планшету (рядів).	4.2. Не внесено один із реагентів – сироватку, кон'югат або проявник.	4.2.1. Переставити ці проби. Внести, відповідно до "Інструкції", необхідні реагенти.
5. Слабке забарвлення всього планшета. Значення ОГ контрольних зразків не відповідають вимогам інструкції.	5.1. Зменшено час інкубації.	5.1.1. Інкубацію проводити згідно з "Інструкцією".
	5.2. Термін придатності тест-системи закінчився.	5.2.1. Перевірити результати на тест-системі з належним терміном придатності.

Список літератури

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа - М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
2. Нго Г.Г., Ленкофф Г.М. (ред.) Иммуноферментный анализ.- М.: Мир, 1988. – 446 с.
3. Чумак Р.М. Імуноферментний аналіз і рекомбінантні антигени// Лабораторна діагностика. К.– 1999. - №3. – С. 3 – 6.
4. Ванеева Л.И., Гридчина И.Ю., Пантелеев О.А. и др. Изучение сорбционной способности полистироловых планшетов, используемых в ИФА.// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1986. – №9. – С. 44 – 48.
5. Esser P., Knudsen H., Nielsen V.et al. Solid Phase Guide. – Denmark:Nunc, 1999. – 50 p.
6. Раєвська Г.Є., Співак М.Я. Сучасні методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції // Мікроб.ж., 2000, т. 62, № 4, с.56-65.
7. Раєвська Г.Є., Співак М.Я., Пилипенко В.Г., Ростопіра Н.М., Ткачікова Л. Отримання пероксидазних кон'югатів для виявлення ВІЛ-специфічних антитіл методом імуноферментного аналізу// Імунологія та алергологія, 2002, № 2-3, с.39-42.
8. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ // Соросовский образовательный ж. № 12, 1999, с. 9-15
9. Гончаренко В.С., Раєвська Г.Є., Кас'яненко Т.В., Ганова Л.А., Шимко Н.М. Порівняльне вивчення використання *o*-фенилендіаміну та тетраметилбензидину в імуноферментному аналізі для діагностики ВІЛ-інфекції, гепатитів В і С та сифілісу// Імунологія та алергологія, 2002, № 4, с.18-21.
10. Гирін В.М., Дзюблик І.В., Порохницький В.Г. та ін. Навчальний посібник з лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції /СНІДу. – Київ, 1999. – 160 с.
11. Інструкція з організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ // Київ, 2002, № 71, 25 с.
12. Сергеева Т.А., Семенова Н.Н. Изучение диагностической ценности тест-системы “ИФА-ВІЛ 1/2” для выявления антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ)// Лаб.диагностика (Киев), 1997, № 2, с.34-39.
13. Масыго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА, Кольцово, 2002, 31 с.

Додаток
Перелік тест-систем, що випускаються підприємством АТЗТ НВК «Діапроф Мед»

Назва тест-системи та її номер кодуванням	Код	Вид набору	Повна назва тест-системи (згідно ФС/ГУУ)	Номер НД
1	2	3	4	5
Тест-системи медичного призначення				
«DIA-HIV 1/2» 01	01-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до вірусу імунодефіциту людини першого та другого типів	ФС 42У-200-121-1224-01
	01-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментная для определения антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов	
	01-Ф12	Ф12-стрип	The enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the human immunodeficiency virus types 1 and 2	
	01-Т2	Т2-моноліт		
	01-Т12	Т12-стрип		
«DIA-HBV» 02	02-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення поверхневого антигену (HBsAg) вірусу гепатиту В	ФС 42У-200-121-1223-01
	02-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система иммуноферментная для определения поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В	
	02-Ф12	Ф12-стрип	The enzyme immunoassay test system for the detection of	

1	2	3	4	5
	02-Г2	Т2-моноліт	hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)	
	02-Т12	Т12-стрип		
«DIA-C- HBV» 02С	02С-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментна для підтвердження наявності поверхневого антигену (HBsAg) вірусу гепатиту В	ФС 42У- 200-121- 1220-01
	02С-Т6	Т6-стрип	Тест-система імуноферментна для підтвердження наявності поверхневого антигена (HBsAg) вірусу гепатиту В The enzyme immunoassay test system for the confirming of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)	
	03-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до вірусу гепатиту С	
03	03-Ф12	Ф12-стрип	Тест-система імуноферментна для определения антител к вирусу гепатита С	ФС 42У- 200-121- 1226-01
	03-Т2	Т2-моноліт	The enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the hepatitis C virus	
	03-Т12	Т12-стрип		

1	2	3	4	5
«DIA-C- HCV» 03C	03C-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментна для підтвердження наявності антитіл до вірусу гепатиту С Тест-система імуноферментна для підтвердження наявності антител к вирусу гепатита С The enzyme immunoassay test system for the confirming of antibodies to the hepatitis C virus	ФС 42У- 200-121- 1225-01
	03C-Т6	Т6-стрип		
	04-Ф2	Ф2-моноліт		
«DIA- Trep» 04	04-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до збудника сифілісу Treponema pallidum Тест-система імуноферментна для определения антител к возбудителю сифилиса Treponema pallidum The enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the syphilis infectious agent Treponema pallidum	ФС 42У- 200-121- 1222-01
	04-Ф12	Ф12-стрип		
	04-Т2	Т2-моноліт		
	04-Т12	Т12-стрип		
	05-Ф2	Ф2-моноліт		
«DIA- HBscore» 05	05-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення IgG та IgM-антитіл до корового білку вірусу гепатиту В Тест-система імуноферментна для определения IgG и IgM-антител к коровому белку вируса гепатита В The enzyme immunoassay test system for the detection of IgG and IgM-antibodies to the hepatitis B virus core protein	ФС 42У- 200-121- 1219-01
	05-Ф12	Ф12-стрип		
	05-Т2	Т2-моноліт		
	05-Т12	Т12-стрип		

1	2	3	4	5
«DIA-SYPH» 06	06-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до збудника сифілісу <i>Treponema pallidum</i> Тест-система імуноферментна для определения антител к возбудителю сифилиса <i>Treponema pallidum</i> The enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the syphilis infectious agent <i>Treponema pallidum</i>	ФС 42У-200-121-1221-01
	06-Ф6	Ф6-стрип		
	06-Ф12	Ф12-стрип		
	06-Т2	Т2-моноліт		
	06-Т12	Т12-стрип		
«DIA-IgM-SYPH» 10	10-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення імуноглобулінів класу М (IgM) до збудника сифілісу <i>Tr. Pallidum</i> Тест-система імуноферментна для определения иммуноглобулинов класса М (IgM) человека к возбудителю сифилиса <i>Tr. pallidum</i> . The enzyme immunoassay test system for the detection of IgM antibodies to the syphilis infectious agent <i>Treponema pallidum</i>	ТФС 42У-200/121-709-98
	10-Ф6	Ф6-стрип		
	10-Ф12	Ф12-стрип		
	10-Т2	Т2-моноліт		
	10-Т12	Т12-стрип		

1	2	3	4	5
DIA-Toxo-IgM-11M	T-1106 M	T12-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу М до збудника токсоплазмозу <i>Toxoplasma gondii</i> Тест-система імуноферментна для определения антител класса М к возбудителю токсоплазмоза человека <i>Toxoplasma gondii</i> The enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgM class antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i>	Сертифікат № 390/03-3002000000 від 18.06.03
DIA-Toxo-IgG-11G	T-1106 G	T12-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу G до збудника токсоплазмозу <i>Toxoplasma gondii</i> Тест-система імуноферментна для определения антител класса G к возбудителю токсоплазмоза человека <i>Toxoplasma gondii</i> The enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgG class antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i>	Сертифікат № 390/03-3002000000 від 18.06.03
«DIA-Chlamydia 12	12-Ф2	Ф2-моноліт	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класів G та A до <i>Chlamydia trachomatis</i>	Сертифікат № 390/03-3002000000 від 18.06.03
	12-Ф6	Ф6-стрип	Тест-система імуноферментна для определения антител классов G и A к <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	12-Г2	Т2-моноліт	The enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies G and A classes to the <i>Chlamydia trachomatis</i>	

1	2	3	4	5
DIA- CMV-IgG 13G	Т- 1306G	Т12-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини Тест-система імуноферментная для определения антител класса IgG к цитомегаловирусу человека The enzyme immunoassay test system for the detection of IgG class antibodies against Cytomegalovirus	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03
DIA-CMV IgM 13M	Т- 1306M	Т12-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgM до цитомегаловірусу людини Тест-система імуноферментная для определения антител класса IgM к цитомегаловирусу человека The enzyme immunoassay test system for the detection of IgM class antibodies against Cytomegalovirus	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03
DIA-HSV 1/2-IgG 14G	Т- 1406G	Т12-стрип	Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgG до вірусу простого герпесу 1 та 2 типів Тест-система імуноферментная для определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов The enzyme immunoassay test system for the detection of IgG class antibodies against Herpes Simplex Virus 1 and 2 types	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03

1	2	3	4	5
DIA-HSV 1/2-IgG 14M	Т- 1406G	Т12-стрип	<p>Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу 1 та 2 типів</p> <p>Тест-система імуноферментная для определения антител класса IgM к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов</p> <p>The enzyme immunoassay test system for the detection of IgM class antibodies against Herpes Simplex Virus 1 and 2 types</p>	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03
DIA- Rubella- IgM	Т- 1206M	Т-12 стрип	<p>Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgM до вірусу червонички (Rubella)</p> <p>Тест-система иммуноферментная для определения антител класса IgM к вирусу краснухи (Rubella)</p> <p>The enzyme immunoassay test system for the detection of IgM class antibodies against Rubella virus</p>	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03
DIA- Rubella- IgG	Т- 1206G	Т-12 стрип	<p>Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgG до вірусу червонички (Rubella)</p> <p>Тест-система иммуноферментная для определения антител класса IgG к вирусу краснухи (Rubella)</p> <p>The enzyme immunoassay test system for the detection of IgG class antibodies against Rubella virus</p>	Сертифікат № 390/03- 3002000000 від 18.06.03

Тест-системи ветеринарного призначення

<p>«DIA-TUB-V» 07</p>	<p>Тест-система діагностична імуноферментна для виявлення проти-туберкульозних антитіл в сироватці крові великої рогатої худоби</p> <p>Тест-система діагностическая иммуноферментная для определения противотуберкулезных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота</p>	<p>ТУУ 24.4-24265186-2002</p>
<p>«IFA-Leptospirosis-V» 08</p>	<p>Тест-система діагностична імуноферментна для визначення протилептоспірозних антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби</p> <p>Тест-система діагностическая иммуноферментная для определения противолептоспирозных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота</p>	
<p>«DIA-Brucella ab.-V» 09</p>	<p>Тест-система діагностична імуноферментна для виявлення проти-бруцельозних антитіл в сироватках крові великої рогатої худоби</p> <p>Тест-система діагностическая иммуноферментная для определения противобруцеллезных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота</p>	<p>ТУУ 24.4-24265186-2002</p>

Зміст

Скорочення, використані в тексті посібника	
Вступ	
Імуноферментний аналіз	
Термінологія	
Імуноферментний аналіз для виявлення антитіл	
Імуноферментний аналіз для виявлення антигенів	
Імуносорбенти	
Твердофазні носії	
Імобілізація антигенів або антитіл	
Кон'югати, використовувані в ІФА	
Субстрати та хромогени	
Типи імуноферментних тест-систем	
Схема проведення ІФА на прикладі тест-системи "DIA-НСV"	
Схема проведення ІФА на прикладі тест-системи "DIA-НIV"	
Схема проведення ІФА на прикладі тест-системи для виявлення HBs-антигену вірусу гепатиту В	
Схема проведення ІФА на прикладі тест-системи "DIA-Тохо-IgM для визначення IgM проти токсоплазм (IgM-пастка)	
Обладнання, необхідне для роботи з імуноферментними тест-системами	
Вимоги та рекомендації при проведенні досліджень методом ІФА	
Якісна підготовка посуду	
Підготовка досліджуваних зразків	
Дотримання інструкції щодо застосування тест-системи	
Дотримання інструкції щодо стану приміщень, де зберігаються тест-системи та проводяться	

дослідження методами ІФА	
Дотримання термінів та умов зберігання наборів	
Неприпустимість змішування компонентів з наборів різних серій	
Загальні рекомендації, дотримання яких сприяє якісному проведенню аналізу	
Правила роботи з автоматичною піпеткою	
Дотримання температурного режиму та часу інкубації	
Відмивання планшета на кожному етапі проведення ІФА	
Правила роботи з кон'югатами та проявниками	
Періодичний контроль роботи обладнання	
Дії при несподіваних порушеннях робочого режиму	
Облік результатів ІФА	
Оцінка діагностичних характеристик імуноферментної тест-системи	
Проблеми, що можуть виникнути при проведенні ІФА	
Список літератури	
Додаток. Перелік тест-систем, що випускаються підприємством АТЗТ НВК «ДіаПроф Мед»	