



Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького  
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj

doi:10.15421/nvlvet6643

ISSN 2413–5550 print  
ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 574.6

## Характеристика можливостей імуноферментного аналізу

Н.П. Шемедюк  
natshem@bigmir.net

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,  
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна*

*Розвиток біотехнологій у сучасному світі є вирішальним для розв'язання першочергових завдань медицини, фармакології, сільськогосподарства, екології, різних галузей промисловості, зокрема харчової. Актуальною є розробка підходів та засобів аналітичної біотехнології із застосуванням моноклональних антитіл (МКА).*

*Забруднення кормів тварин мікотоксинами, активне використання антибактеріальних засобів, стимуляторів росту у тваринництві, що забезпечує сировиною харчову промисловість, обумовлює необхідність впровадження оптимальних методів аналітичного контролю якості продуктів харчування. Інші важливі питання – діагностика захворювань людини, контроль стану довкілля. Відкриття МКА, імуноферментного аналізу (ІФА) є одними із шляхів вирішення цих питань. Порівняно низька собівартість, нетривалий час виконання аналізу, недороге обладнання дає можливість застосовувати ІФА у різних сферах діяльності, мотивує до вдосконалення.*

*Зробивши висновок щодо можливостей і застосування методу, надалі обговорюватимуться окремі його особливості та наявні на ринках пропозиції щодо реагентів, обладнання ІФА.*

**Ключові слова:** метод ІФА, методи дослідження, тест–система, чутливість, специфічність, контроль якості, діагностика, антитіла, антигени.

## Характеристика возможностей иммуноферментного анализа

Н.П. Шемедюк  
natshem@bigmir.net

*Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого,  
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина*

*Развитие биотехнологии в современном мире имеет важное значение для решения вопросов медицины, фармакологии, сельскохозяйственной промышленности, экологии, других отраслей промышленности, в том числе пищевой. Актуальной является разработка подходов и средств аналитической биотехнологии с применением моноклональных антител (МКА).*

*Загрязнение кормов микотоксинами, активное использование антибактериальных средств, стимуляторов роста в животноводстве, которое обеспечивает сырьем пищевую промышленность, обуславливает необходимость внедрения оптимальных методов аналитического контроля качества продуктов питания. Другие важные вопросы – диагностика заболеваний человека, контроль состояния окружающей среды. Открытие МКА, иммуноферментного анализа (ИФА) является одним из путей решения этих вопросов. Сравнительно низкая себестоимость, непродолжительное время выполнения анализа, недорогое оборудование дает возможность применять ИФА в различных сферах деятельности, мотивирует к совершенствованию.*

**Ключевые слова:** метод ИФА, методы исследования, тест–система, чувствительность, специфичность, контроль качества, диагностика, антитела, антигены.

### Citation:

Shemediuk N. (2016). Description possibilities of elisa. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 2(66), 212–216.

## Description possibilities of elisa

N. Shemediuk  
natshem@bigmir.net

Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies named after S. Gzhytskyj,  
Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

*Development of biotechnologies in modern world is one of the pressing questions in medicine, pharmacology, agriculture, ecology progres, different spheras of industry in particular food. In fact, development of approaches and facilities of analytical biotechnology with application of monoklonal antibodies (MKA) are actual nowadays.*

### Contamination

*of animal forages by mikotoxins, active using of antiinfectives, growthfactors in a stockraising (that provides raw material for food industry) stipulates thenecessity of introduction optimal methods of analytical control of foodstuffs quality. Diagnostics of man diseases, control of the environment state are other important questions. The MKA, ELISA are ways of decision these questions. Comparatively subzero prime price, short duration time of analysis implementation, an inexpensive equipment explains to perfection, gives an opportunity to apply ELISA–test in different spheras of activity.*

**Key words:** ELISA, research methods, sensitiveness, specificity, control of quality, diagnostics, antibodies, antigens, test–system.

### Вступ

ІФА є офіційним методом контролю продуктів тваринництва у країнах Євросоюзу. Вперше цей метод застосовано у гістохімії. Метод ІФА чи ELISA–тест (*enzyme linked immunoadsorbent assay* – визначення за допомогою імуносорбентів, пов’язаних з ферментами) запропоновано у 1971 році Е. Енгвалл та Р. Перлманом для аналізу фракції імуноглобулінів G. Незалежно від них Ван Веємен і Р. Шурс ІФА досліджували естрогени (Engvall and Perlman, 1971). Методики ELISA кількісно та якісно дають можливість ідентифікувати біологічні компоненти (гормони, ферменти, нейропептиди, продукти імунної системи, антигени тощо) за низьких концентрацій у зразку:  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М (Samuilov, 1999).

Метою є характеристика можливостей ІФА, порівняння чутливості, специфічності, економічної обґрунтованості альтернативних методів дослідження. Завдання роботи: аналіз переваг і недоліків ІФА, сфер застосування методу, порівняння з іншими традиційними методами дослідження.

Використання у тваринництві, птахівництві й рибистві гормональних активних стимуляторів росту й тиреостатиків (табл. 1) негативно відображається на здоров’ї людини. Наприклад, вміст у продуктах харчування стильбенів, стероїдних гормонів є причиною канцерогенезу, порушення статевого дозрівання та репродуктивності, а тиреостатики порушують функцію щитовидної залози й провокують алергію. Деякі катехол–метаболіти спричиняють вільнорадикальне окиснення ДНК у культурі клітин й тест–системі лабораторна тварина. Доведено токсичну, алергенну, мутагенну та онкогенну дію на організм людини і тварини гербіциду 2,4–дихлорфеноксиоцтова кислота. Значна кількість речовин (табл. 1) має віддалені ефекти: тератогенний, мутагенний, ембріотоксичний, канцерогенний. Для них характерною є імуносупресивна дія та відсутність сенсibiliзуючих властивостей. Такі препарати не відразу руйнуються у печінці тварин, продукти їх трансформації зберігаються у м’ясних, молочних продуктах, інформацією про вміст яких необхідно володіти.

Таблиця 1

### Деякі речовини, для ідентифікації яких у продуктах тваринного походження розроблено методики ІФА

Групи речовин	Речовини, які можливо ідентифікувати у продуктах тваринного походження ІФА
Гормони	тестостерон, 17β–естрадіол, зеранол, кленбутерол, диетилстильбестрол, медроксипрогестерон, ацетилгестагени
Антимікробні речовини	доксидиклін, фуразолідон, фуралотодон, фурадонін, тетрацикліни, стрептоцид, сульфагуанідин, сульфадіазин, сульфатіазол, сульфамеразин, нітрофуран, сульфаметазин, левоміцетин, сульфаметоксазол, ампіцилін, норсульфазол, сульфаметоксипіридазин, сульфадиметоксин, сульфаклорпіразин, бензилпеніцилін, амоксицилін, флоксацилін, стрептоміцин, окситетрациклін
Мікотоксини	афлатоксини, афлатоксин В1, фумонізін, токсин Т–2, деоксиніваленол, афлатоксин М1, охратоксин А, зеараленон
Протипаразитичні препарати	івермектин, фенбендазол
Пестициди	синтетичні піретроїди, сим–триазини, 2,4–дихлорфеноксиоцтова кислота

Існують тест–системи ІФА RIDASCREEN® (R–Biopharm, Німеччина), призначені для кількісного визначення концентрації свинини у харчових продуктах, тест–системи «Хема» (Росія) – для визначення сої, арахісу, лісового горіха, мигдалю, селери, глютену, грецького горіха, гірчиці, риби, люпину, ракоподібних,

молосків. Тест–системи «Beacon Analytical Systems Inc.» (США); «Envirologix Inc.» (США); «Хема» (Росія) застосовують для визначення залишкової кількості шкідливих речовин у продуктах харчування.

Традиційно контроль концентрації ксенобіотиків у продуктах харчування здійснюють фізико–хімічними

методами аналізу: газова, газорідина і високоефективна рідина хроматографії. Ці методи досить ефективні для ідентифікації речовин. Позаяк, вони мають ряд істотних недоліків – трудомісткість, складність, тривалість аналізу, необхідність використання дорогого устаткування і залучення висококваліфікованого персоналу (Oellerich, 1980; Harris et al., 1998). Їх собівартість на 28% перевищує вартість ІФА. Аналізуючи

табл. 2 і 3 можна зробити висновок про те, що чутливість ELISA не є нижчою, ніж чутливість хроматографічних методів дослідження і придатний до аналізу залишку речовин у біоматеріалі (Janovich, 2013; Janovich, 2014). Забруднення їжі, води й інших об'єктів навколишнього середовища, що становить потенційну небезпеку, диктує потребу в простих, недорогих, швидких методах дослідження.

Таблиця 2

**Допустимі дози вмісту деяких препаратів у сировині тваринного походження у країнах ЄС**

Гормональні препарати і стимулятори росту	Допустима доза, мкг/кг (мкг/л)	Мінімальна концентрація речовини, яку можливо визначити у біоматеріалі, ppb (мкг/кг чи мкг/л) ІФА
диетилстильбестрол	0	0,1 (м'ясо); 2 (жовч); 0,2 (сеча); 2,5 (корм)
кленбутерол	0,1 (м'ясо) 0,5 (печінка, нирки) 0,05 (молоко)	0,2 (сеча); 0,04 (м'ясо, печінка); <0,5 (очне яблуко)
зеранол	0	0,5 (м'ясо); 1,5 (сеча)
тестостерон	0,5 (кров)	0,05 (м'ясо); 0,02 (кров)
17β-естрадіол	0,04 (кров)	0,05 (м'ясо); 0,02 (кров)
гестагени (ацетоксипрогестерон, медроксипрогестерон, мегестрол, хлоромадіон)	0	0,3 (жир)

Таблиця 3

**Порівняльна оцінка чутливості методів визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів у міді**

Назва методу (міжнародна аббревіатура)	Вміст залишків субстанцій/груп антимікробних препаратів/ ppb (мкг/кг чи мкг/л)											
	хлорамфенікол		нітрофуран		тетрацикліни		стрептоміцин		сульфатіазол		метонідазол	
	Межі визначення	min	Межі визначення	min	Межі визначення	min	Межі визначення	min	Межі визначення	min	Межі визначення	min
ІФА (ELISA)	0,1–0,15	0,1	0,2–0,5	0,5	3,0–5,0	5,0	3,0–5,0	5,0	2,0–3,0	2,0	0,1–0,2	0,2
Рідина хроматографія з маспектрометричним детектуванням (LC/MS/MS)	0,05–0,1	0,1	0,3–0,5	0,5	1,0–5,0	5,0	5,0–10,0	5,0	1,0–3,0	2,0	0,05–0,2	0,2

min – мінімальні значення вмісту залишків, визначення яких повинні забезпечити методи.

Обов'язковими складовими лабораторної діагностики інфекційних захворювань є класичні методи виділення збудників на відповідних поживних середовищах або у біосистемах з їх ідентифікацією та визначення приросту специфічних антитіл у серологічних реакціях (реакції нейтралізації, гальмування гемаглютинації, зв'язування комплементу, преципітації та ін.). Як правило, ці методи пролонговані у часі. Розвиток захворювання потребує визначеності відносно етіології у більш стислий термін (Oellerich, 1980; Harris et al., 1998; Trohimchuk et al., 2012).

Використовуючи антитіла до специфічної мішені, можна виявити незначні кількості антигенів чи антитіл у біологічних рідинах (плазма та сироватка крові, сеча, слина, молоко тощо), які з'являються в організмі людини під час вірусного або бактеріального захворювання, проаналізувати показники онкомаркерів, цитокінінів, факторів росту, гормонів (Oellerich,

1980). ІФА тест-системи, наприклад, «Vitrotest» (Україна), «DRG Diagnostics» (Німеччина) призначені для виявлення антитіл до аскарид, лямблій, ехінококів та інших паразитів, вірусу герпесу 1–го та 2–го типів, цитомегаловірусу людини, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, а також для вивчення репродуктивної та тиреоїдної функції, діагностики раку, діабету, аутоімунних захворювань людини.

Серед онкомаркерів у практиці найкраще вивчений і широко застосовується альфа-фетопротейн (АФП) (наприклад, тест-системи ТОВ «Бест Діагностик» (Україна). Збільшення концентрації АФП і хоріонічного гонадотропіну людини може свідчити про наявність пухлин яйників. Значне підвищення раково-ембріонального антигену спостерігається в 70 – 75% хворих на рак кишково-шлункового тракту, підшлункової залози, легень, у 50% хворих на рак грудної залози, тіла матки. При підозрі на рак перед-

міхурової залози необхідним є визначення рівня простатичного специфічного антигену (Dovgich et al., 2015).

Діагностику ІФА бажано паралельно проводити з іншим сучасним методом молекулярної біології полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР). Методи ПЛР та ІФА взаємно доповнюють один одного. ІФА базується на виявленні не збудника інфекції, а його продуктів життєдіяльності – білків-маркерів, тому після захворювання ІФА може свідчити хибний позитивний результат, що заперечить метод ПЛР. За допомогою ПЛР у біоматеріалі досліджують наявність

ДНК інфекційних агентів, можливе виявлення ДНК неживих організмів після лікування – хибний результат, який може заперечити ІФА. Переваги ІФА в тім, що синтезовані антитіла виявляються у крові незалежно від місця локалізації збудника. Зразок для аналізу ПЛР не завжди можна отримати із місця локалізації збудника захворювання.

На сьогоднішній день ІФА – це найбільш універсальний, інформативний, економічний метод дослідження та діагностики, що доводить порівняльна табл. 4.

Таблиця 4

**Порівняння основних лабораторних методів дослідження біологічного матеріалу**

Характеристика	ПІФ	ІФА	Бактеріологічний	ПЛР
Чутливість	80–95%	95%	80–100%	95–100%
Специфічність	80–95%	96–99%	100%	95–100%
Потреба у спеціальному обладнанні	Люмінесцентний мікроскоп	Комплект для ІФА	Центрифуга, дотримання умов культивування	Ампліфікатор, обладнання для електрофорезу
Тривалість виконання	2–3 год.	1,5–3 год.	2–14 діб	4,5–8 год.
Читання результатів	Суб'єктивне, втомливе	Об'єктивне, просте	Суб'єктивне, помірно втомливе	Об'єктивне, просте
Собівартість	Висока	Низька	Висока	Висока
Автоматизація	Неможлива	Можлива	Неможлива	Можлива
Недоліки	Наявність власної флуоресценції мікроорганізмів, перехресних імунологічних реакцій, неспецифічне фарбування матеріалу міченими імуореагентами. Можливе виявлення антигенів неживих організмів	Позитивні результати після лікування	Висока собівартість, трудомісткість. Складність транспортування, збереження матеріалу	Висока собівартість. Можливе виявлення ДНК неживих організмів
Переваги	Задовільна достовірність результату за невисокої собівартості	Не залежить від локалізації інфекції	Виявляє тільки живі мікроорганізми	Низька суб'єктивність

У порівнянні з іншими методами дослідження (прямою імуофлуоресценцією (ПІФ), бактеріологічним, ПЛР) значення специфічності і чутливості ІФА близьке до 100% (Levchuk et al., 2008; Dovgich et al., 2012; Zagrebel'nyj et al., 2015). Специфічність тест-систем рекомбінантного типу найвища. Виконання методу, аналіз результатів можуть бути автоматизованими, що зменшить ймовірність помилки у наслідок, так званого, людського фактору, суб'єктивності.

Будь-яку речовину, яка володіє властивостями антигену, можна кількісно визначити ІФА. Для проведення цього методу необхідно мати очищений антиген, специфічне антитіло, фермент як мітку для антигена чи антитіла і засіб реєстрації активності фермента (спектрофотометр). Усі компоненти є складовими тест-систем (діагностикумів), можуть бути стандартизованими. Виконання реакцій методично просте й легко контролюються. Для проведення ІФА використовують автоматичні та напівавтоматичні аналізатори, перевагами яких є: зручність у роботі, швидкість, об'єктивність за рахунок автоматизації обліку результатів, висока специфічність та чутливість, можливість виконання великої кількості аналізів. Автоматизована оцінка реакцій дозволяє стандартизувати метод. Основною ІФА є специфічна взаємодія антитіла з антигеном, при цьому один з компонентів кон'югованих з

ферментом, в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворює забарвлений продукт. Для створення тест-систем необхідно вирішити завдання, що пов'язані з отриманням антигена, антитіла, адсорбованих на твердій фазі; комплексу антиген чи антитіло з ферментом (кон'югат). Необхідно підібрати фермент, який довгий час зберігатиме активність, володітиме високою специфічністю до субстрату. З вище вказаною метою у діагностикумах використовують пероксидазу хрому, лужну фосфатазу та β-галактозидазу *Escherichia coli* (Oellerich, 1980; Samuilov, 1999).

**Висновки**

Основними перевагами ІФА порівняно з іншими методами аналізу є експресивність та висока відтворюваність; відсутність потреби у спеціальному обладнанні та додатковому його обслуговуванні; висока чутливість і специфічність; аналіз великої кількості зразків можна провести вручну або автоматизовано; низька собівартість; немає необхідності у спеціальних навиках персоналу в роботі з проведенням аналізу; можливість стандартизації методу.

*Перспективи подальших досліджень.* Сьогодні метод ІФА використовується для визначення широкого

спектру речовин: гормонів, онкомаркерів, лікарських препаратів у різних біологічних субстратах; наркотиків, бактерій, вірусів і антитіл до них; для дослідження продуктів тваринного, рослинного походження. Є можливість проводити дослідження і виявляти залишкову кількість речовин у продуктах харчування, що сприятиме контролю їх безпеки.

Зробивши висновок щодо можливостей і застосування методу, надалі обговорюватимуться окремі його особливості та наявні на ринках пропозиції щодо реагентів, обладнання ІФА.

#### Бібліографічні посилання

- Engvall, E., Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8, 871–874.
- Harris, A.S., Wengats, I., Wortberg, M., Kreissig, B., Gee, S.J., Hammock, B.D. (1998). Development and application of immunoassay for biological and environmental monitoring. *Multiple Stresses in Ecosystems*. Washington: Lewis Publishers. 135–153.
- Oellerich, M. (1980). Enzyme immunoassay in clinical chemistry. Present status and trends. *J. Clin. Chem. Biochem.* 18, 197–208.
- Dovgich, T.A., Mechev, D.S., Shherbina, O.V., Starchak, N.M., Ovcharenko, V.I. (2015). Rol' radioimmunologichnogo analizu u klinichnij praktici. *Ukraïns'kij radiologichnij zhurnal. T. HHIII*. 3, 55–57 (in Ukrainian).
- Zagrebel'nyj, V.O., Petrenko, O.S., Aleksjejeva, G.B. (2015). Ocinka chutlyvosti imunofermentnogo analizu dlja diagnostyky enzootychnogo lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby. *Veterynarna medycyna Ukraïny*. 3(229), 9–12 (in Ukrainian).
- Levchuk, I.V., Kishhenko, V.A., Golubec', O.V. (2008). Udoskonalennja tehnologii' procesu vyznachenn pestycydiv v nasinni olijnyh kul'tur metodom imunofermentnogo analizu. *Harchova promyslovist'*. 7, 25–28 (in Ukrainian).
- Samuilov, V.D. (1999). Imunofermentnyj analiz. *Sorosovskij obozrevatel'nyj zhurnal*. 12, 9–15 (in Russian).
- Trohimchuk, T.Ju., Ganova, L.O., Ivans'ka, N.V., Maksimenok, O.V., Ribalko, S.L. (2012). Vyznachennja chutlivosti test–sistemi dlja diagnostiki VIL za mizhnarodnimi standartami i v kul'turah klitin, zarazhenih VIL. *Laboratorna diagnostika*. 4(62), 27–30 (in Ukrainian).
- Janovich, D.V. (2014). Vpliv rozvitku suchasnih tehnologij v galuzi harchovoï analitiki na riven' svitovih vimog do pokaznikov jakosti ta bezpeki medu. «Proizvodstvennaja laboratorija». 1(52), 20–23 (in Ukrainian).
- Janovich, D.V. (2013). Koncentruvannja zalishkiv antibiotikov v molochnih produktah glibokoï pererobki. *Molochnoe delo*. 5, 29 (in Ukrainian).

*Стаття надійшла до редакції 19.09.2016*