

## ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДУ ДЛЯ СКРИНІНГУ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОНТАМІНАНТІВ У ПРОДУКТАХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

*Д. В. Янович, З. С. Засадна, С. М. Кіслова, О. М. Паздерська, Н. А. Майба*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

*Описано можливості використання методу імуноферментного аналізу в галузі контролю за безпекою харчових продуктів, зокрема аналізу сировини тваринного походження на вміст залишків ветеринарних препаратів та контамінантів. Систематизовано фактори, які впливають на точність одержаних результатів аналізу, розглянуто причини найбільш поширених помилок та способи їх вирішення.*

Імуноферментний аналіз (ІФА), що виник більше двадцяти років тому на перетині імунохімії та інженерної ензимології, став на нинішній день одним із найбільш розповсюджених методів досліджень у галузі клінічної біохімії, при діагностиці захворювань рослин і тварин, визначенні залишкових кількостей токсикантів та забруднювачів продуктів тваринного походження. Цей метод вигідно вирізняється серед інших скринінгових методів високою чутливістю, специфічністю, простою та швидкістю виконання, доступністю і стабільністю реагентів, можливістю комп'ютерної обробки результатів вимірювань та автоматизації етапів виконання аналізу, що забезпечує високу продуктивність випробувань.

Найбільш розповсюджена модифікація методу ІФА — конкурентний твердофазний аналіз, реалізована в широкому асортименті тест-наборів, які застосовують для скринінгових досліджень багатьма лабораторіями незалежно від їх продуктивності та рівня матеріального забезпечення. Ефективне застосування методу ІФА описано в ряді наукових джерел, а також регламентовано для застосування у статусі офіційних скринінгових методів у багатьох країнах ЄС та в США [1].

**Матеріали і методи.** У ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, протягом тривалого періоду широко використовуються тест-системи для гетерогенного імуноферментного аналізу (ELISA — enzyme-linked immune-sorbent assay) провідних європейських виробників, таких, як, Рідаскрин R-Biopharm (Німеччина) та EuroProxima (Нідерланди). Цей метод застосовується лабораторією інструментальних методів контролю для різних випробувань, у тому числі для моніторингу кормів і продуктів тваринного походження на наявність залишків різних фармакологічних груп ветеринарних препаратів та токсикантів.

**Результати й обговорення.** Починаючи з 2002 року, лабораторією інструментальних методів контролю модифіковано, апробовано та валідовано близько 40 скринінг-методик для кількісного визначення залишкових кількостей гормонів, антибіотиків, мікотоксинів, які в подальшому були оформлені у методичні вказівки та затверджені наказами Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України [2]. Серед існуючих скринінг-методів аналізу, ІФА є найбільш чутливим і забезпечує нижню межу визначення таких речовин, як хлорамфенікол, у зразках на рівні 0,05 мкг/кг, що відповідає світовим вимогам і дорівнює чутливості таких арбітражних методів як РХ/МС/МС за значно вищої продуктивності, простоти виконання та меншої собівартості [3]. За період 2002–2013 рр. у нашій лабораторії ІФА метод був застосований для аналізу 4600 зразків сухого молока, 390 — молочної сироватки, 8087 — м'яса на наявність залишкових кількостей хлорамфеніколу, тетрацикліну

та 2780 — меду на виявлення залишкових кількостей хлорамфеніколу, тетрациклінів, стрептоміцину, метаболітів нітрофуранів, сульфаніламідів. Із них було виявлено 780 зразків сухого молока та 25 зразків м'яса, які не відповідали вимогам, через виявлення в них залишків хлорамфеніколу. Починаючи з 2004 р., спеціалістами Інституту було впроваджено методики ІФА в багатьох виробничих лабораторіях підприємств, які виробляють харчові продукти тваринного походження. В першу чергу це стосується підприємств-експортерів меду та молочних підприємств, які виробляють сири і сухі молочні продукти. В ефективності виробничих лабораторій в першу чергу зацікавлені підприємства, орієнтовані на експорт продукції за межі України. Відносно невелика кількість зразків, в яких нами було виявлено залишкові кількості антибіотиків, пояснюється тим, що більшість продукції, яка поступала в ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок для контролю, вже проходила попередній контроль у виробничих лабораторіях підприємств. Всі лабораторії успішно застосовують скринінг-методи завдяки підготовці персоналу виробничих лабораторій, проведеного на базі ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.

Імунні методи, які застосовують для ідентифікації та кількісного визначення антитіл та антигенів застосовують у повній відповідності до рекомендацій європейських референсних лабораторій, які були опубліковані в 2010 році, а вимоги до їх чутливості, точності і специфічності повинні відповідати Рішенню Комісії 2002/657 (ЄС) вимогам щодо ефективності аналітичних методів та інтерпретації отриманих результатів [1]. Недостатність чи відсутність однієї з цих вимог, може стати причиною отримання помилково позитивних або негативних результатів. Для цього необхідно строго скоординувати всі етапи процесу лабораторної діагностики: преаналітичного, аналітичного і постаналітичного. На будь-якому з цих етапів можуть виникати помилки, які будуть мати в подальшому суттєвий вплив на отриманий результат. Помилки преаналітичного етапу пов'язані з відбором зразків продукції на виробництві, умовами їх транспортування, підготовкою зразків до виконання досліджень. Помилки аналітичного етапу – виникають в процесі проведення аналізу. Помилки постаналітичного періоду, пов'язані з можливими неточностями при інтерпретації результатів. Тому виконання скринінг-методів на високому методичному рівні згідно вимог “належної лабораторної практики” потребує глибокого розуміння можливих джерел помилок та шляхів їх подолання. Метою даної публікації є висвітлення основних причин помилок при проведенні власне етапу аналізу, поза преаналітичним етапом досліджень, з врахуванням специфіки кожної окремої модифікації методики ІФА. Переважно на цей етап припадає близько 60% часу, затраченого на лабораторні дослідження в цілому.

Для кращого сприйняття, аналітичний етап, тобто проведення імуноферментного аналізу, можна розбити на наступні етапи: імунна реакція, промивання твердої фази, ферментативна реакція з наступним її блокуванням, облік та оцінка результатів дослідження.

Для початку необхідно звернути увагу на застереження, які допоможуть уникнути загальних помилок у роботі. Щоб запобігти взаємного забруднення реактивів, для роботи використовують тільки одноразові наконечники, змінюючи їх для кожного стандарту, зразків та реактивів. Тільки одноразове використання всього розхідного матеріалу для проведення аналізу — це найбільш простий спосіб, для отримання точних результатів. Дозатори для проведення аналізу потрібно регулярно калібрувати гравіметричним способом із використанням дистильованої води за температури 20–22 °С. Перед виконанням аналізу всі реактиви тест-системи доводять до кімнатної температури, а після закінчення — охолоджують до температури 2–8 °С. У зв'язку з тим, що розчини стандартів та хромогену світлочутливі, необхідно уникати попадання прямих сонячних променів на флакони з розчинами та планшет після внесення відповідних розчинів у чарунки.

Практично всі реактиви, необхідні для постановки імуноферментного аналізу, є наявні в наборі та готові до використання, що дає додаткову можливість для стандартизації умов проведення аналізу. Однак, перед початком роботи необхідно перевірити термін

придатності всіх реактивів набору і порівняти з терміном, вказаним на упаковці. Не можна використовувати протерміновані тест-системи, навіть за умови індивідуальної придатності окремих реактивів. Умови зберігання набору вказані в його інструкції.

Оскільки на першому етапі постановки ІФА досліджують велику кількість попередньо підготовлених зразків, може виникнути плутанина при внесенні їх у чарунки. Щоб попередити це, необхідно перед початком аналізу створити форму протоколу послідовності внесення зразків у чарунки планшета. Складений протокол дозволить значно полегшити також інтерпретацію результатів дослідження.

У більшості випадків імунну реакцію проводять за кімнатної температури, тобто 20–25 °С. Саме на таку температуру розрахований термін проведення інкубації, вказаний у відповідній інструкції. Однак, у зимовий період температура повітря в лабораторії може коливатись в межах 15–20 °С, що призводить до сповільнення ферментативної реакції, що, в свою чергу, веде до зниження чутливості проведеного аналізу та отримання недостовірних даних. У літній період підвищення температури може призвести до пришвидшення всіх реакцій, що може стати причиною отримання завищеного або заниженого сигналу, а також до зміни кінетичних параметрів реакції антиген/антитіло. Для стабілізації умов проведення ІФА рекомендується використовувати термостат, настроєний на температуру 20-25°С. Однак, за умови проведення реакції в термостаті необхідно враховувати зниження загальної вологості, що може призвести до підсихання чарунок та утворення так званого “обідку” на бічних поверхнях. В процедурі промивання не завжди вдається його видалити, що надалі веде до розвитку неспецифічної реакції. Крім того, занадто сухе повітря, внаслідок нерівномірного випаровування вмісту чарунок, може призвести до появи “крайового ефекту”, коли імунна реакція по периметру планшета відбувається більш інтенсивно ніж у центральних чарунках. Такий процес може також спостерігатись за інкубації цілого 96-чарункового планшета в термостаті. Цей ефект зумовлений нерівномірним нагріванням планшета: крайні стрипи нагріваються швидше і довше піддаються впливу підвищеної температури. Це особливо характерно для короткочасної інкубації (30 і менше хвилин).

Після внесення стандартів, зразків та реактивів у відповідні чарунки, необхідно ретельно перемішати вміст планшета згідно вказаній в інструкції процедурі. Це може бути механічне перемішування на відповідних пристроях (струшувачі, шейкери) або ж вручну (легеньке постукування по краю планшета в горизонтальній площині). Недотримання режиму струшування може призвести до недостатнього розподілу реагентів на межі твердої і рідкої фаз.

На етапі промивання планшета проходить видалення незв'язаних баластних реагентів (наприклад, кон'югату, якого в реакційну суміш вносять у надлишку). Слід мати на увазі, що якість відмивання планшета – один з вирішальних чинників у проведенні ІФА, а тому необхідно детально дотримуватись вимог інструкції. Якщо планшет промивають дистильованою водою, в першу чергу необхідно звернути увагу на її якість та чистоту спеціальних ємностей. Незадовільна якість води може стати причиною високих фонів оптичної густини в усіх чарунках (так званий “хибнопозитивний” результат) Для уникнення таких помилок краще послуговуватись бідистильованою водою або перед використанням прокип'ятити дистильовану воду протягом 10–15 хв. у відкритому посуді та дати їй відстоятись. Необхідно строго слідкувати за об'ємом внесеного промивного розчину, періодом часу між заповненням чарунок та видаленням промивного розчину з них (не менше 30 с.), повна чи неповна аспірація чарунок після витрушування, однак, не допускати їх пересихання. Недостатнє промивання, особливо після інкубації з кон'югатом, може призвести до “хибнопозитивних” результатів, оскільки на значення оптичної густини будуть впливати продукти неспецифічного зв'язування і/або баластові домішки. Для запобігання помилок під час промивання імуносорбенту бажано користуватись спеціальним пристроєм для промивання (вошер) або здійснювати промивання автоматичним і/або багатоканальним

дозатором для створення відповідного тиску промивної рідини. Велике значення має також внесення достатнього об'єму промивної рідини у кожен чарунку планшету. Показано, що число “хибнопозитивних” результатів ІФА знаходиться в прямій залежності від об'єму промивного розчину, внесеного в кожен чарунку. За умови використання об'єму промивного розчину від 150 до 250 мкл на чарунку кількість “хибнопозитивних” реакцій практично зводиться до нуля.

Оскільки розчин субстрат/хромогену є світлочутливий, то після внесення його в чарунки планшету реакцію необхідно проводити в темряві. Час проведення реакції чітко обумовлений в інструкції і повинен строго дотримуватись, щоб уникнути “недо-“ або “перепроявлення”, що відповідно призводять як до “хибнонегативних”, так і “хибнопозитивних” результатів аналізу.

Облік результатів аналізу здійснюють за вимірювання оптичної густини розчинів у чарунках планшету після призупинення ферментативної реакції внесенням “стоп-реагенту” (розчину сірчаної кислоти). Необхідно звернути увагу на величину оптичної густини, вимірюваної в чарунці з нульовим стандартом: якщо величина її не перевищує 0,6, то реактиви даної тест-системи визнаються зіпсованими, а отримані результати не можуть вважатись достовірними.

При виконанні методу ELISA критичною точкою у послідовності дій є оцінка придатності одержаного калібрувального графіка, за яким порівнюються значення вимірювання оптичної щільності дослідних зразків до значень стандартних зразків порівняння. За конкурентного ELISA визначають антигени невеликої молекулярної маси з одним епітопом. Залежність величини сигналу, що визначається, від концентрації аналіту за проведення аналізу практично завжди носить нелінійний характер. У випадку конкурентного аналізу калібрувальним графіком без будь-яких математичних перетворень складно користуватись в зв'язку з сильною крутизною кривої, що утруднює точність геометричного визначення низьких концентрацій аналіту. При використанні для побудови графіка оригінальних значень сигналу (оптичну щільність розчину після зупинки ферментативної реакції) і натуральних (або десяткових) логарифмів концентрацій часто вдається добитись суттєвої лінеарізації калібрувального графіка. За цих умов збільшується точність перерахунку низьких концентрацій аналіту, оскільки дана область калібрувального графіка ніби “розтягується” [4]. Невідповідність одержаного калібрувального графіку допустимим середнім значенням еталонного графіка представленого фірмою-виробником, може значною мірою негативно вплинути на одержані результати.

Для регулярного контролю та стандартизації умов проведення імуноферментного аналізу всередині лабораторії, пропонується постійно використовувати одні і ті ж, як позитивні, так і негативні контролю, які будуть виконувати роль внутрішньолабораторних стандартів.

Основні помилки за виконання аналітичного етапу і їх можливі наслідки на постаналітичному етапі імуноферментного аналізу перелічені в таблиці.

## Основні помилки при проведенні імуноферментного аналізу та способи їх усунення

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Передбачувані причини	Способи усунення проблем
Чистота відтворення повторів	У самому дослідженні	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Недостатньо відмиті чарунки</li> <li>2. Недостатнє перемішування реактивів у чарунках</li> <li>3. Помилка в процесі дозування, пошкодження поверхні чарунки наконечником, пухирці повітря в чарунці</li> <li>4. Псування реактивів</li> <li>5. Невідтворюваність результатів</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ретельно промивати чарунки</li> <li>2. Гарантувати адекватне перемішування вручну</li> <li>3. Стандартизувати дозатори, перевірити техніку піпетування</li> <li>4. Перевірити термін зберігання реактивів</li> <li>5. Повторити визначення з використанням референс-зразків</li> </ol>
Вірогідність калібрувальної кривої	Значення ОГ вище від вказаного в сертифікаті або виходять за межі	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Використання реактивів з наборів інших серій</li> <li>2. Неправильне розведення стандартів, кон'югату або антигін</li> <li>3. Помилки в процесі дозування</li> <li>4. Не дотримано терміну інкубації та температурного режиму</li> <li>5. Недостатньо промиті чарунки, кількість промивного розчину значно менше норми. Верхня частина чарунок погано промита.</li> <li>6. Дефект фотометра</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Не користуватися реактивами з інших тест-систем або інших серій</li> <li>2. Переконайтесь у відповідності буферу та правильності розведення</li> <li>3. Стандартизувати дозатори</li> <li>4. Ретельно дотримуватись вказаних умов інкубації</li> <li>5. Ретельно промивати чарунки, контролювати об'єм використаного промивного розчину та чітко дотримуватись кількості промивних кроків</li> <li>6. Перевірити лампу, довжину хвилі і прокалібрувати фотометр</li> </ol>
	Значення ОГ нижчі від вказаних у сертифікаті	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Неправильне розведення стандартів, кон'югату або стандартів, використання реактивів із наборів інших серій</li> <li>2. Псування реактивів, недотримання умов зберігання тест-системи</li> <li>3. Не дотримання терміну та температурного режиму інкубації</li> <li>4. Неповна аспірація лунок після промивання</li> <li>5. Пересихання планшета між етапами реакції</li> <li>6. Дефект фотометра</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Переконайтесь у відповідності буферу та правильності розведення, не користуйтеся реактивами з інших тест-систем або інших серій</li> <li>2. Перевірити термін і умови зберігання реактивів та тест-системи</li> <li>3. Ретельно дотримуватись вказаних умов реакції</li> <li>4. Старанно витрушувати залишки промивного розчину</li> <li>5. Заздалегідь готувати компоненти для проведення наступного етапу реакції</li> <li>6. Перевірити лампу, довжину хвилі і прокалібрувати фотометр</li> </ol>
Нестандартний колір реакції	Колір реакції у всіх лунках однаковий	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Псування реактивів</li> <li>2. Контамінація буферу для промивки чарунок</li> <li>3. Неповне перемішування реактивів у чарунках</li> <li>4. Недотримання терміну та температурного режиму інкубації</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Перевірити термін та умови зберігання реактивів. Перегрітий реактив не дає преципітації.</li> <li>2. Переконайтесь у відсутності осаду в буфері. Перевірити значення рН.</li> <li>3. Гарантувати адекватне перемішування вручну.</li> <li>4. Ретельно дотримуватись вказаних умов інкубації</li> </ol>
	Всі чарунки безколірні	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Псування кон'югату або кольорового реактиву</li> <li>2. Використання реактивів із наборів іншої серії</li> <li>3. Відсутність одного з реактивів або переплутана послідовність внесення реактивів</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Перевірка шляхом змішування реактивів (10 мкл кон'югату, 100 мкл субстрат/хромогену). Суміш повинна негайно дати забарвлення.</li> <li>2. Використовувати реактиви тільки даного набору</li> <li>3. Перечитати інструкцію до тест-системи і повторити дослідження.</li> </ol>

## ВИСНОВКИ

Однак, попри всі позитивні характеристики імуноферментного аналізу, наведені в даній статті, необхідно пам'ятати, що вказаний метод є тільки скринінговим, тобто методом

виявлення позитивних зразків, що містять залишки препаратів на рівні, що перевищує встановлені максимально допустимі рівні або мінімально необхідні межі визначення з загальної маси зразків. Для підтвердження отриманих результатів нами розроблено ряд методів підтвердження (РХ/МС/МС; ВРХ; ГХ/МС) для виявлення залишкових кількостей ветеринарних препаратів у харчових продуктах. Так, із застосуванням з 2006 року методу рідинної хроматографії з тандемним мас-спектрометричним детектуванням РХ/ МС/МС, з'явилась можливість провести ретроспективну перевірку наявних в лабораторії арбітражних зразків сухого молока. Результати проведених випробувань ще раз довели, придатність скринінгового метода виявляти перевищення МДР та МНМВ в продукції.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується провести узагальнення результатів, отриманих співробітниками лабораторії в процесі валідації імуноферментного методу для різних матриць та аналізів.

## **APPLICATION ELISA ANALYSIS FOR SCREENING RESIDUAL QUANTITY VETERINARY MEDICINES AND CONTAMINANTS IN ANIMAL PRODUCTS**

*D. Yanovych, Z. Zasadna, S. Kislova, O. Pazderska, N. Maiba*

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additive

### **S U M M A R Y**

This article describes the use of the ELISA method in the control of food safety, including the analysis of products of animal origin on the content of residues of veterinary drugs and contaminants. Systematized the factors that affect the accuracy of the results of analysis, examined the causes of the most common errors and their solutions.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ СКРИНИНГА ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ И КОНТАМИНАНТОВ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*Д. Янович, З. Засадна, С. Кислова, О. Паздерска, Н. Майба*

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

### **А Н Н О Т А Ц И Я**

В статье описана возможность использования иммуноферментного метода при контроле безопасности продуктов питания, в частности анализа сырья животного происхождения на содержание остатков ветеринарных препаратов и контаминантов. Систематизированы факторы, которые влияют на точность полученных результатов анализа, рассмотрены причины наиболее распространенных ошибок и способы их решения.

### **Л І Т Е Р А Т У Р А**

1. Commission Decision 2002/657 of August 2002 Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657 (EC)).

2. Методичні вказівки з оцінки придатності методик імуноферментного аналізу для скринінгового визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднювачів у харчовій сировині тваринного походження: Методичні вказівки / І. Я. Коцюмбас, Д. В. Янович, З. С. Засадна та ін. — Л., 2011. — 23 с.

3. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.

4. *Свежова Н. В.* Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. I. Теоретические основы /Н. В. Свежова, В. Е. Шаркова, Д. Б. Громов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 1. — С. 3–9.