

Визначення титру антитіл методом ELISA для кашлюкового токсину (PT), філаментного гемаглютиніну (FHA), фімбріального аглютиногену (FIM 2/3) та пертактину (PRN). У планшетах ELISA, покритих антигенами ацелюлярного кашлюку (PRN, PT, FHA або FIM 2/3), готують 2-кратні розведення сироваток для випробовуваної та стандартної вакцин або внутрішнього контролю. У кожному планшеті передбачають стандартну імуносироватку та негативний контроль сироватки мурчаків. До кон'югованих пероксидазою антитіл кроля або кози до IgG мурчаків додають субстрат для пероксидази.

Реактиви та обладнання:

- *Планшети для ELISA*: 96 лунок, 1-12 стовпців, ряди від А до Н.
- *Стандартна імуносироватка мурчака*.
- *Пероксидазний кон'югат*. Кон'юговані пероксидазою антитіла кроля або кози до IgG мурчаків.
- *Антигени Bordetella pertussis* (PRN, PT, FHA або Fim 2/3).
- *Покривний карбонатний буфер рН 9.6*. 1.59 г натрію карбонату безводного Р та 2.93 г натрію гідрокарбонату Р розчиняють в 1000 мл води Р. Отриманий розчин розливають у флакони місткістю 150 мл та стерилізують автоклавуванням за температури 121 °С протягом 15 хв.
- *Фосфатно-сольовий буфер рН 7.4 (PBS)*. 80.0 г натрію хлориду Р, 2.0 г калію гідрофосфату Р, 14.3 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 2.0 г калію хлориду Р перемішуючи розчиняють в 1000 мл води Р. Зберігають за кімнатної температури, щоб запобігти кристалізації. Перед застосуванням розчин розводять е 10 разів водою Р.
- *Розчин кислоти лимонної*. 10.51 г кислоти лимонної Р розчиняють в 1000 мл води Р та доводять рН розчину до 4.0, використовуючи розчин 400 г/л натрію гідроксиду Р.
- *Промивний буфер*. PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р.
- *Блокувальний буфер*. PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р та 25 г/л сухого знежиреного молока.
- *Субстрат пероксидази*. Незадовго до використання 10 мг діамонію 2,2'-азинобіс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонату) Р (ABTS) розчиняють в 20 мл розчину кислоти лимонної. Безпосередньо перед використанням додають 5 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.

Метод. Нижче як приклад наведено опис розкладки (схема) планшета, але можна це провести інакше. Лунки 1 А-Н використовують для негативної контрольної сироватки, лунки 2-12 А-Н — для стандартної сироватки мурчаків (зазвичай у двох повторностях) та індивідуальних сироваток мурчаків, імунізованих випробовуваною чи будь-якою стандартною вакциною або внутрішнім контролем.

Кожну лунку планшета для ELISA покривають 100 мкл відповідного розчину антигена (PT, FHA

та Fim 2/3 у концентрації 2 мкг/мл та PRT у концентрації 4 мкг/мл у покривному карбонатному буфері рН 9.6). Інкують протягом ночі за температури 4 °С у вологому середовищі. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта, більше 4 планшетів у висоту не складають. На наступний день ретельно промивають планшети промивним буфером. Планшети блокують, додаючи в кожен лунку по 150 мкл блокувального буфера. Інкують у вологому середовищі за температури 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають промивним буфером. По 100 мкл блокувального буфера додають в кожен лунку крім ряду А. Готують додатні розведення індивідуальних зразків сироваток випробовуваної та стандартної вакцин, стандартної імуносироватки та негативного контрольного зразка сироватки. Розподіляють негативну контрольну сироватку по стовпцю 1, стандартну імуносироватку принаймні по 2 інших стовпцях. До решти стовпців окремо розподіляють сироватку випробовуваної та стандартної вакцин. Додають по 100 мкл кожної сироватки до перших 2 лунок відповідного стовпця. Використовуючи мультіканальну мікропіпетку, роблять двократне серійне розведення від ряду В вниз до ряду Н, переносячи по 100 мкл з однієї лунки до наступної. Відбирають 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Інкують за температури 37 °С протягом 2 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. Готують додатне розведення кон'югата пероксидази в блокувальному буфері та додають по 100 мкл в кожен лунку. Інкують за температури 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. До кожної лунки додають по 100 мкл субстрату пероксидази. Витримують за кімнатної температури в захищеному від світла місці протягом 30 хв. Планшети переглядають за довжини хвилі 405 нм в тому самому порядку, в якому додавали субстрат.

2.7.17. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТРОМБІНУ ІІІ ЛЮДИНИ

Кількість антитромбіну ІІІ у випробовуваному препараті визначають порівнянням його здатності до інактивації тромбіну в присутності надлишкової кількості гепарину з такою ж здатністю стандартного препарату концентрата антитромбіну ІІІ людини, каліброваного в міжнародних одиницях (МО). Різні кількості випробовуваного препарату змішують з певною кількістю тромбіну та визначають активність залишкової кількості тромбіну з використанням відповідного хромогенного субстрату.

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту концентрату антитромбіну ІІІ людини. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.