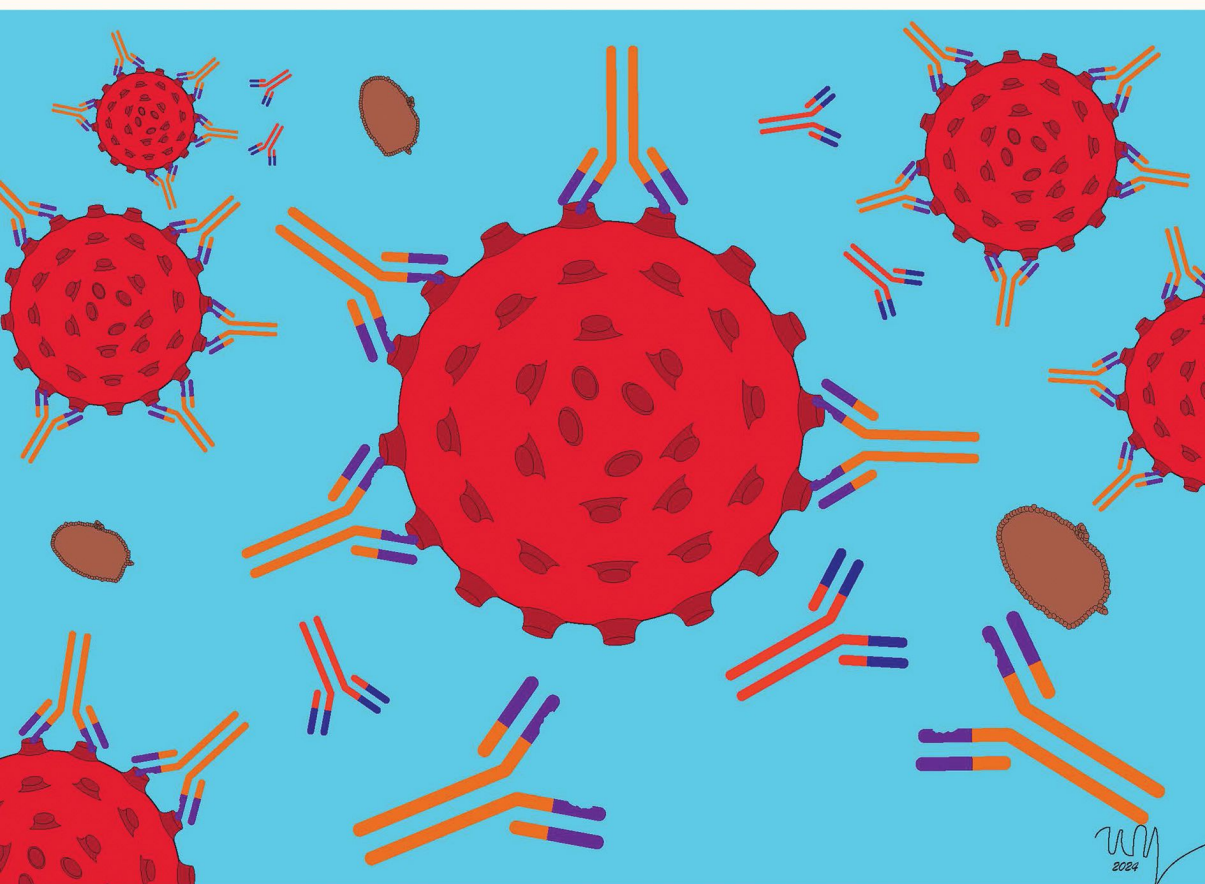




Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

ПРАКТИКУМ ЗА ВЕЖБИ ПО ВЕТЕРИНАРНА ИМУНОЛОГИЈА

проф. д-р Искра Цветковиќ
ас. Ивана Шикоска
проф. д-р Славчо Мреношки



Скопје, 2024

ПРАКТИКУМ ЗА ВЕЖБИ ПО ВЕТЕРИНАРНА ИМУНОЛОГИЈА

Автори:

проф. д-р Искра Цветковиќ, вонреден професор, Катедра за микробиологија и имунологија, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

ас. Ивана Шикоска, асистент, Катедра за микробиологија и имунологија, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Славчо Мреношки, редовен професор, Катедра за микробиологија и имунологија, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Рецензенти:

проф. д-р Јаков Нишавиќ, редовен професор, Факултет за ветеринарна медицина, Универзитет во Белград, Србија

проф. д-р Тадеј Маловрх, редовен професор, Ветеринарен Факултет, Универзитет во Љубљана, Словенија

Лектор:

Дијана Ристова

Уредник:

проф. д-р Искра Цветковиќ

Илустратор:

проф. д-р Игор Улчар

Издавач:

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Графички дизајн:

Марија Арсовска

Тираж

30 примероци

Печати:

Графопром Битола ДООЕЛ - Битола

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

636.09:616-097(076)

636.09:612.017(076)

ЦВЕТКОВИЌ, Искра

Практикум за вежби по ветеринарна имунологија / Искра Цветковиќ, Ивана Шикоска, Славчо Мреношки ; [илустратор Игор Улчар]. - Скопје : Универзитет "Св. Кирил и Методиј" во Скопје, Факултет за ветеринарна медицина, 2024. - 84 стр. : илустр. ; 29 см

Библиографија кон главите

ISBN 978-9989-774-45-4

1. Шикоска, Ивана [автор] 2. Мреношки, Славчо [автор]

а) Ветеринарна имунологија -- Практикуми

COBISS.MK-ID 64866053

Предговор

Овој практикум за вежби по ветеринарна имунологија е наменет за студентите на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје. Практикумот содржи 15 вежби согласно наставната програма, кои ќе им овозможат на студентите да се запознаат со основните имунолошки техники и нивната примена во дијагностика на болести кај животните.

Во практикумот се обработени основните карактеристики, принципот и начините на изведување на имунолошките тестови како и нивната дијагностичка апликација во зависност од намената и епидемиолошкиот контекст во кој се применуваат.

Секоја практична вежба е структурирана така што започнува со краток теоретски вовед. Потоа, следи објаснување на методологијата со детални инструкции за изведување на методот. Богатиот илустративен материјал ќе им помогне на студентите полесно да ги визуелизираат имунолошките процеси и техники. На крајот од секоја вежба е дадено објаснување за толкување на резултатите, со што студентите ќе научат како да ги анализираат добиените резултати од дијагностичките тестови.

Се надеваме дека овој практикум ќе им овозможи на студентите полесно следење и совладување на практичната настава по предметот ветеринарна имунологија.

Скопје, октомври 2024 година

Авторите

Содржина

1. Вовед во серолошките реакции.....	6
2. Моноклонски антитела.....	10
3. Радиоимунолошки проби.....	13
4. Имунофлуоресцентни тестови.....	15
5. Имуноензимски тестови.....	20
6. Преципитација.....	26
7. Титрација на антитела.....	34
8. Аглутинација.....	37
9. Вирусна хемаглутинација и нејзина инхибиција.....	45
10. Реакција на врзување на комплементот.....	48
11. Неутрализациски тестови.....	52
12. Тестови за детекција на клеточен имунолошки одговор.....	58
13. Имунохроматографски тестови.....	64
14. Проточна цитометрија.....	73
15. Дијагностичка апликација на имунолошките тестови.....	78

1. ВОВЕД ВО СЕРОЛОШКИТЕ РЕАКЦИИ

ИМУНОЛОШКИ РЕАКЦИИ

Дефиниција

Имунолошки реакции се оние во кои учествуваат најмалку две компоненти: **антигени** од една, и **антитела** одн. **сензибилизирани Т-лимфоцити** од друга страна. Овие компоненти меѓу себе реагираат **само доколку се специфични една за друга**. Исклучок од ова правило се лажно-позитивните вкрстени серолошки реакции.

Принцип и начини на изведба

Во секоја имунолошка постапка, **едната компонента мора да биде позната** како би можела да се идентификува другата, непозната (или испитувана). Тоа практично значи дека со „познат“, лабораториски произведен антиген, се идентификуваат „непознати“ антитела во испитуван серум и обратно. Начинот на изведба на имунолошките тестови може да биде:

- **in vitro** (во лабораториски услови, вон животинскиот организам), што е и најчесто, и
- **in vivo** (кога тестот се изведува на самото испитувано/сомнително на болест животно).

Употреба во ветеринарната медицина

Имунолошките тестови имаат широк опсег на употреба во медицината воопшто, вклучително:

- дијагноза на **заразни болести** и идентификација на нивните **предизвикувачи**;
- откривање на постоење **претходна инфекција**;
- испитување на **имуногени особини** на микроорганизмот или негови протеински производи (на пр. **токсини**);
- проценка на **имунолошката способност** на животинскиот организам;
- дијагноза на **алергиски, автоимуни и имунодефицитарни** заболувања;
- детекција на **преосетливост на организмот** спрема некој микробен алерген;
- дијагноза на **неоплазми**;
- следење **ефикасност на вакцини** и
- дијагноза на **бременост**.

Поделба

Генерално гледано, имунолошките реакции може да се класифицираат во две големи групи (во однос на компонентите кои учествуваат во реакцијата):

- **серолошки реакции** (антиген + антитела) и
- **клеточни имунолошки реакции** (антиген + сензибилизирани Т-лимфоцити).

СЕРОЛОШКИ РЕАКЦИИ/ИСПИТУВАЊА

Дефиниција

Серолошки реакции се оние во кои учествуваат **антиген** и **антитела**. Така се именувани бидејќи како извор на антитела најчесто се користи крвниот серум. За дијагноза на болестите во ветеринарната медицина денес се користат низа серолошки реакции одн. тестови. Многу од нив се изведуваат во специјализираните дијагностички лаборатории, но постојат и комерцијално достапни едноставни тестови дизајнирани за употреба во практиката или од страна на сопственикот на животното.

Манифестација на серолошката реакција

Сите серолошки тестови вклучуваат *in vitro* интеракција на антигенот и антителото. Во некои тестови антигените се големи оформени честички, што овозможува директна визуализација на реакцијата (видливост со голо око или под микроскоп). Но во некои тестови и двете компоненти (антигенот и антителата) се растворливи и определувањето на нивната интеракција бара дополнителна постапка. Во тој поглед, серолошките реакции можат да се сместат во некоја од следните групи:

1. серолошки реакции кои **спонтано** се отчитуваат со видлива промена (на пр. слепување на антигенот во т.н. аглутинати);
2. серолошки тестови чиј исход се проценува со **докажување на влијанието на антителата врз некоја биолошка особина на антигенот** (на пр. неутрализација на бактериски токсини или вируси, каде исходот кој не е видлив се докажува со биолошки опит на животно, во ембрионирани кокошкини јајца или во клеточни култури);
3. реакции каде исходот на реакцијата се визуализира со користење на **обележана (маркирана) но сè уште специфична компонента** (на пр. методите каде се употребуваат обележени антитела со флуоресцентна боја - имунофлуоресценција, или ензим - ELISA и имунопероксидазен тест), и
4. кај некои методи (како што е реакцијата на врзување комплемент, РВК) се користи **додатен индикаторски систем (секундарна реакција)** која го прави видлив исходот на серолошката (*примарна*) реакција.

Вреднување на тестот

Како и за секоја лабораториска дијагностичка процедура, ветеринарите секогаш треба да бидат свесни за вредноста (квалитетот, точноста) на употребениот дијагностички тест. Таа вообичаено се проценува и дефинира преку три параметри:

1. Чувствителност (осетливост, sensitivity)

Се дефинира како *веројатност употребениот тест правилно да ги идентификува болните животни*. Други две дефиниции кои ја дополнуваат и дообјаснуваат чувствителноста на серолошките тестови се: *минималната количина на антитела која може да се детектира со тестот* (аналитичка вредност) *и процентот на животни со специфична болест кои даваат позитивен тест-резултат; негативните резултати кај болните животни се лажно-негативни* (дијагностичка вредност).

2. Специфичност (specificity)

Се дефинира како *веројатноста тестот да ги идентификува оние животни кои се слободни од болеста што се испитува*. Другите две дефиниции кои ја дополнуваат и дообјаснуваат специфичноста на серолошките тестови се: *способноста на тестот да ги разграничи целните антитела од останатите слични антитела одн. да нема вкрстени реакции* (аналитичка вредност) и *процентот на здрави животни кои даваат негативен тест-резултат при што позитивните резултати кај здравите животни се нарекуваат лажно-позитивни* (дијагностичка вредност).

3. Предвидлива вредност

Ја индицира веројатноста дека *тестот правилно ќе го идентификува присуството односно отсуството на болеста т.е. веројатноста дека животните со позитивен тест-резултат се болни/инфицирани, а оние со негативен здрави/без инфекција*.

Контрола и толкување на серолошките тестови

Како што е претходно спомнато, серолошките тестови може да дадат и лажно-позитивни и лажно-негативни резултати.

На пример, тест дизајниран да открие серумски антитела како доказ за изложеност на специфичен антиген, може да биде **лажно-негативен** ако:

- животното има многу ниско ниво на антитела во серумот;
- животното се тестира прерано по изложувањето на антигенот (на пр. рана фаза од инфекцијата/болеста) кога нема доволно време да се развијат серумски антитела на детектибилно ниво, и
- животното не е способно да даде одговор на антитела затоа што е новороденче, имунодефицитно или имunosупримирано.

Лажно-позитивен резултат со применетиот тест може да се добие ако:

- животното има вкрстено-реактивни антитела индуцирани како одговор на друг антиген (микроорганизам) кој дели некои епитопи со испитуваниот антиген;
- животното е вакцинирано со атенуирана верзија на патогенот (се детектираат вакцинални антитела), и
- животното има перзистентен серолошки одговор на антиген/микроорганизам со кое било во контакт претходно, но кој повеќе не е релевантен за моменталната состојба.

За да се избегне погрешното толкување на тестот и да се минимизира поставување погрешна дијагноза, треба да се применува следното:

- секогаш треба да се одбере тест кој има поголема осетливост и специфичност, или добиениот резултат да биде потврден со друг високо поосетлив/поспецифичен тест;
- при секое испитување потребно е да се вклучат и т.н. „контроли“ кои се всушност познато негативни/позитивни антигени и антитела кои ќе дадат вистински позитивна/негативна реакција (т.н. „позитивна контрола“ и „негативна контрола“) и

- толкувањето на серолошките тестови е препорачливо да не се прави само врз серолошкиот резултат туку треба секогаш да се комбинира со други податоци поврзани со животното како возраст, историја на вакцинација и клинички статус.

Библиографија

Tizard, Ian R. *Veterinary immunology* (Tenth edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]

Michael J. Day, Ronald D. Schultz. *Veterinary Immunology - Principles and Practice* (Second Edition). *Chapter 4: Serological Testing*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014

Scott McVey, Melissa Kennedy, M.M. Chengappa, and Rebecca Wilkes (Editors). *Veterinary Microbiology* (Fourth Edition). John Wiley & Sons, Inc., 2022

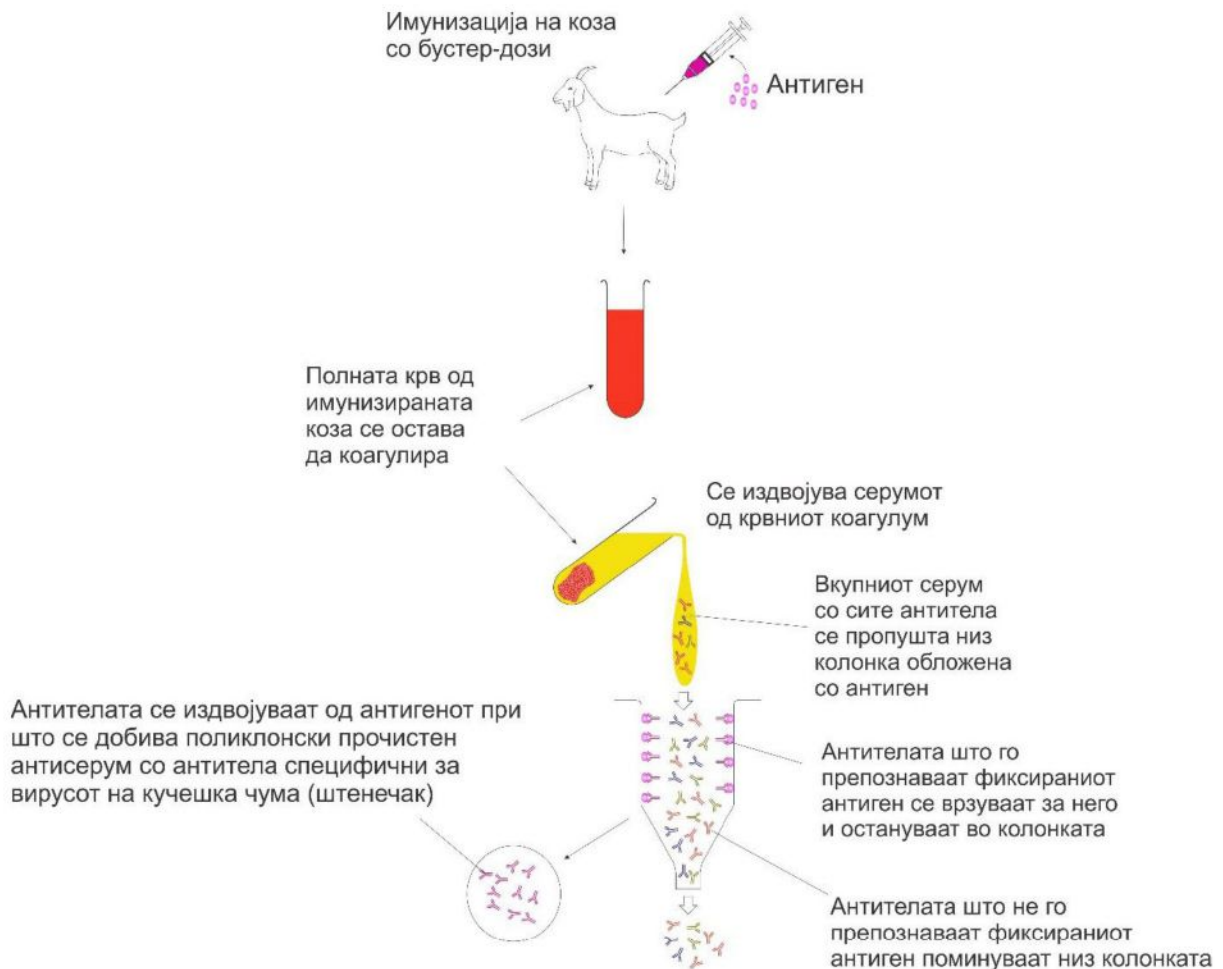
Ajay Grover, Virginia Litwin, And Gabriel Virella. *Diagnostic applications of immunology*. In: Gabriel Virella (Editor). *Medical immunology* [7th edition]. Taylor & Francis, 2020

2. МОНОКЛОНСКИ АНТИТЕЛА

Хуморалниот имунолошки одговор *in vivo* генерира антитела (имуноглобулини) на разни антигени што може да се искористи и *in vitro* за производство на антитела за употреба во лабораториски истражувања и во дијагностички тестови. Два пристапи вообичаено се користат за генерирање на ваквите антитела, и се темелат на инокулација на антигенот од интерес на животни или во клеточни култури со имунолошки клетки кои создаваат антитела.

Производство на поликлонски антитела/серуми

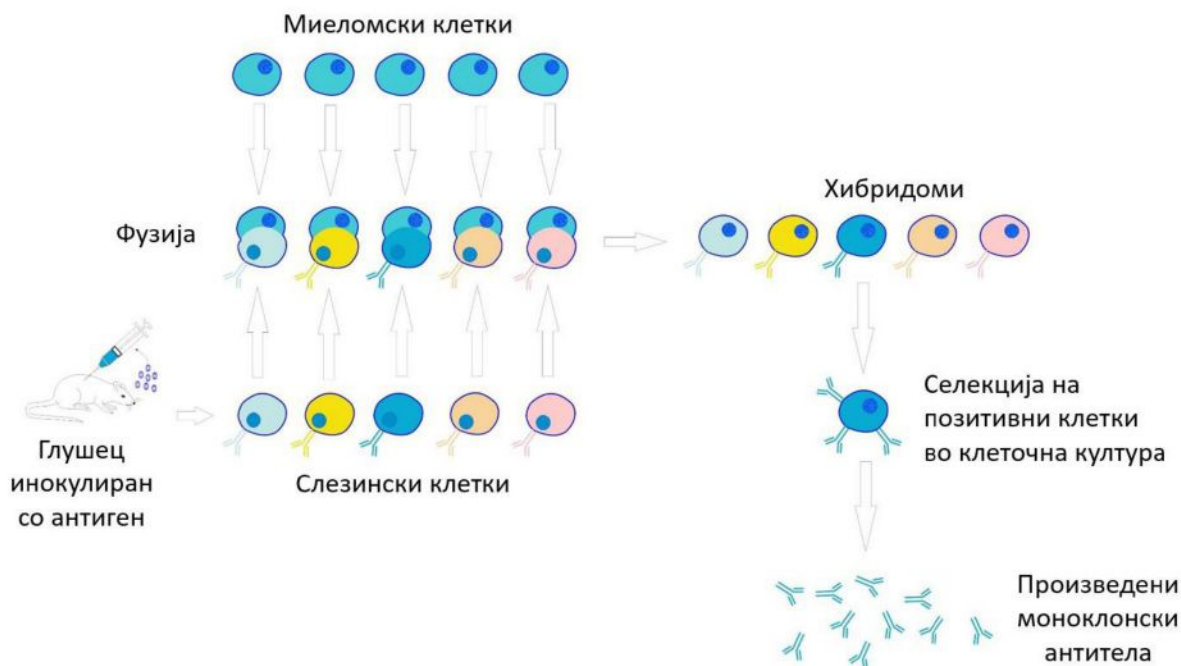
Овој метод генерира создавање мешавина од антитела кои се врзуваат за повеќе епитопи од еден антиген. Оваа мешавина се нарекува *поликлонски антитела* одн. *серуми* (или *антисеруми*, каде „анти“ се однесува на антителата во серумите). Терминот „*поликлонски*“ значи дека овие препарати содржат антитела добиени од многу различни клонови на Б-клетки. Еден пример за производство на поликлонски антитела/серуми е добивањето на антисерум против штенечак (кучешка чума) со вакцинирање на коза со овој вирус (слика 2.1). Вака добиените антиген-специфични, поликлонски антитела содржат мешавина од различни имуноглобулински изотипови кои врзуваат повеќе антигенски епитопи, но само од аплицираниот антиген/микроорганизам (во овој случај вирусот на штенечак/кучешка чума). Покрај нивниот дијагностички потенцијал, антисерумите се исто така важни во процесот познат како пасивна имунизација (на пример по каснување од змија или превенција/лечење на тетанус). Иако производството на поликлонални антитела е релативно едноставно и евтино, тоа бара континуирана употреба на животни и, поради варијациите од животно до животно како и серија до серија, производите не се секогаш стандардизирани. Сепак, многу антиген-специфични реагенси (особено антиимуноглобулинските) сè уште се произведуваат на овој начин.



Слика 2.1. Производство и прочистување на поликлонски антитела. По инјектирањето на антигенот (вирусот на штенечак/кучешка чума), козата создава антитела. Козјиот серум се одвојува од извадена крв и антителата прочистуваат. Вака добиените поликлонски антитела/антисерум потоа може да се користат во дијагностички тестови за инфекции со вирусот на штенечак кај кучиња

Производство на моноклонски антитела

Овој метод користи клеточна култура за пропагирање еден клон Б-клетки од имунизирано животно (оттука и називот „моноклонски“). Тоа овозможува генерирање хомогени моноклонски антитела кои реагираат само со еден антигенски епитоп. Како и кај производството на поликлонските антисеруми, генерирањето на моноклонални антитела започнува со вакцинирање на животно (обично глушец) со специфичен антиген од интерес (слика 2.2). Откако животното ќе развие хуморален имунолошки одговор, тоа се жртвува и Б-клетките се изолираат најчесто од слезината. Овие Б-клетки *in vitro*, во култура на клетки, се спојуваат со клетки на миелом (бесмртна неопластична плазма клеточна линија) за да се добијат хибридни, бесмртни клетки кои излучуваат антитела (наречени *хбридоми*). Добиените хибридоми се прегледуваат за да се идентификуваат оние кои лачат антитела реактивни со антигенот од интерес и ваквите бесмртни плазма клетки понатаму се размножуваат при што излучуваат обилни количини моноклонски антитела во медиумот.



Слика 2.2. Производство на моноклонски антитела. Во глушецот имунизирани со соодветен антиген, се генерираат *Б-клетки* кои создаваат антитела против него. *Б-клетките* од слезината на животното се собираат и во клеточна култура се мешаат со бесмртни неопластични плазма клетки (*клетки на миелом*). Добиените *хибридоми* (бесмртни *Б-клетки*) од интерес, се селектираат и култивираат за производство на (моноклонско) антитело насочено само против еден антигенски епитоп

Технологијата на моноклонски антитела денес се користи во широк спектар на биомедицински апликации (*дијагностика на бременост, терапија на болести или во истражувачки цели*). Една од нив е и *дијагнозата на инфективните заболувања*, односно нивните предизвикувачи, било да се бактериски (на пр. имунохистохемско боење со моноклонски антитела насочени против LPS-от на *Francisella tularensis* може да се користи за да се визуализира *бактерија* во формалин-фиксирана ткива) или вирусни (на пр. имунохистохемско детектирање на вирусниот антиген во ткивата со моноклонски антитела произведени против *ORF2* на свинскиот цирковирус 2).

Библиографија

- Amy I. Warren. Veterinary Clinical Laboratory Immunology. In: Gerald N. Callahan and Robin M. Yates, Basic Veterinary Immunology. University Press of Colorado, [2014]
- Tizard, Ian R. Veterinary immunology (10th edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]
- Kathleen P. Talaro, Barry Chess. Foundations in Microbiology: Basic Principles (10th edition). McGraw-Hill Education, [2018]
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL, Weber D, Bair WB. Microbiology an introduction (13th edition). Pearson Education Limited, [2021]

3. РАДИОИМУНОЛОШКИ ПРОБИ

Вовед

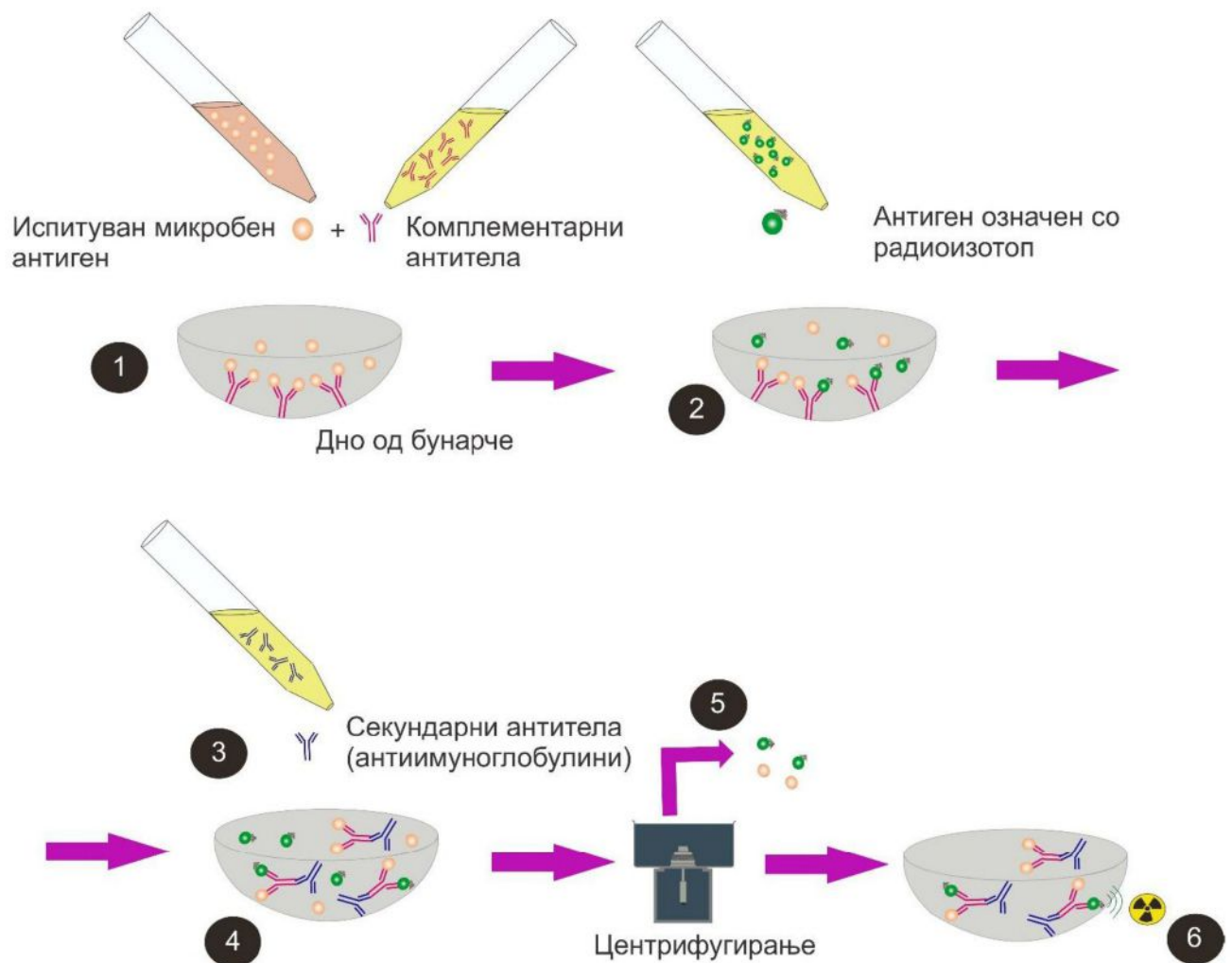
Тестовите кои користат антитела маркирани со радиоизотопи имаат предност што се високо осетливи. Но од друга страна, системите за детекција на изотопи се скапи што во комбинација со ризикот од радиоактивност и комплицираниот начин на безбедно отстранување на отпадниот материјал, ја ограничуваат употребата на овие методи. Поради споменатите недостатоци, радиоимунолошките методи (РИА) денес се заменуваат со употреба на други методи со маркирани антитела, како што е ELISA-та.

Учесници во реакцијата

1. Антиген (непознат микроорганизам во тест-примерокот)
2. Зајачки (комплементарни) антитела специфични за тестираните антигени
3. Радиоактивно означени антигени (слични/исти со антигенот кој се детектира во мострата)
4. Секундарни антитела (антиимуноглобулини) специфични за комплементарните антитела

Принцип и изведба (слика 3.1)

1. Примерокот со присутен микробен антиген се инкубира заедно со комплементарни антитела, што овозможува тие да се врзуваат за него.
2. Исто така, се додава антиген означен со радиоактивен изотоп. Радиоозначениот антиген се „натпреварува“ за местата за врзување на антителата со антигенот од примерокот. Колку повеќе испитуван антиген во тест-примерокот е присутен, толку помалку радиоозначен антиген може да се врзе со антителата. Вишокот на антигени (испитувани и радиоозначени) останува неврзан и слободен во течноста.
3. Потоа се додаваат секундарни антитела (антиимуноглобулини) специфични за комплементарните антитела.
4. Антиимуноглобулините се врзуваат со комплементарните антитела и формираат комплекси што се таложат на дното на бунарчето (одвојувајќи ги комплементарните антитела од растворот. Со центрифугирање на течноста се овозможува селективно раздвојување на комплексите антиген-антитело (талог) од преостанатиот слободен антиген (супернатант).
5. Слободните, неврзани антигени се одвојуваат со исфрлање на супернатантот.
6. На крај се врши мерење на радиоактивноста на пелетата/талогот одн. количеството на радиоозначен антиген кој се врзал за антителата. Добиената вредност се споредува со стандардизирана калибрациска крива за да се утврди концентрацијата на неозначениот (испитуван) антиген со потекло од примерокот на пациентот. Притоа, колку повеќе антиген бил присутен во примерокот, толку помалку се детектира зрачење.



Слика 3.1. Принцип и изведба на РИА-методот

Библиографија

Alhabbab, R.Y. (2018). Radioimmunoassay (RIA). In: Basic Serological Testing. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77694-1_11

Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. Br J Anaesth. 2014 Feb;112(2):213-6. doi: 10.1093/bja/aet293. PMID: 24431350.

Tizard, Ian R. Veterinary immunology (Tenth edition). Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]

4. Имунофлуоресцентни тестови

Имунофлуоресценцијата претставува имунолошка метода кај која се користат антитела обележани со флуоресцентна боја, најчесто флуоресцеин изотиоцијанат (FITC). За визуализација на комплексот антиген-антитело во овој случај се користи флуоресцентен микроскоп со чија помош се детектира емитувањето на зелена светлина. Кај имунофлуоресцентните тестови постои директен и индиректен формат.

4.1 Директна имунофлуоресценција

Принцип

Оваа метода се базира на детекција на антигенот во ткиво со употреба на флуоресцентно обележани антитела. Антигенот може да се детектира на ткивен отисок, размас или на култура на клетки.

Во текстот подолу е опишана директна имунофлуоресценција за дијагностика на беснило на препарат од мозочно ткиво.

Учесници во реакцијата

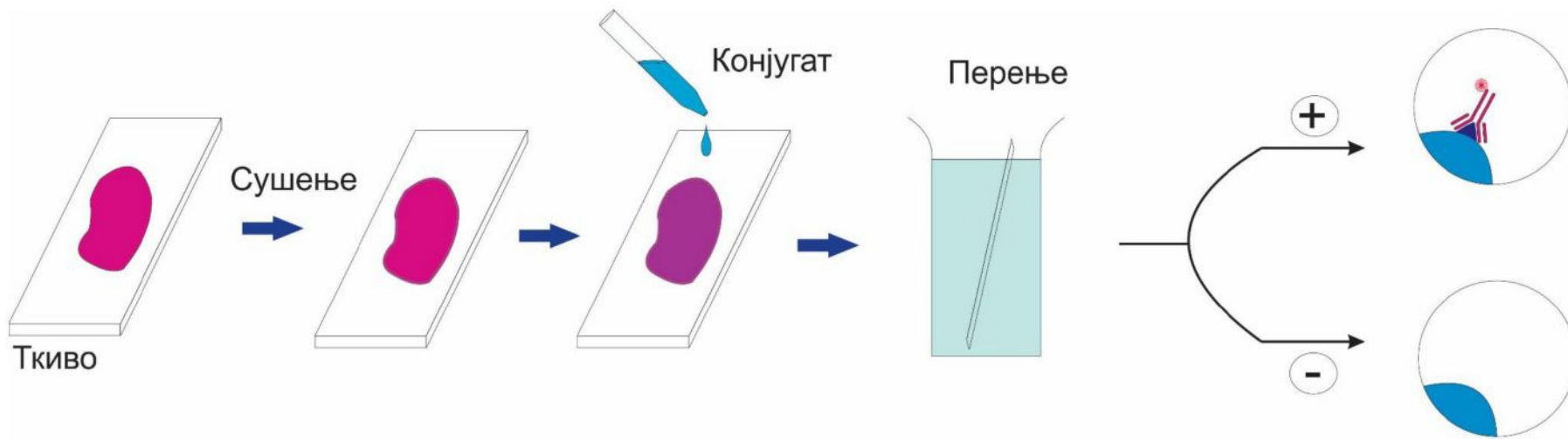
- Ткиво
- Антиген
- Препознавачко антитело обележано со флуоресцентна боја (конјугат)

Постапка

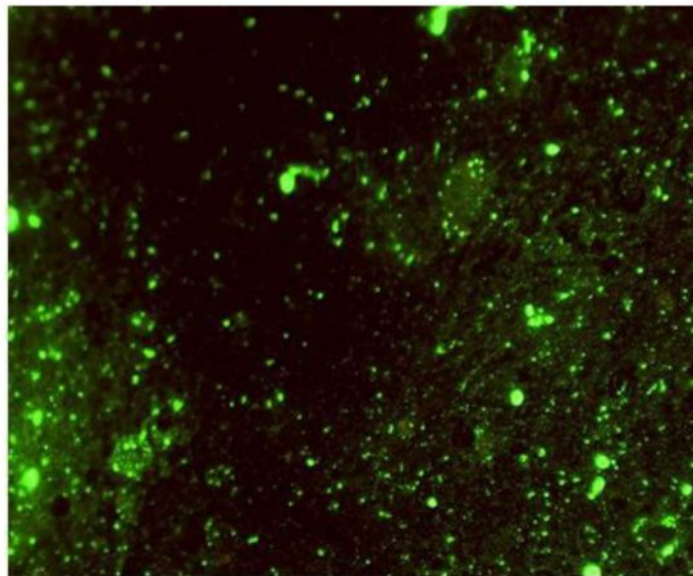
- Кај директната имунофлуоресценција ткивото се нанесува како размас или отисок на предметно стакленце.
- Препаратот се суши и се фиксира со 100 % ацетон.
- На фиксираниот препарат се додава конјугат обележан со флуоресцентна боја.
- Препаратот се инкубира на 37 °C, 30 минути – време за кое се овозможува врзување на конјугатот за антигенот во ткивото (доколку е присутен).
- Препаратот се пере со цел да се отстрани евентуално неврзаниот конјугат.
- Препаратот се суши и микроскопира под флуоресцентен микроскоп.

Доколку во доставениот материјал се наоѓа микроорганизмот чии антигени се специфични за додадените маркирани антитела, се создава комплекс (*антиген-маркирано антитело*) што е придружено со флуоресцирање на препаратот одн. резултатот е позитивен за присуство на соодветниот антиген во добиениот материјал.

Во спротивно, отсуството на специфични антигени за маркираните антитела, комплексот антиген-маркирано антитело нема да се создаде и нема да резултира со појава на флуоресценција одн. резултатот е негативен за присуство на соодветниот антиген во добиениот материјал.



Слика 4.1 Директна имунофлуоресценција во ткиво



Слика 4.2 Позитивна директна имунофлуоресценција за присуство на вирусот на беснило во мозочно ткиво

4.2 Индиректна имунофлуоресценција

Принцип

Индиректната имунофлуоресценција може да служи за докажување на антитела или на антигени. Доколку се работи за детекција на антитела, со овој формат на имунофлуоресценција се детектираат антитела во примерокот преку негово врзување за имобилизираниот антиген на дното на микроскопското стакленце. Овој тип на тест служи за детекција на антитела во серум.

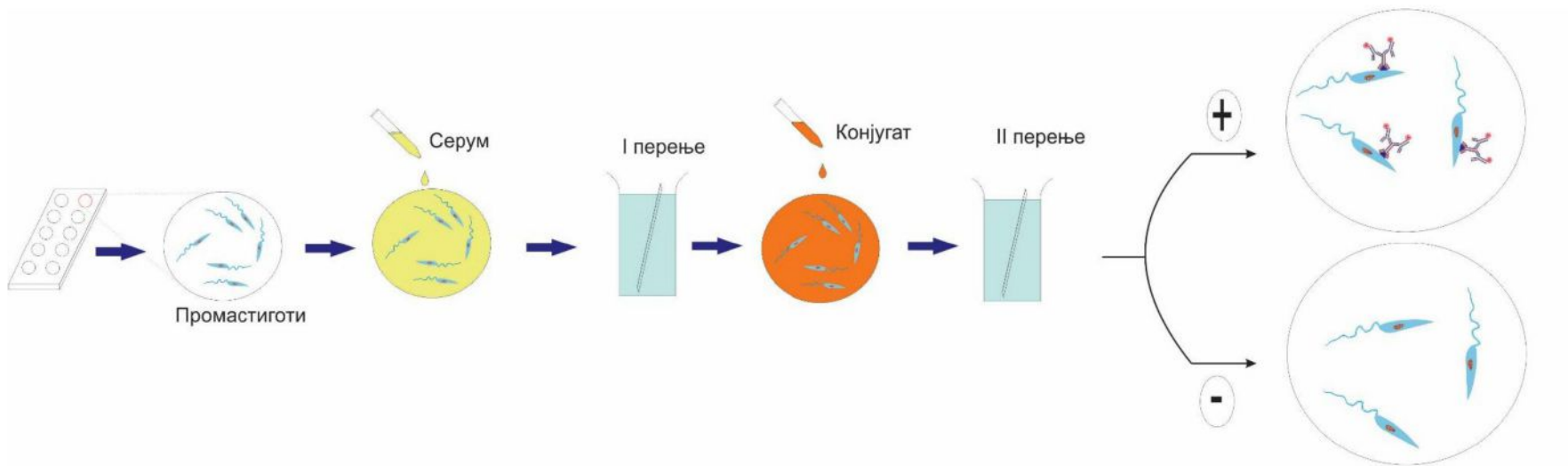
Во текстот подолу е опишана индиректната имунофлуоресценција за дијагностика на кучешка лајшманиоза одн. присуство и титар на антитела во серумот од кучиња.

Учесници во реакцијата

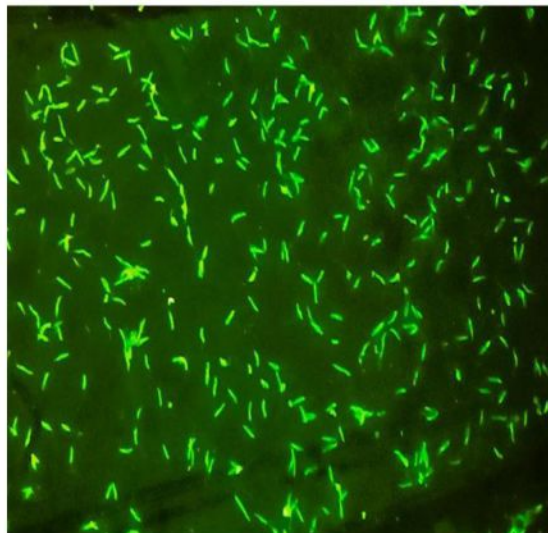
- Имобилизирани антиген
- Антитела во серум
- Антиспециес антитело обележано со флуоресцентна боја (конјугат)

Постапка

- Кај овој формат на тест, имобилизираниот антиген е специфичен за антителата кои се целен анализ во примерокот одн. серумот кој се испитува.
- На микроскопското стакленце каде се наоѓа имобилизираниот антиген се додава примерокот и доколку антителата се присутни во серумот, тие се врзуваат за имобилизираниот антиген.
- Инкубација 37 °C, 30 минути – време за кое се овозможува врзување на антителата (доколку се присутни) за имобилизираниот антиген.
- Препаратот се пере со цел да се отстранат неврзани антитела.
- Се додава антиспециес конјугат обележан со флуоресцентна боја.
- Препаратот се пере со цел да се отстранат неврзани антитела.
- Препаратот се суши и микроскопира под флуоресцентен микроскоп.



Слика 4.3 Индиректна имунофлуоресценција за докажување на антитела во серум



Слика 4.4. Позитивна индиректна имунофлуоресценција за кучешка лајшманиоза

Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) *Veterinary immunology*. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). *Veterinary immunology: principles and practice*. Second edition. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.

5. Имуноензимски тестови

Имуноензимските тестови (EIA – Enzyme Immunosorbent Assay, ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) претставуваат широко употребувана дијагностичка алатка во ветеринарната медицина со цел за детекција на антиген или на антитела во биолошките примероци од животните. Оваа метода се карактеризира со висока сензитивност и специфичност, лесно се изведува и постои можност за тестирање на различни видови примероци: серум, плазма, урина, плунка, ткивни екстракти итн.

Принцип

Основниот принцип на ELISA вклучува имобилизација на антиген или на антитело (во зависност од видот на методот) за цврста површина (дно на микротитарска плоча) и додавање на примерок кој го содржи целниот анализат. Доколку целниот анализат е присутен во примерокот, истиот ќе се врзе за имобилизираните компоненти создавајќи имуни комплекси. Овој комплекс потоа се детектира со конјугат обележан со ензим со кој настанува промена на боја на додадениот супстрат.

Во зависност од принципот на изведба на методот како и од целниот анализат кој треба да се детектира постојат повеќе видови на ELISA:

- Директна (сендвич) ELISA
- Индиректна ELISA
- Компетитивна ELISA

5.1 Директна (сендвич) ELISA

Принцип

Кај овој формат на ELISA целта е детекција на антиген во примерокот преку негово фаќање во сендвич меѓу две антитела. Овој тип на тест служи за детекција на антиген.

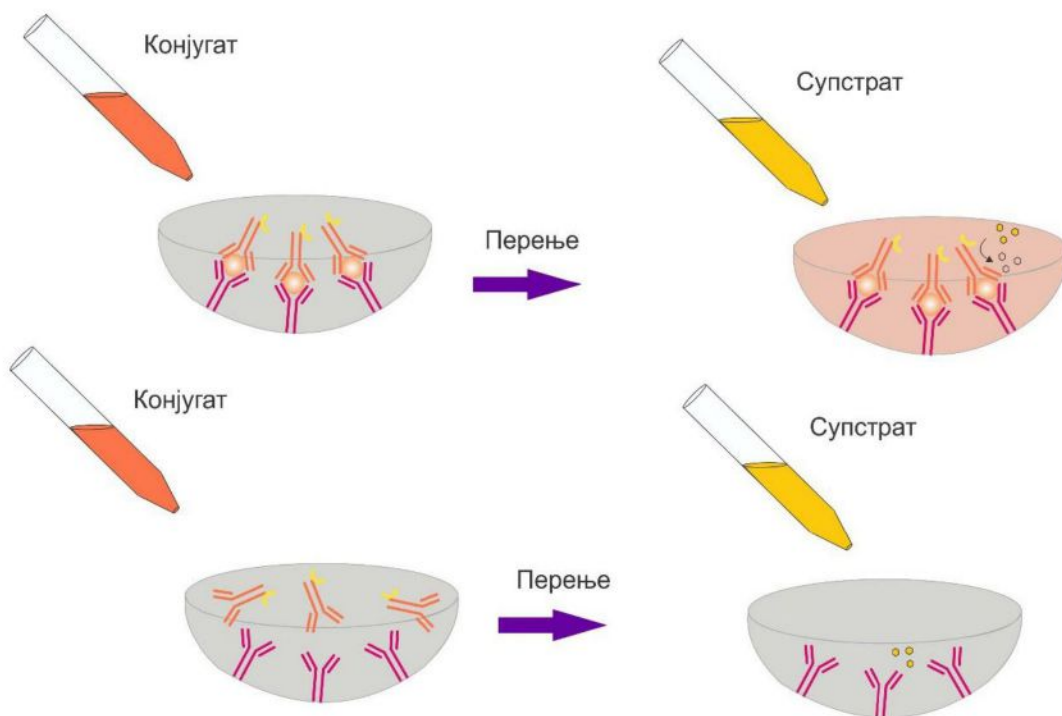
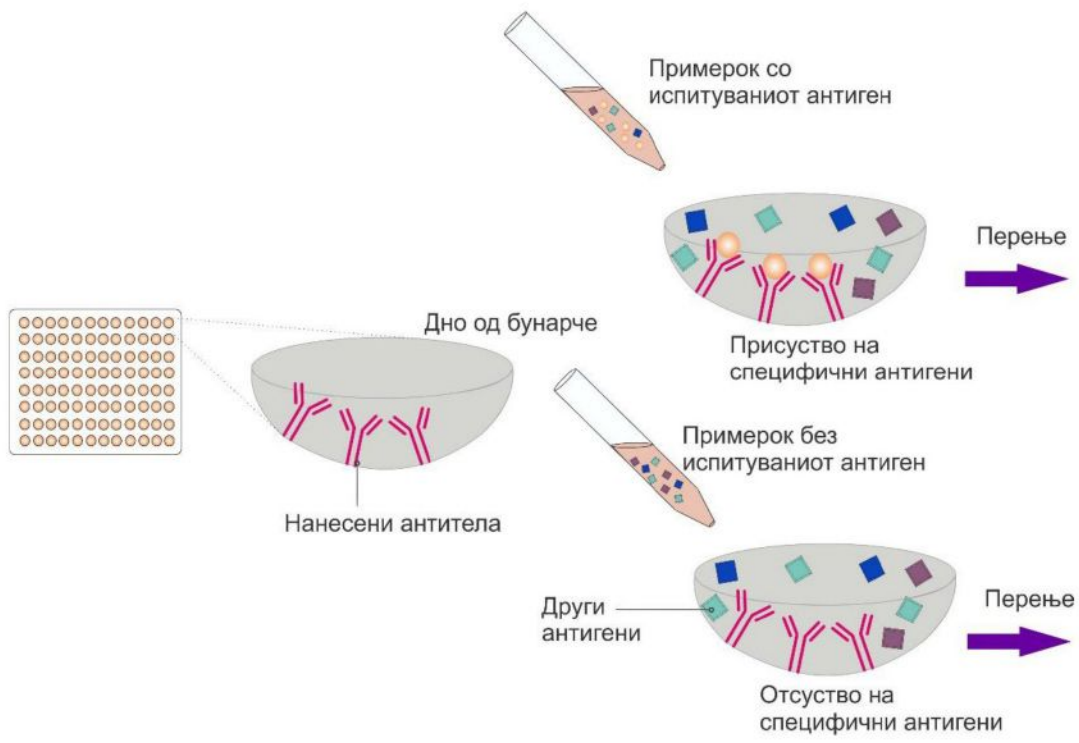
Учесници во реакцијата

- Прифаќачко антитело
- Антиген
- Препознавачко антитело обележано со ензим (конјугат)

Постапка

- Кај директната ELISA на микротитарската плоча е нанесено антитело специфично за антигенот кој е целен анализат во примерокот кој се испитува.
- Се додава примерокот и доколку целниот анализат е присутен истиот се врзува за препознавачкото антитело.
- Се додава конјугат обележан со ензим.
- Се додава супстрат.
- Доколку целниот анализат бил присутен во примерокот, тој е врзан за препознавачкото антитело и конјугатот, а додадениот супстрат под дејство на ензимот ја менува бојата.

- Резултатот се отчитува спектрофотометриски според упатството и граничната вредност дадена од производителот.
- Интензитетот на сигналот (одн. промена на бојата) е директнопропорционален со концентрацијата на антигенот во примерокот.



Слика 3.1 Директна (сендвич) ELISA

5.2 Индиректна ELISA

Принцип

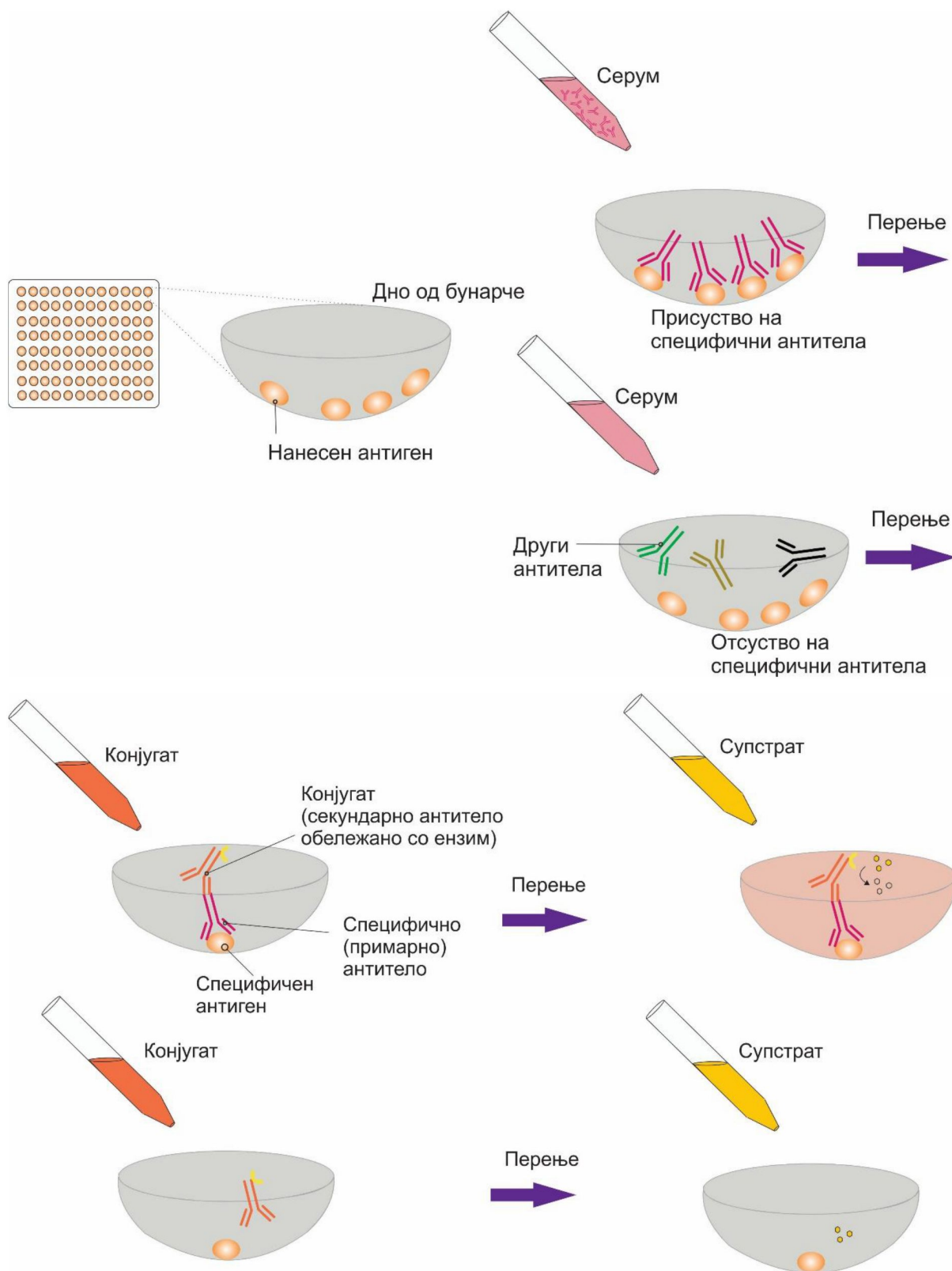
Кај овој формат на ELISA целта е детекција на антитела во примерокот преку негово врзување за имобилизираниот антиген на дното на микротитарската плоча. Овој тип на тест служи за детекција на антитела во серум/млеко.

Учесници во реакцијата

- Имобилизиран антиген
- Антитела во серум
- Антитело обележано со ензим (конјугат)

Постапка

- Кај индиректната ELISA на микротитарската плоча е нанесен имобилизиран антиген специфичен за антителото кое е целен анализ во примерокот кој се испитува.
- Се додава примерокот и доколку антителата се присутни во серумот, тие се врзуваат за имобилизираниот антиген.
- Се додава конјугат обележан со ензим.
- Се додава супстрат.
- Доколку антителата се присутни во примерокот, тие се врзуваат за имобилизираните антигени. Додадениот конјугат се врзува за комплексот, а супстратот под дејство на ензимот ја менува бојата.
- Резултатот се отчитува спектрофотометриски според упатството и граничната вредност дадена од производителот.
- Интензитетот на сигналот (одн. промена на бојата) е директно пропорционален со концентрацијата на антителото во примерокот.



Слика 3.2 Индиректна ELISA

5.3 Компетитивна ELISA

Принцип

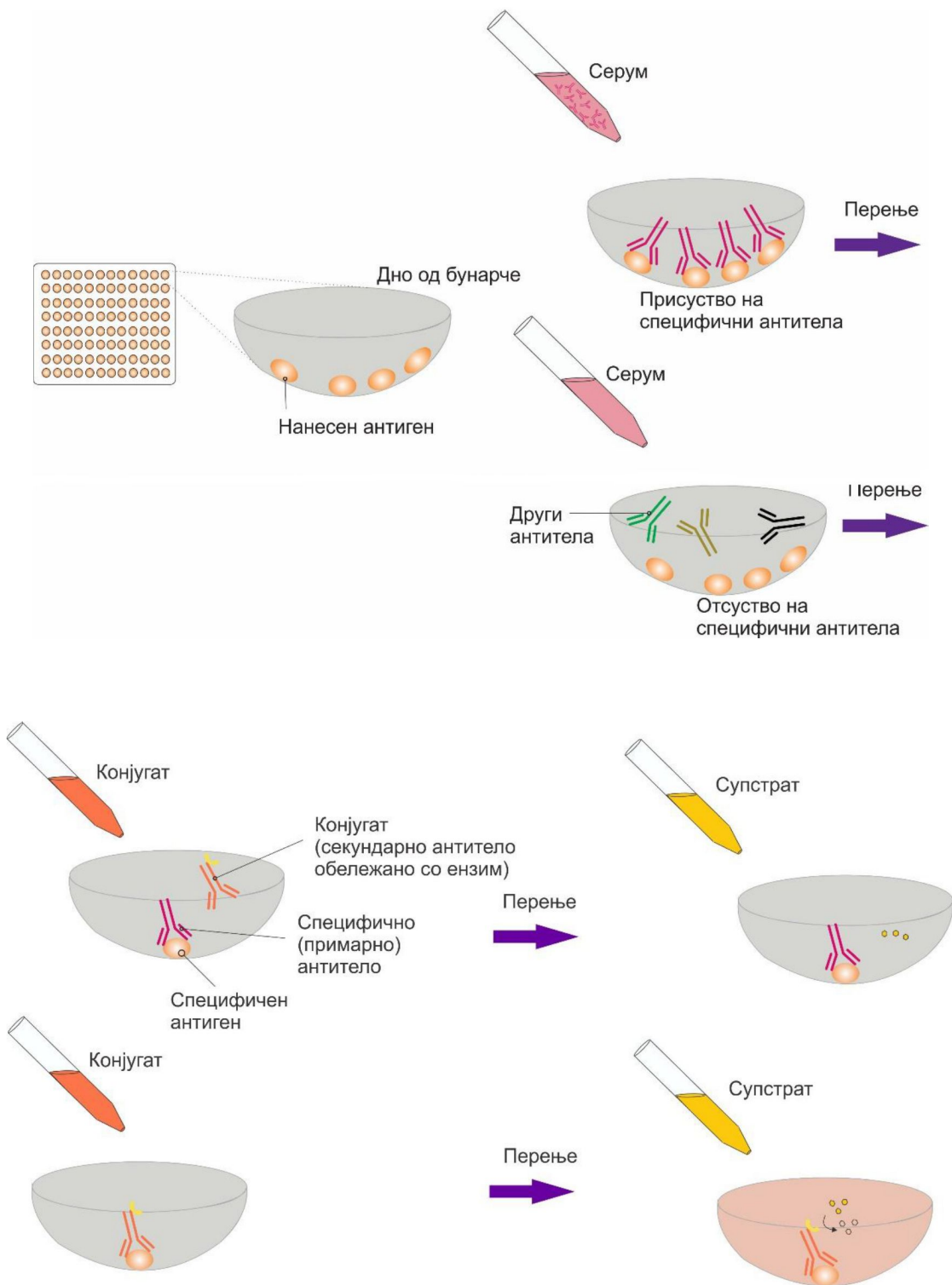
Кај овој формат на ELISA целта е детекција на антитела во примерокот преку нивна конкуренција/блокирање со конјугатот и нивно врзување за имобилизираниот антиген на дното на микротитарската плоча. Овој тип на тест служи за детекција на антитела во серум/млеко.

Учесници во реакцијата

- Имобилизирани антигени
- Антитела во серум
- Антитело обележано со ензим (конјугат)

Постапка

- Кај конкурзивната ELISA на микротитарската плоча е нанесен имобилизиран антиген специфичен за антителото кое е целен аналит во примерокот кој се испитува и конјугатот.
- Се додава примерокот и доколку антителата се присутни во серумот, тие се врзуваат за имобилизираниот антиген.
- Се додава конјугат обележан со ензим кој е во конкуренција за врзување за антигенот.
- Се додава супстрат.
- Доколку антителата се присутни во примерокот, тие се врзуваат за имобилизираните антигени. Додадениот конјугат не се врзува за имобилизираниот антиген, а супстратот не ја менува бојата.
- Резултатот се отчитува спектрофотометриски според упатството и граничната вредност дадена од производителот.
- Интензитетот на сигналот (одн. промена на бојата) е обратнопропорционален со концентрацијата на антителото во примерокот.



Слика 3.3. Компетитивна ELISA

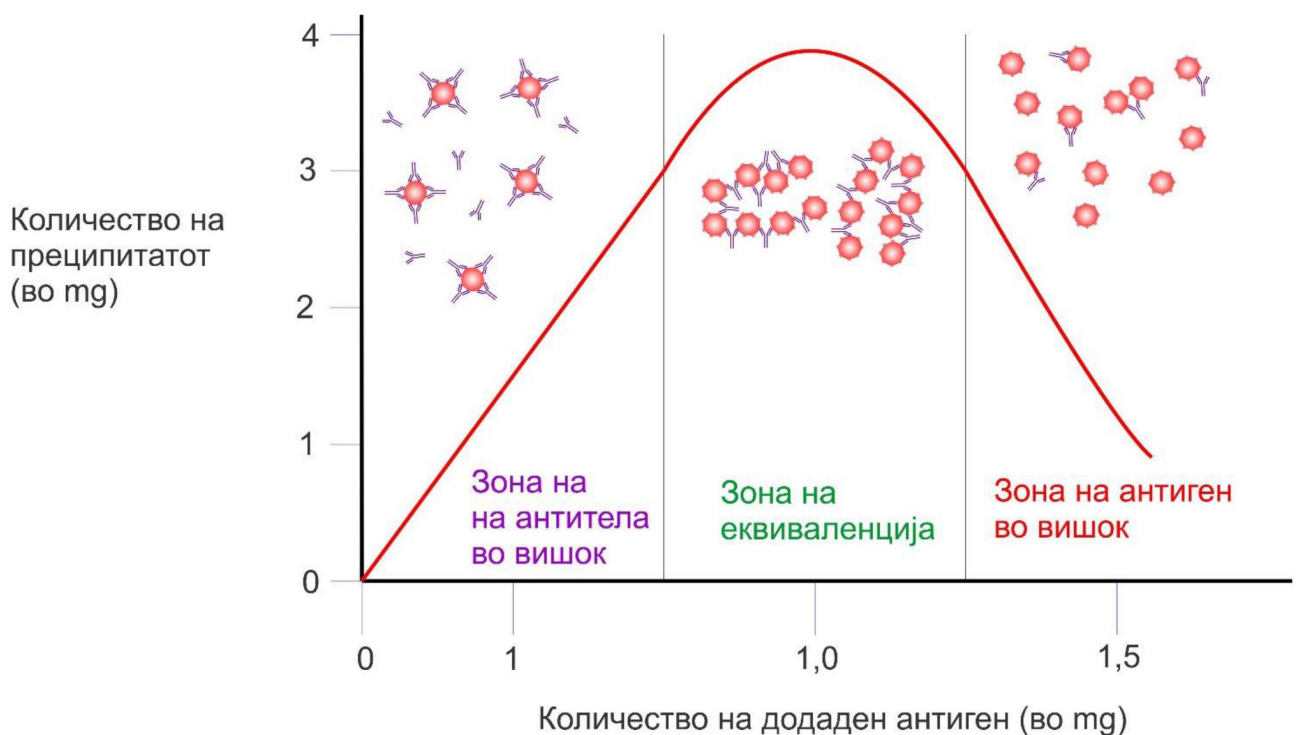
Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) Veterinary immunology. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). Veterinary immunology: principles and practice. Second edition. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.

6. ПРЕЦИПИТАЦИЈА

При соодветни услови, антигените и антителата формираат имуни комплекси кои се состојат од агрегати на антигени меѓусебно поврзани со антитела. Во физиолошки услови овие комплекси се мали и брзо се отстрануваат, но како и кај преосетливоста тип III, комплексите можат да формираат поголеми нерастворливи агрегати. *In vivo* ваквите творби можат да предизвикаат одредени патолошки состојби, но *in vitro* формираните видливи талози (преципитати) може да се искористат во дијагностички цели. За да се формира преципитатот, треба да се исполнат два услови: (1) антигенот да биде повеќевалентен (да содржи повеќе епитопи за кои може да се врзат и повеќе антитела), и (2) релативните количини на антиген и антитела да бидат оптимални (т.н. „зона на еквивалентност“) бидејќи во присуство на премногу антитела или премногу антигени талогот нема да биде формиран (сл. 6.1).



Слика 6.1. Формирање на видливи антиген-антитело комплекси во реакцијата на преципитација. Тестот ги користи концентрациите на антигенот и антителата (зона на еквивалентност) за мерење на нивните релативни количини (титри)

Постојат многу тестови кои го користат принципот на преципитација, кои може да се поделат во три групи: (1) преципитација во раствор (како што е допирната, контактна преципитација); (2) преципитација во агар-гел (како што се радијалната имунодифузија и агар-гел имунодифузијата), и (3) преципитација во агар во електрично поле (каде употребата на електрично поле обезбедува дополнителна сила која го зголемува степенот на движење на антителата и антигените во гелот за нивна побрза интеракција, и ја зголемува чувствителноста на реакцијата).

ДОПИРНА, КОНТАКТНА ПРЕЦИПИТАЦИЈА (Преципитациски прстенест тест)

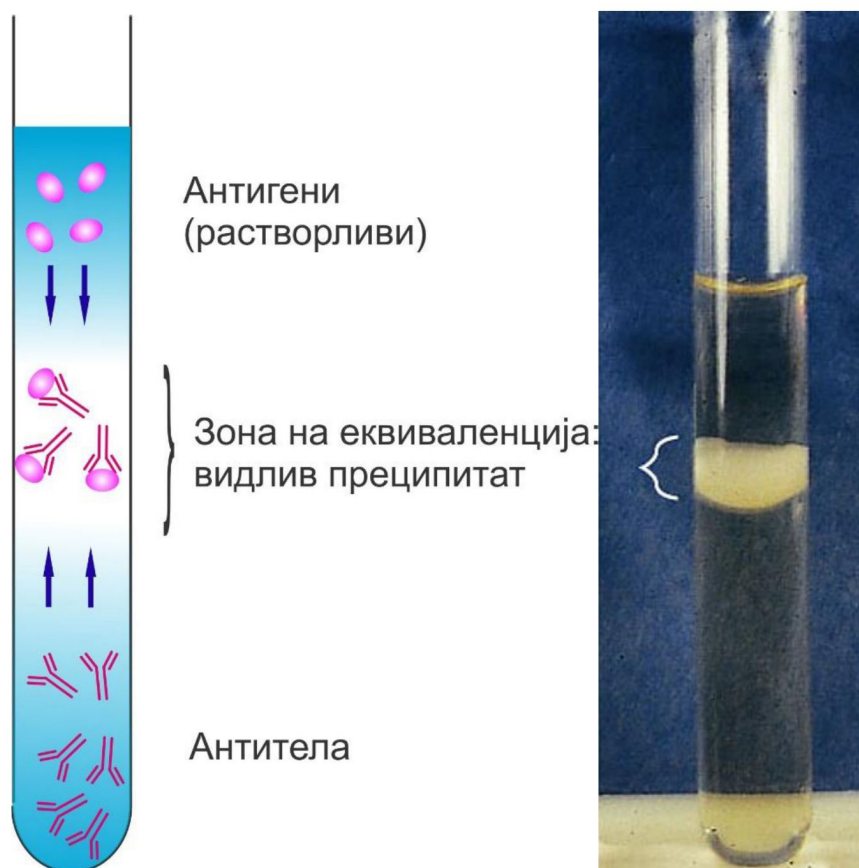
Квалитативен метод кој се илустрира преку т.н. Асколи реакција за откривање на термостабилен антиген на антракс во животинско ткиво што се користи за како нуспроизвод (како што е кожа).

Учесници во реакцијата

- Антиген (во раствор/суспензија, која се добива со термичка екстракција на антраксниот антиген од животинско ткиво)
- Антитела (антисерум кој се подготвува на зајаци, со супкутана инокулација на вакцина против антракс)

Принцип

Тестот/реакцијата се базира на принципите на преципитинска крива опишана претходно, така што формираните имуни комплекси во зоната на еквивалентност (која кај овој тест се наоѓа во контактното подрачје помеѓу антигенската суспензија и антисерумот) ќе бидат видливи како заматен, белузлав преципитациски прстен (сл. 6.2.).



Слика 6.2. Преципитациски прстенест тест (допирна, контактна преципитација)

Изведба

1. Околу 2 g примерок (ситно исецкана кожа), се става во 5 ml физиолошки раствор кој содржи 1/100 крајна концентрација на оцетна киселина, и се вари 5 минути.
2. Добиениот раствор/суспензија се лади и се филтрира низ филтер-хартија.
3. Неколку капки антисерум се ставаат во мала, тенка епрувета.
4. Претходно добиениот филтрат внимателно се додава врз серумот (при што епруветката е во искосена положба) така што се формира дискретен допирен слој помеѓу двете течности.
5. Позитивен тест (присуство на антиген на антракс екстрахиран при првата постапка) е формирање на видлив преципитински прстен на местото на контакт помеѓу двете течности (за помалку од 15 минути, сл. 6.2).
6. Секако дека како и кај секоја серолошка реакција, треба да се вклучат соодветни суспензии на примероци како позитивна и негативна контрола.

АГАР-ГЕЛ ИМУНОДИФУЗИЈА (АГИД; дводимензионална двојна дифузија, техника на *Ouchterlony*)

Оригиналната техника всушност била метод на единична дифузија што се изведувала во епрувети, но денес повеќето АГИД-тестови се методи на двојна дифузија што се изведуваат во (1) Петриеве плочи со агар-гел во кои се издлабени бунарчиња за нанесување на антигенот и на антителото (кои се подготвуваат во лабораторијата, сл. 6.3.), или (2) минијатуризирана верзија со користење стандардни микроскопски стакленца обложени со агар (кои се комерцијално достапни).



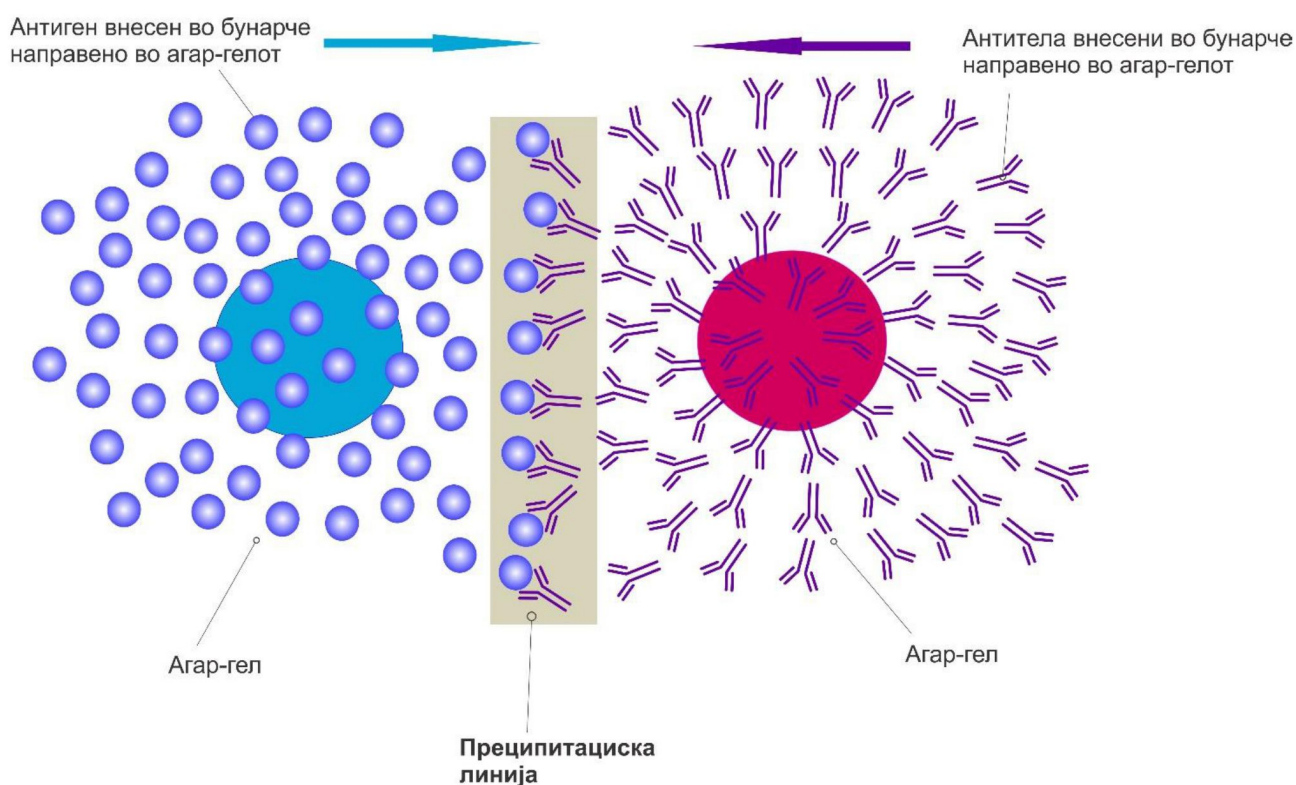
Слика 6.3. Петриеве плочи со агар-гел за изведба на АГИД

Учесници во реакцијата

- Антиген
- Антитела

Принцип

Во агар-гелот, испитуваните компоненти (антиген и антитела внесени во издлабените бунарчиња) дифундираат одн. се движат од бунарчињата еден наспроти друг, притоа намалувајќи ја својата почетна концентрација (сл. 6.4.). Кога ќе се сретнат на одредена оддалеченост од двете бунарчиња (во зоната на еквивалентност) се формираат видливи имуни комплекси и реакцијата се манифестира со појава на белузлава линија на талог (преципитат) во агар-гелот.



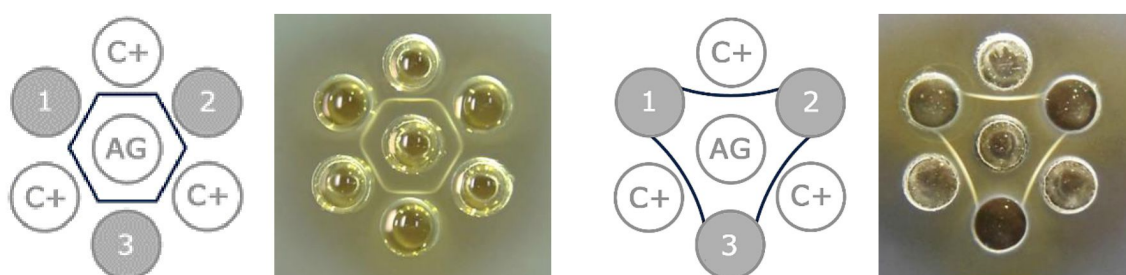
Слика 6.4. Дифундирање на антигенот и на антителото од бунарчињата еден наспроти друг и формирање на преципитациска линија

Изведба

Со оглед на тоа што АГИД-тестот кој детектира преципитирачки антитела произведени како одговор на инфекција со вирусот на инфективна анемија кај копитари (ИАК, т.н. *Coggins*-ов тест) е најчесто изведувана варијанта на оваа метода во ветеринарната медицина, истата е презентирана како пример за изведба на овој тест.

1. Шест бунарчиња се длабат (со специјална алатка, види сл. 4.2) во излиениот и стврднат *Noble* агар во Петриевите плочи.

2. Антигенот (суспензија на вирусот на ИАК) се става во централното бунарче, а стандардните антисеруми (позитивни контроли) се ставаат во три од шесте околни бунарчиња.
3. Тест-примероците (серуми од коњи) се ставаат во преостанатите три бунарчиња.
4. Петриевките се инкубираат на собна температура (18 °C – 26 °C) и во влажна средина.
5. По 24 - 48 часа, преципитациските реакции се прегледуваат со помош на интензивен, косо поставен извор на светлина наспроти црна заднина (сл. 6.5). Референтните линии (позитивните примероци) треба да бидат јасно видливи после 24 часа, и за тоа време сите тест-серуми кои се силно позитивни исто така искажуваат слични/исти преципитациски линии. Кај слабо позитивна реакција времето на формирање на видлива преципитациска линија може да се пролонгира до 48 часа.



А. Позитивен АГИД (Coggins-ов) тест

При позитивен тест, се јавува имунопреципитација поради врзувањето на антигенот (централно бунарче), и антителата во позитивните контроли (C+) и тест примероците. На сликата, трите примероци (1, 2 и 3) се позитивни на ИАК и затоа во сите бунарчиња може да се видат преципитациски линии (што дава форма на шестоаголник).

Б. Негативен АГИД (Coggins-ов) тест

При негативен Когинсов тест, имунопреципитацијата се јавува само во позитивните контроли (C+), но не и во тест примероците. На сликата, трите примероци (1, 2 и 3) се негативни на ИАК и затоа преципитациски линии може да се видат само во бунарчињата што содржат позитивни контроли (што дава форма на триаголник).

Слика 6.5. Проценка на резултатите од Coggins-овиот тест

РАДИЈАЛНА ИМУНОДИФУЗИЈА (дводимензионална единична дифузија)

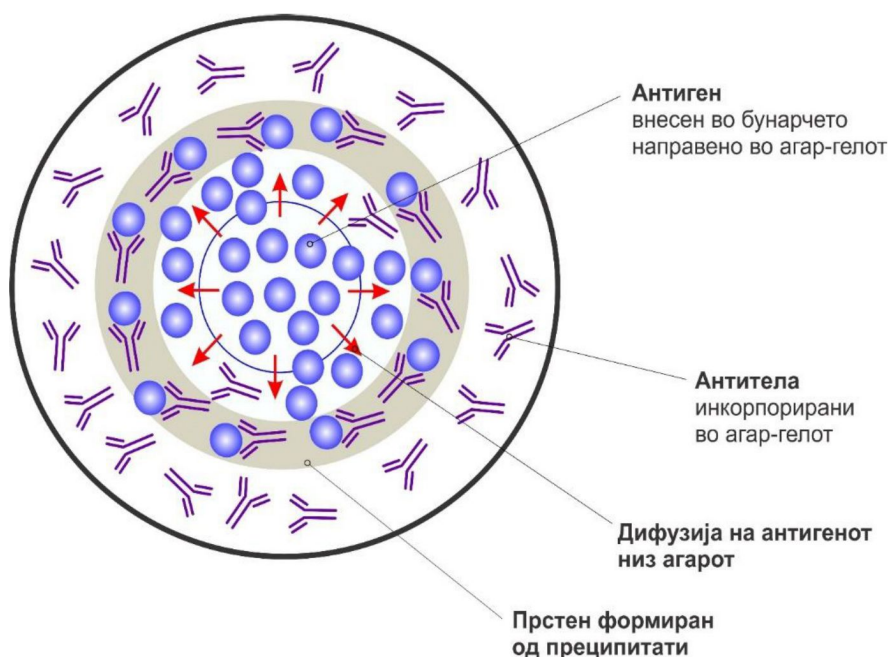
Радијалната имунодифузија е варијанта на АГИД-тестот, каде едната (непозната) компонента се внесува во бунарче, а другата (позната) го инкорпорира агарот при неговата подготовка.

Учесници во реакцијата

- Антиген
- Антитела

Принцип

Преципитатот се формира во вид на круг или прстен околу бунарчето како последица на радијалното дифундирање на испитуваната компонента од бунарчето во агарот (сл. 6.6).

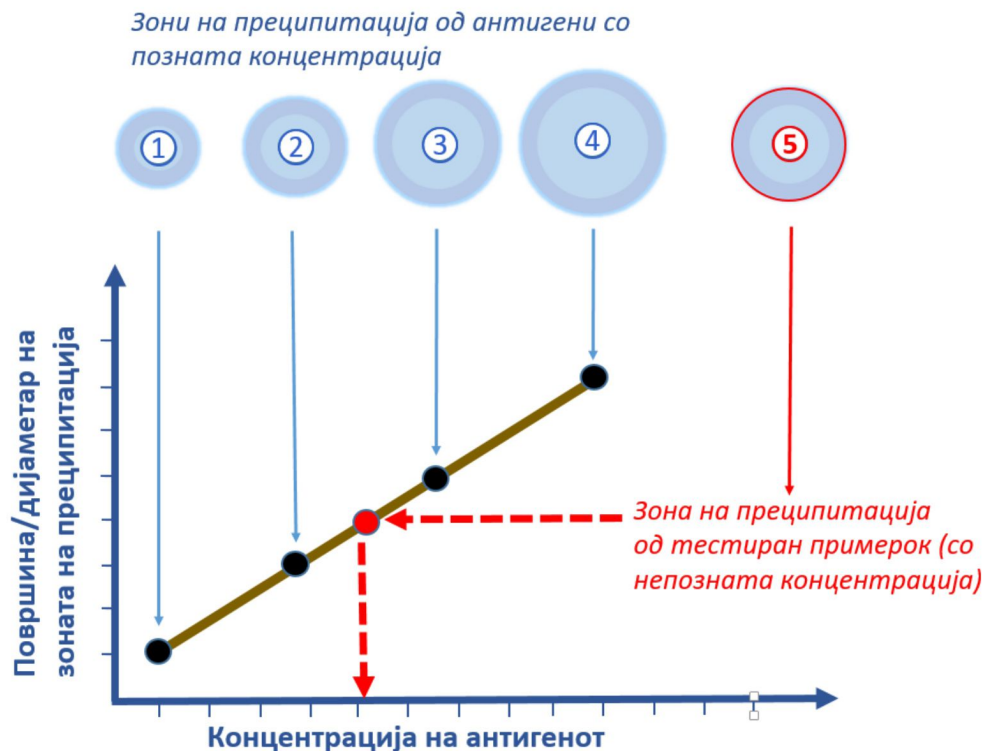


Слика 6.6. Принцип на радијалната имунодифузија

Изведба

Пример за изведба на тест со *непознати антигени* и *познати антители*.

1. Агарските плоча се подготвува со инкорпорирање на познато специфично антители во загреан растворен агар. Откако агарот ќе се излади и стврдне, се длабат бунарчиња.
2. Стандардните раствори (познат антиген со позната концентрација, позитивни контроли) се подготвуваат со нивно сериско разредување.
3. Позитивните контроли и тест-примерокот се внесуваат во бунарчињата.
4. Петриевката се затвора и инкубира.
5. После инкубацијата, околу бунарчињата со контроли и во случај на позитивна реакција, видливи се преципитациски (непросирни) кругови/прстени чија големина се мери со линијар (сл. 6.7). Големината/површината на прстенот е пропорционална на количината на антиген во бунарчето, што овозможува конструирање стандардна крива со користење на вредностите од стандардните раствори (позитивни контроли). Непознатите (испитувани) раствори на антиген потоа може точно да се проценат со споредување на дијаметрите од добиени прстени во тестот со стандардната крива.



Слика 6.7. Одредување на концентрацијата на непознат антиген наспроти стандардна крива кај радијалната имунодифузија. Антисерумот со антитела е помешан со агар, а стандардните раствори со познат антиген се додаваат во секое бунарче во зголемени концентрации (бунарчиња 1 - 4). Растворот на антиген со непозната концентрација (тест- примерок) се додава во бунарчето означено со 5. После инкубацијата, преципитациските зони се мерат и се нанесуваат наспроти стандардната крива за да се одреди концентрацијата на антигенот на непознатиот примерок

Библиографија

- Tizard, Ian R. *Veterinary immunology* (Tenth edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]
- Amy I. Warren. *Veterinary Clinical Laboratory Immunology*. In: Gerald N. Callahan and Robin M. Yates, *Basic Veterinary Immunology*. University Press of Colorado, [2014], p. 295-317
- Tak W. Mak, Mary E. Saunders. *Exploiting Antigen–Antibody Interaction*. In: *The Immune Response, Basic and Clinical Principles*. Pages 147-177. Academic Press, [2006]
- WOAH Terrestrial Manual 2023. Chapter 3.1.1. Anthrax (version adopted in May 2023).
- J. Anderson, T. Barrett, G.R. Scott. *Manual of the Diagnosis of Rinderpest, PART III - CONFIRMATORY DIAGNOSIS, Chapter 7. Antigen detection*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, [1996].
- WOAH Terrestrial Manual 2023. Chapter 3.6.5. Equine infectious anaemia (version adopted in May 2019)

Eliazar Camino and Fátima Cruz. EIA: Equine Infectious Anemia. VISAVET Outreach Journal, 2017. <https://www.visavet.es/en/articles/eia-equine-infectious-anemia.php> (last accessed 10/08/2024)

Creative Biolabs. Radial Immunodiffusion - Protocol & Troubleshooting. <https://www.creativebiolabs.net/radial-immunodiffusion.htm> (last accessed 10/08/2024)

Kangwa M, Yelemane V, Polat AN, Gorrepati KD, Grasselli M, Fernández-Lahore M. High-level fed-batch fermentative expression of an engineered Staphylococcal protein A based ligand in *E. coli*: purification and characterization. *AMB Express*. 2015 Dec;5(1):70. doi: 10.1186/s13568-015-0155-y. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26556030; PMCID: PMC4641145.

7. ТИТРАЦИЈА НА АНТИТЕЛА

Квалитативната детекција на антитела е доволна во многу случаи за едноставно докажување на присуство или отсуство на антитела во серумот. Во одредени случаи потребна е квантификација одн. мерење на нивото на антитела. Еден начин за докажување на нивото на антитела е со титрација.

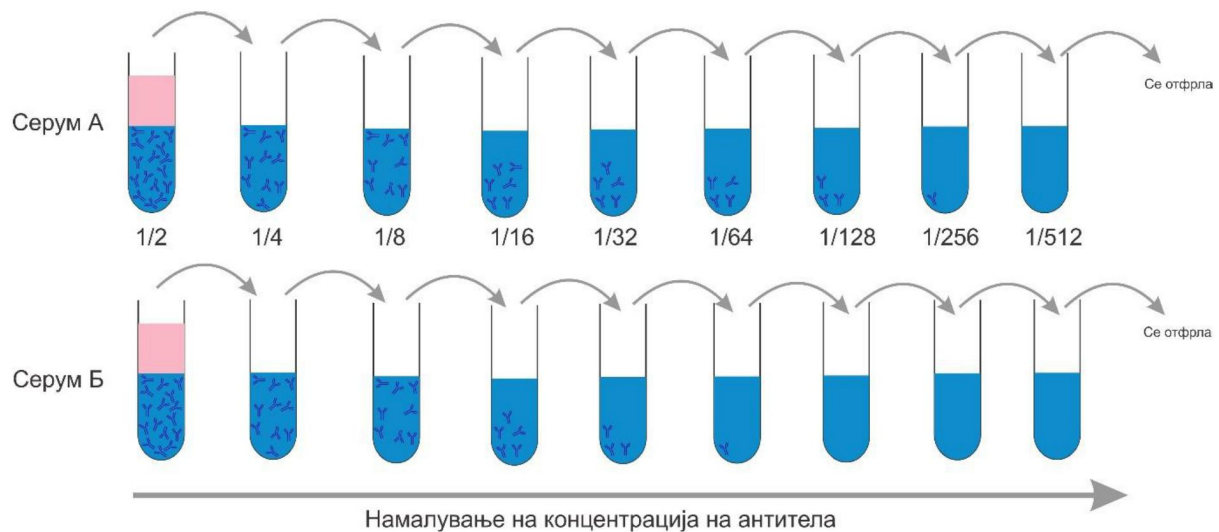
Сите серолошки тестови вклучуваат интеракција ин витро на антиген и антитело. Во некои тестови антигените се големи и нерастворливи, што овозможува директна визуализација на реакцијата кога се мешаат со антитело, но во многу тестови и двете компоненти (антиген и антитело) се растворливи и одредувањето на нивната интеракција бара секундарен индикаторски систем. Во тој случај се користат антисеруми кои може да бидат моноклонски или поликлонски. Овие антисеруми може да бидат од различна природа. Имено, тие може да се врзуваат за специфичните антитела од примерокот, а потоа во тестирањето да се додадат на нив специфични конјугирани антитела (со флуоресцентна боја или ензим). Пример за овој тип на тестирање е индиректната имунофлуоресценција за дијагностика на кучешка лајшманиоза кога се детектираат антитела и се одредува нивниот титар против паразитот *Leishmania spp.*

Принцип

Оваа процедура се изведува на тој начин што серумот кој се тестира сериски се разредува. Потоа секое разредување се соочува со константна концентрација на антиген со што се тестира за соодветна активност.

Нивото на специфична активност на одредени антитела присутни во еден примерок се дефинира како титар на тие антитела. Реципрочната вредност на најголемото разредување на серумот кое дава недвосмислено позитивна реакција се нарекува титар и дава проценка за количината на антитела во серумот.

Во ветеринарната медицина постојат многу примери за квантитативни серолошки методи кои се користат со цел за докажување на титарот на антитела кај животните кон одредени бактерии, вируси, паразити и слично. Одредувањето на титарот на антитела е индикација за јачината на хуморалниот имунолошки одговор и може да се користи за споредба на нивото на антитела кај различни животни во една иста група на животни или пак во различни временски интервали кај едно исто животно.



Слика 7.1 Титрација на антитела

Учесници во реакцијата

1. Антитела
2. Разредувач
3. Антиген

Постапка

- Еден волумен серум се додава во првата епрувета во серијата и еден еднаков волумен на разредувач (на пр. физиолошки раствор) се додава во секоја од преостанатите епрувети. Еден еднаков волумен на разредувач се додава во првата епрувета, што ќе ја разреди концентрацијата на антитела за фактор 2.
- Сега еден волумен се отстранува од првата епрувета и се пренесува во втората. Кога се мешаат, оригиналната концентрација на антитела сега е разредена за фактор 4.
- Овој процес се повторува по должината на линијата на епрувети за да се произведе „сериско разредување со удвојување“ во кое последната епрувета има разредување 1/512 од оригиналниот примерок.
- Конечниот волумен земен од последната епрувета се отфрла. Содржината на секоја епрувета сега се користи во серолошки тест кој е доволно чувствителен за да детектира едно антитело (во овој пример).
- На крајот, во секоја епрувета се додава стандардизирана суспензија на антиген.
- Кај серолошките тестови каде реакцијата антиген-антитело е видлива, следи чекорот на инкубација и читање на реакцијата, во спротивно следи чекор на додавање на секундарен индикаторски систем одн. антисерум.
- Реакцијата се чита по инкубацијата чиј временски период може да биде различен во зависност од серолошкиот тест.

Интерпретација на резултати

- За серумот од животното А, тестот ќе биде позитивен до и вклучувајќи ја епруветата што го содржи разредувањето 1/256 од серумот.
- За серумот од животното Б, тестот ќе биде позитивен до и вклучувајќи ја епруветата што го содржи разредувањето 1/64 од серумот.

Титарот на секој примерок е изразен како реципрочна вредност на последното позитивно разредување на серумот (т.е. титар од 256 за животното А и 64 за животното Б). Серумот со повисок титар содржи поголема концентрација на антитела. Треба да се запомни дека титарот не е апсолутен број, туку претставува опсег. На пример, титар од 256 покажува дека титарот не е помал од 128 и не е поголем од 512, така што може да има многу мала разлика помеѓу титар од 256 и еден од 512.

Библиографија

Day, M. J. (2015). Introduction to antigen and antibody assays. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(4), 128-131.

Tizard, Ian R. (2018) *Veterinary immunology*. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

8. АГЛУТИНАЦИЈА

Со оглед на тоа што антителата се бивалентни, тие можат да поврзат антигенски честички и да доведат до нивно згрутчување (аглутинација), што е и искористено во некои дијагностички методи. Аглутинацијата е едноставна процедура која се користи кога антигенот од интерес е вообличен (како на пр. бактерии и туѓи еритроцити,) или кога растворлив антиген е нанесен на честички (како на пр. зрна од латекс). Основниот принцип на реакцијата е мешање на честични антигени во оптимални пропорции со антитела, нивно слепување и формирање аглутинати најчесто видливи со голо око. Аглутинациските тестови се користат за различни цели во бактериологијата и во дијагностичката имунологија/серологија, и голем број ветеринарни имунодијагностички процедури се засноваат на овој феномен.

ТЕСТОВИ БАЗИРАНИ НА ДИРЕКТНА АГЛУТИНАЦИЈА

(анализи во кои антигенот директно се аглутинира со антителото)

БРЗА АГЛУТИНАЦИЈА (аглутинација на предметно стакло или на керамичка плоча)

Принцип

Квалитативна метода која се изведува на микроскопско стакленце (или на керамичка плоча со 96 вдлабнатини, кога се испитуваат повеќе проби) која може да се користи за идентификација на бактериски изолат или за детектирање на антителата во серумот.

Идентификација на бактериски изолат

Кога сомнителната бактериска колонија се меша со специфичен антисерум, аглутинацијата е брза и најчесто видлива со голо око. Недостатоци кај оваа метода се потребата за изолирани организми и слабата чувствителност (за што се потребни релативно големи концентрации на антитела). Сепак, овој тип на аглутинација често се користи за серотипизација и за карактеризација на изолирани соеви (како што е случај со салмонелите).

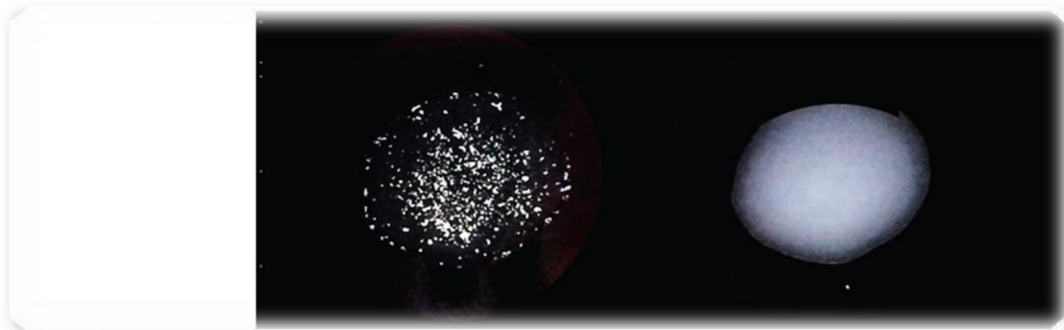
Учесници во реакцијата

- Непознат антиген (бактериска колонија)
- Познати антитела (антисерум)

Постапка

1. На предметното стакло се прави фина суспензија од бактерискиот изолат во физиолошки раствор, и се додава капка од специфичен антисерум. Може да се постапи по обратен редослед, одн. на стакленцето да се накапе специфичниот антисерум и потоа бактерискиот изолат да се суспендира во него.
2. Стакленцето полека се ниша како добро би се измешале течностите.

3. Во случај на позитивна реакција се создаваат *бели партикули (аглутинати)* видливи со голо око. Ако реакцијата е негативна, течноста останува еднолично заматена (сл. 8.1.).



Слика 8.1. Позитивна и негативна брза аглутинација со бактериски колонии на предметно стакленце

Откривање присуство на специфични антитела во серумот

За контрола на бруцелоза преку испитување на серуми од преживари на национално или на локално ниво, еден од тестовите кој се смета како соодветен за скрининг е т.н. *розов бенгал тест (РБТ)*.

Учесници во реакцијата

- Познат (обоен, бактериски) антиген
- Непознати антитела (испитуван серум)

Постапка

1. На предметно стакленце (поединечни проби) или керамичка плоча со 96 вдлабнатини (кога има повеќе тест-серуми, што е почесто) се ставаат 25 - 30 μ l од секој серумски примерок.
2. Непосредно до серумот се става еднаков волумен на антиген.
3. После додавањето на последната капка антиген на плочата, серумот и антигенот темелно се мешаат (користејќи чисто стаклено или пластично стапче за секој тест посебно) за да се добие кружна или овална зона со дијаметар од приближно 2 cm.
4. Смесата нежно се меша 4 минути на собна температура ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), обично поставена на т.н. агитатор.
5. Појавата/отсуството на аглутинација се чита веднаш по завршувањето на периодот од 4 минути. Секоја видлива обоена (црвена, розова) аглутинација се смета за позитивна реакција (сл. 8.2.).

РБТ е многу чувствителен тест, но како и други серолошки тестови, понекогаш може да даде лажно-позитивен резултат (вакцинирани животни, или вкрстена реакција при инфекција на животните со *Yersinia enterocolitica* серотип 0 : 9). Затоа, позитивните серуми најчесто повторно се тестираат со користење на

соодветен потврден или комплементарен метод (ELSA, РВК). Спротивно на лажно-позитивните, лажно-негативните реакции се случуваат ретко.



Слика 8.2. Розова бенгал негативна, слабо позитивна и позитивна реакција

БАВНА АГЛУТИНАЦИЈА

Овде спаѓаат две методи кои се користат за детекција на антитела при дијагностика на одредена бактериска болест. Во тестот како антигени се користат суспензии на мртви или на инактивирани бактерии.

Бавна аглутинација со СЕРУМ

Тоа е *квантитативна* метода која се користи за да се одреди титар на антитела при дијагностика, на пример, на бруцелоза или на салмонелоза. Во овој тест, серија на двојно разреден тест-серум се инкубира со дефинирана антигенска суспензија во епрувети или микротитрациски плочи.

Учесници во реакцијата

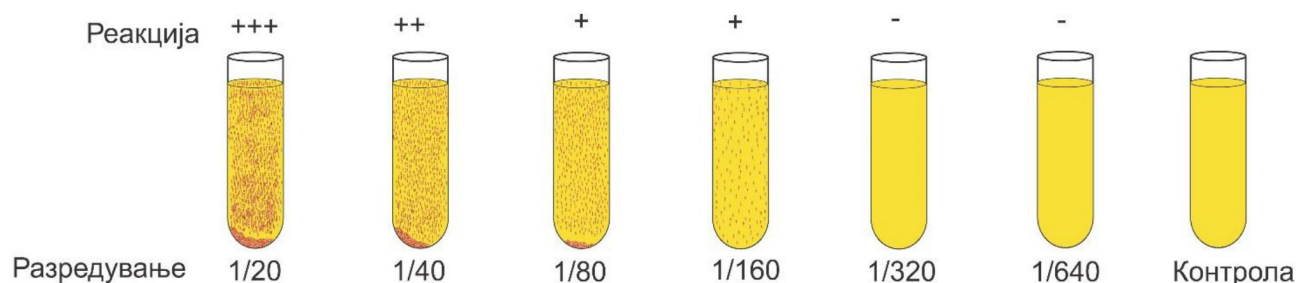
- Познат (бактериски) антиген
- Непознати антитела (испитуван серум)

Постапка

1. Физиолошки раствор 0,8 мл се додава во првата епрувета/бунарче, а по 0,5 мл во сите останати.
2. Потоа, *само во првата епрувета* се додава 0,2 мл од *испитуваниот серум* (се добива разредување од 1 : 5).
3. Од неа се префрла 0,5 мл, сега веќе разреден (1 : 5) серум, во втората епрувета/бунарче во која има 0,5 мл физиолошки раствор (се добива разредување од 1 : 10), а од оваа епрувета/бунарче во следната итн. Ова се повторува сè до последната епрувета/бунарче во која не се става од серумот бидејќи е контролна. На овој начин се добива првичното разредување на тестираниот серум - 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80
4. Како последна компонента во реакцијата, се става еднаква количина (0,5 мл) од стандардизирана антигенска суспензија во сите епрувети (вклучително и контролната), на кој начин се дуплира и добива

конечното (двократно) разредувања на серумот – 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 итн.

5. Епруветите се инкубираат на 37 °C и се читаат после 24 - 48 часа.
- Прво се прегледува *контролната епрувета* каде реакцијата е негативна (нема испитуван серум); течноста е рамномерно заматена, со оскуден талог со рамни ивици кој, ако се протресе епруветата, се распрскува во хомогена суспензија.
 - Истото ова се констатира и во епруветите со тест-серуми, каде агутинацијата е *негативна*.
 - Во оние епрувети каде реакцијата е *позитивна*, на дното на епруветата се наоѓа талог со нерамни ивици кој, ако епруветата се протресе, се распрскува во аглутинати („снегулки“); течноста над талогот е прозирна, избистрена (сл. 8.3). Најголемото разредување кое дава јасно видлива позитивна реакција се нарекува титар, кој дава проценка на количината на антитела присутни во тој серум.



Слика 8.3. Бавна аглутинација со серум во епрувети

Млечно-прстенеста проба (бавна аглутинација со МЛЕКО)

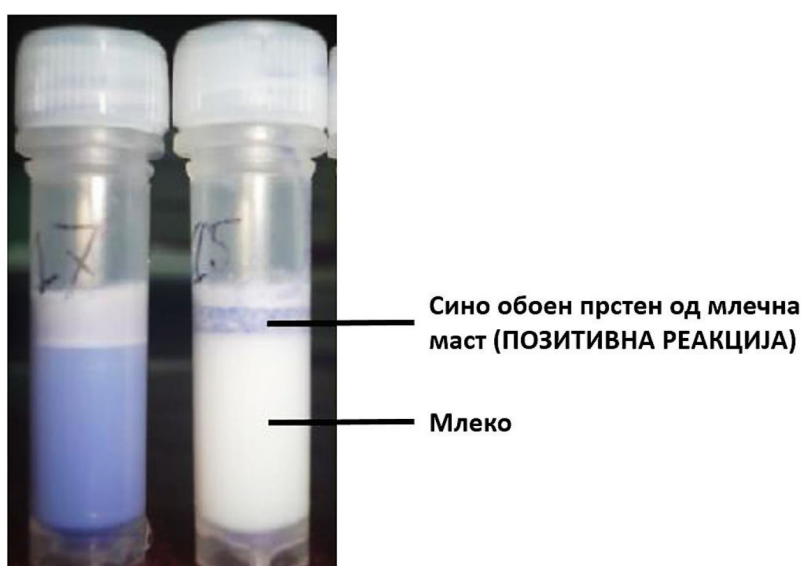
Принципот на бавна аглутинација во ветеринарната медицина може да се употреби и за детекција на антитела против бруцелоза во говедско млеко. Антителата против бруцела излачени во говедското млеко претежно се атсорбираат на млечните масни глобули (сложена структура составена од триглицериди и опкружена со мембрана, која овозможува одржување на млечната маст како емулзија). Кога антиген обоен со хематоксилин се додаде во млеко кое содржи специфични антитела, реакцијата на антиген-антитело се манифестира со пребојување на слојот млечна маст кој се издига на површината на млекото за време на периодот на инкубација. Формираниот слој е во вид на прстен, од каде потекнува и името на методата (млечно-прстенеста).

Учесници во реакцијата

- Познат антиген (бактериска суспензија од убиена *Brucella abortus* во фенолен раствор обоен со хематоксилин)
- Непознати антитела (испитувано млеко)

Постапка

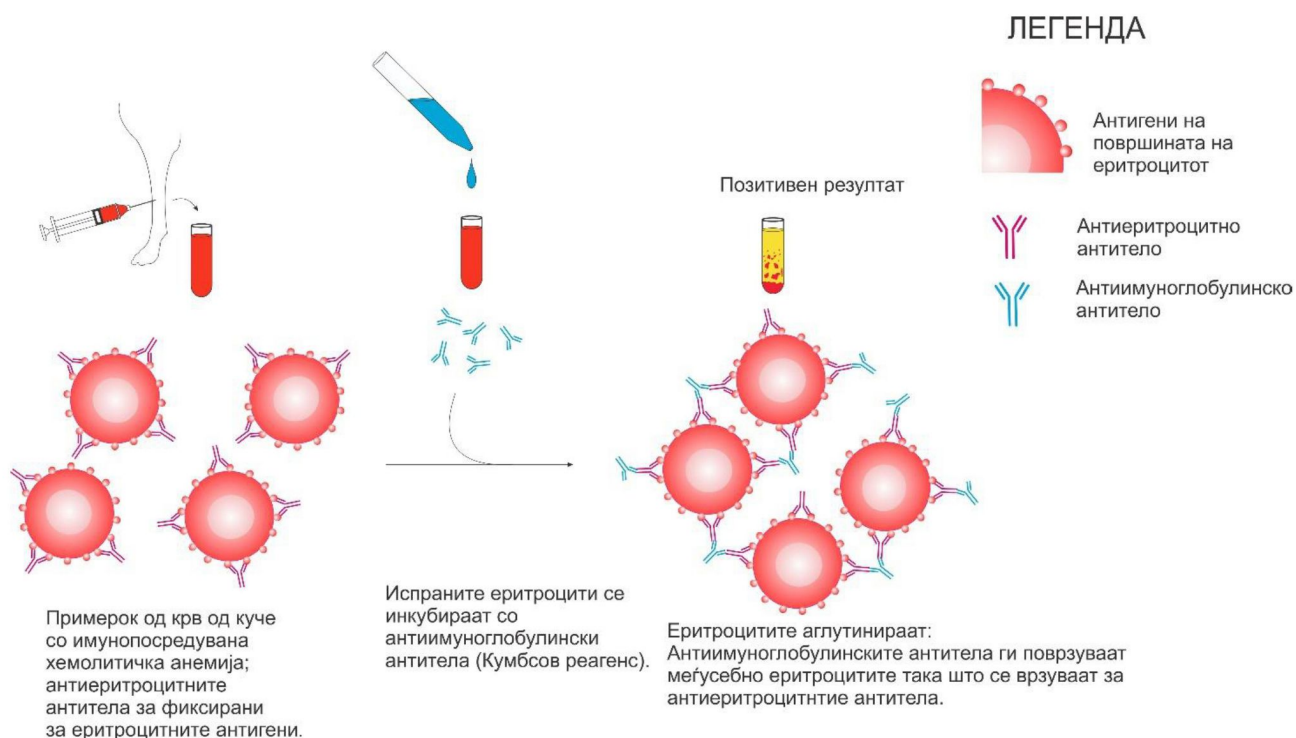
1. Мострите од млеко не смеат да бидат замрзнувани, загревани, изложени на интензивно тресење или складирани повеќе од 72 часа.
2. Во епруветка се додава 1 - 3 ml полномасно млеко.
3. Тестот се комплетира со додавање на 30 - 50 μ l антиген.
4. Мешавината млеко/антиген вообичаено се инкубира на $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 1 час, заедно со позитивни и со негативни контроли. Сепак, инкубацијата преку ноќ на $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ја зголемува чувствителноста и овозможува полесно читање на тестот.
5. Силно позитивната реакција се карактеризира со формирање на темносин прстен на површината од млекото (сл. 8.4). Тестот се смета за негативен ако бојата на основното млеко ја надминува онаа на слојот млечна маст.



Слика 8.3. Млечно-прстенеста проба. Млекото во десната епруветка покажува позитивен резултат (прстен од млечна маст поинтензивно обоен со сина боја во однос на основното млеко). Млекото во левата епруветка покажува негативен резултат

ДИРЕКТЕН АНТИМУНОГЛОБУЛИНСКИ ТЕСТ (Coombs-ов тест)

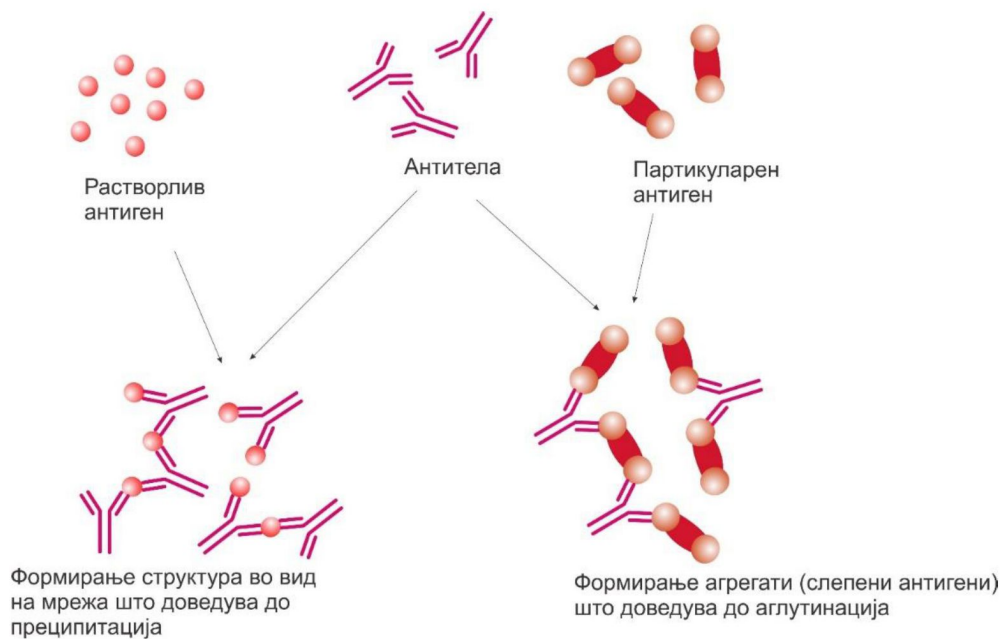
Директниот антиглобулински тест се користи за да се утврди присуство на неаглутирачки антитела (IgG) или комплемент (C3) на површината на вообличени антигени, како што се еритроцитите. Тестот се изведува така што од земениот примерок крв се издвојуваат и измиваат еритроцити со физиолошки раствор (како би се отстраниле неврзаните антитела кои може да го компримираат резултатот). Измиените еритроцити потоа се мешаат со антиимуноглобулини насочени против неаглутирачките антитела кои ги обложуваат овие клетки, и доколку се тие присутни на површината од еритроцитите ќе дојде до нивно слепување (аглутинација) (сл. 8.4). Тестот може да се користи за проверка на крвта пред процедури како што е трансфузијата на крв, или за да се открие присуство на некоја патолошка состојба (како што е автоимунa хемолитична анемија).



Слика 8.4. Директен антиимуноглобулински тест. Присуството на антиимуноглобулинот е потребно за да се аглутинаираат честичките обложени со неаглутиниращки антитела

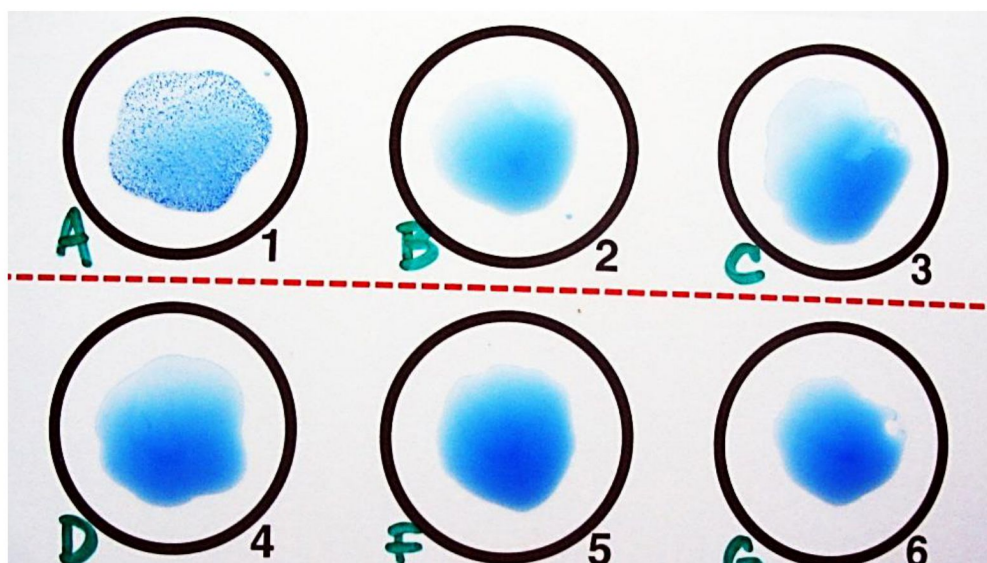
ТЕСТОВИ БАЗИРАНИ НА ИНДИРЕКТНА (ПАСИВНА) АГЛУТИНАЦИЈА

Бидејќи аглутинацијата е многу почувствителна техника од преципитацијата, понекогаш е корисно системот за таложење/преципитација да се конвертира во аглутиниращки (сл. 8.4). Ова може да се направи со хемиско поврзување на растворлив антиген или на специфични антитела со инертни честички како што се еритроцити, бактерии или латексни зрна.



Слика 8.4. Основна разлика помеѓу преципитацијата и аглутинацијата. Во суштина тоа зависи од големината на антигенската честичка - големите, оформени честички се аглутинираат, додека помалите растворливи молекули се таложат

ЛАТЕКС АГЛУТИНАЦИЈА. Латекс честичките (како и другите инертни честички) кога лабораториски ќе се обложат со прочистен антиген, ќе аглутинираат во присуство на специфични антитела во тест-серумот (познат антиген - непознати антитела). Спротивно, специфични антитела можат лабораториски лесно да се атсорбираат на латекс-честички и ќе аглутинираат во присуство на соодветниот антиген во тестираниот примерок (познати антитела - непознат антиген, сл. 8.5). Вториот принцип со атсорбција на специфични антитела на инертни честички уште се нарекува **реверзна пасивна аглутинација**.



Слика 8.5. Lancefield класификација (групи А, В, С, D, F и G) на изолиран сој стрептокок со латекс аглутинација. Во овој пример, изолатот припаѓа на стрептококите од Ланцефилд групата А

ПАСИВНИ ТЕСТОВИ ЗА ХЕМАГЛУТИНАЦИЈА. Покрај латексот, еритроцитите се меѓу најдобрите честички за оваа намена, а тестовите кои користат обложени еритроцити се нарекуваат пасивни тестови за хемаглутинација. Тоа е едноставна модификација на тестот за хемаглутинација каде овчи, пилешки или хумани еритроцити се обложени со антиген и инкубираат со тест-серум примероци за да се открие присуството на соодветните антитела.

Библиографија

- Tizard, Ian R. *Veterinary immunology* (Tenth edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]
- Michael J. Day, Ronald D. Schultz. *Veterinary Immunology - Principles and Practice* (Second Edition). *Chapter 4: Serological Testing*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014
- Gershwin, Laurel J., editor. *Case studies in veterinary immunology, chapter 'The clinical Immunology Laboratory'*. New York, NY: Garland Science, [2017]
- Ajay Grover, Virginia Litwin, And Gabriel Virella. *Diagnostic applications of immunology*. In: Gabriel Virella (Editor). *Medical immunology* [7th edition]. Taylor & Francis, 2020
- World Organisation for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, thirteenth edition 2024 (Updated 26/07/2024). Chapter 3.1.4. Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (version adopted in May 2022)
- Mona Sadeghalvad, Nima Rezaei. Introduction on Laboratory Tests for Diagnosis of Infectious Diseases and Immunological Disorders. In *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Volume 4, 2022, Pages 1-18
- EU Reference Laboratory for Brucellosis. *Standard Operating Procedure, Brucellosis, Milk Ring-Test*. October 2021
- MAS, Sarker et al (2014). Prevalence of brucellosis in dairy cattle in organized and smallholder farms in some selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 12. 167-171.
- Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>

9. ВИРУСНА ИНХИБИЦИЈА НА ХЕМАГЛУТИНАЦИЈА (И-ХА)

Хемаглутинини се површински вирусни протеини кои му овозможуваат на вирусот да се закачи за рецепторите на клетката домаќин и да навлезе во клетката. Некои вируси кои ги поседуваат овие протеини можат да ги поврзат и аглутинираат еритроцитите (*хемаглутинација*) од одредени животински видови. Такви вируси се ортомиксо- и парамиксовирусите, алфавирусите, флавивирусите и бунјавирусите, како и некои аденовируси, реовируси, парвовируси и коронавируси. Хемаглутинација индуцирана од вирус може да се искористи во лабораториската дијагностика на непознат вирус кој ја има оваа способност (*вирусна хемаглутинација*, ХА), додека *инхибицијата на вирусната хемаглутинација* (И-ХА) од страна на специфични антитела за одреден вирус може да се користи или како метод за идентификување на соодветниот вирус или за мерење на нивото на антитела во серумот.

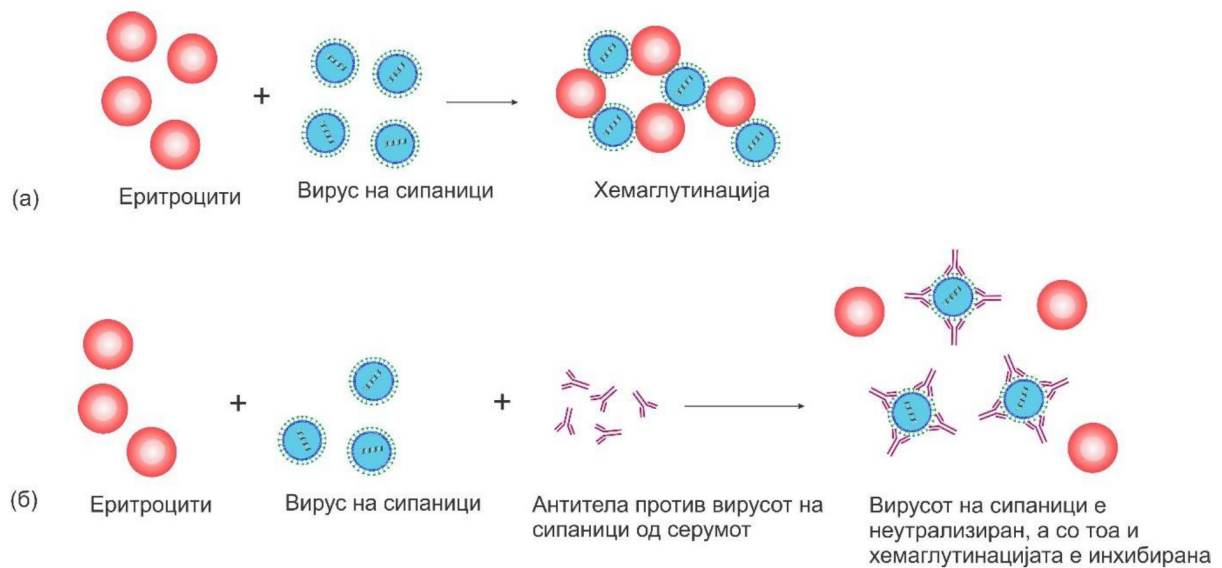
Инхибиција на хемаглутинација за докажување и титрација на нивото на антитела во серумот

Учесници во реакцијата

1. Познат антиген (вирусна суспензија)
2. Непознати антитела (испитуван серум)
3. Еритроцити од соодветен животински вид (кои вирусот ги аглутинира)

Принцип

Како што е веќе спомнато, хемаглутинацијата се јавува кога некој хемаглутинирачки вирус ќе се помеша со еритроцити (сл. 9.1). Но, ако испитуваниот серум (со потекло од животно кое дошло во контакт со тој вирус) се помеша со еритроцитите и со вирусна суспензија, тогаш аглутинацијата на овие крвни клетки е отсутна (*позитивен резултат*). Ова настанува затоа што антителата присутни во серумот на инфицираното/заболеното животно специфично реагираат со вирусните честички и ги неутрализираат хемаглутинините кои не можат да ги врзат и аглутинираат еритроцитите. Доколку испитуваниот серум на пациентот не содржи антитела против хемаглутинирачките протеини на тест-вирусот, хемаглутинацијата ќе се случи бидејќи површинските молекули се слободни да го овозможат овој ефект (*негативен резултат*).

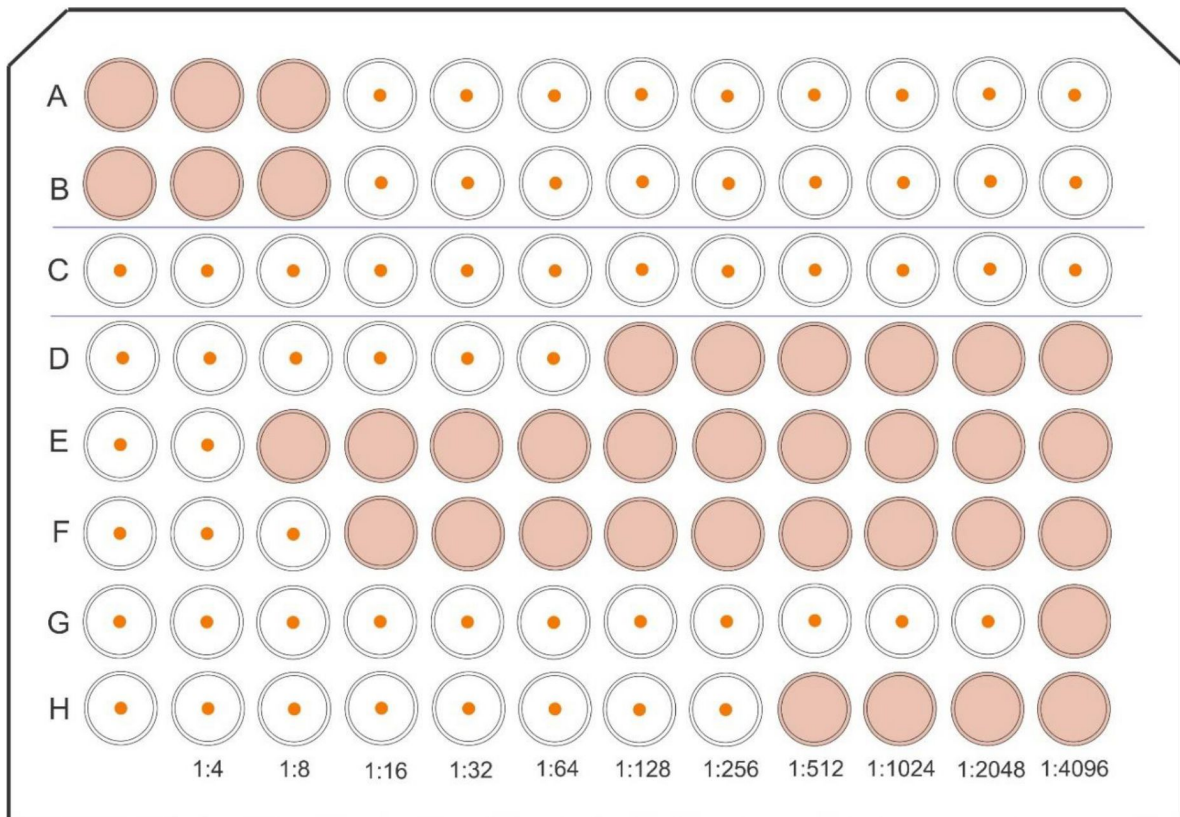


Сл.9.1. Принцип на вирусната инхибиција на хемаглутинација

Изведба

Тестот се изведува во микротитрациски плочи со 96 бунарчиња

1. Доколку вирусот кој се користи не е со познат ХА титар, тој се определува (титрација на вирусот)
2. Испитуваниот серум двократно се разредува (на пр. од 1 : 4 до 1 : 4096) во микротитрациската плоча
3. Се додава исто количество вирус во секое бунарче, освен за серумските контроли
4. Плочата се инкубира на собна температура
5. На крај, се додаваат еритроцитите и плочата повторно инкубира (на 4 °С)
6. После 30 минути, плочата се чита и резултатите се забележуваат (сл. 9.2.)



Сл.9.2. Тест за инхибиција на хемаглутинација (И-ХА) за откривање на антитела специфични за вирусот на кучешки грип (H3N8). Серумите се разредуваат двократно, после што во секое бунарче се додава еднаков волумен на антиген (вирус на кучешки грип, 4 хемаглутинин единици). Плочата се инкубира 30 минути и во секое од бунарчињата се додава еднаков волумен мисиркини еритроцити (0,5 % суспензија). И-ХА реакциите се читаат кога бунарчињата со контроли покажуваат целосно таложење на еритроцитите (видливо во формирање на црвена точка во средината на бунарчето).

Редови А, В: титрација на вирусната суспензија користена во тестот, која ја покажува точната количина на хемаглутинин додадена во тест-бунарчињата.

Ред С: контрола на еритроцити.

Редови D-H: тест-серуми од кучиња.

- Први бунарчиња во редовите *D-H*: контрола на серумот кој се тестира и која не покажува неспецифична аглутинација на еритроцити во најниското тестирано разредување.
- Останати бунарчиња во редовите *D-H*: И-ХА титри, кои се еднакви на последното разредување што покажува инхибиција на аглутинација на тестираниот вирус. Ред *D*: И-ХА титар 64; ред *E*: И-ХА титар, 4; ред *F*: И-ХА титар 8; ред *G*: И-ХА титар 2048; ред *H*: И-ХА титар 256.

Библиографија

Tizard, Ian R. *Veterinary immunology* (Tenth edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]

N. James MacLachlan and Edward J. Dubovi (editors). *Fenner's Veterinary Virology*, 5th Edition. Elsevier Inc., [2016]

10. РЕАКЦИЈА НА ВРЗУВАЊЕ НА КОМПЛЕМЕНТ (РВК)

Вовед

Комплементот е ензимски систем составен од 20 плазмини протеини кои учествуваат во специфичниот и во неспецифичниот одговор на организмот. Се наоѓа во секој свеж серум и е термолабилен (се инактивира на температура од 55 °C за 30 минути). Покрај другите улоги, битен е и за *имунолошки посредуваната цитоллиза* (вклучително и *хемоллиза*). Активирањето на комплементот со антитела врзани за антиген резултира со генерирање терминални комплекси кои го нарушуваат интегритот на клеточните мембрани. Ако антителата се врзат за еритроцитите, континуитетот на нивната надворешна клеточна мембрана ќе биде нарушен и ќе се појави хемоллиза. Овој феномен е искористен за проценка на нивото на серумски антитела во реакцијата на врзување комплемент (РВК).



Учесници во реакцијата





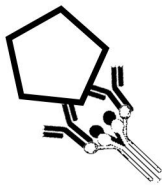







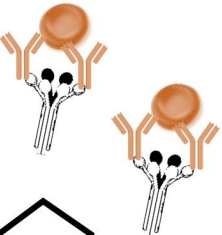

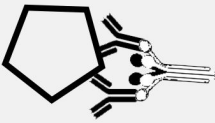
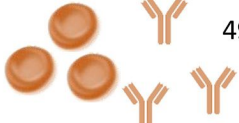
1. Непознати, испитувани антитела (инактивиран двократно разреден испитуван серум)
2. Познат антиген (антиген направен од микроорганизмот кој ја предизвикува болеста која ја испитуваме)
3. Точно определена количина на комплемент (серум од заморец)
4. Еритроцити од овен
5. Хемолизини од кунич (специфични антитела против еритроците од овен).

Принцип

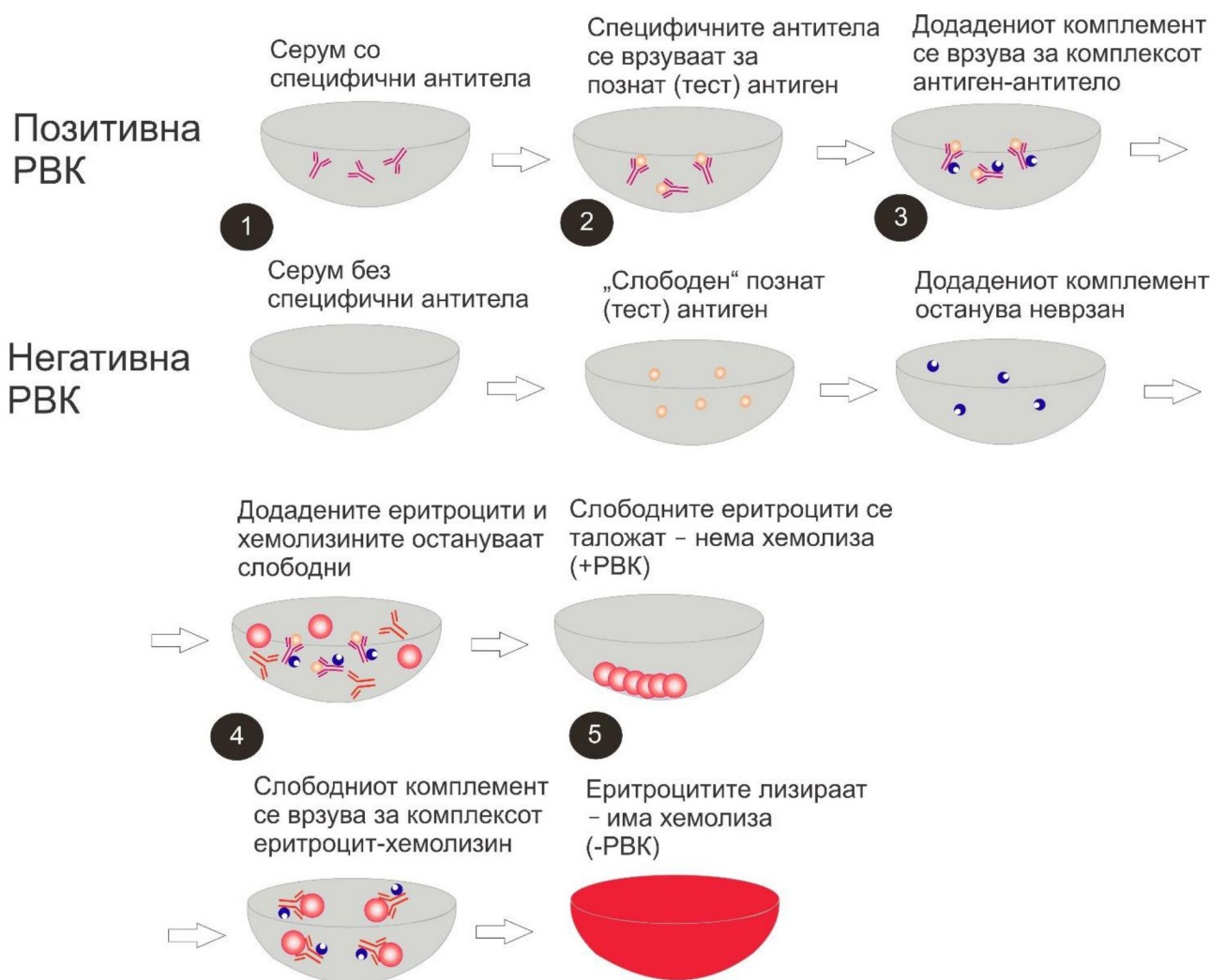
Активацијата на комплементот се случува кога *антителата ќе се врзат за антигенот* при што комплементот се *врзува во имуните комплекси* одн. „се троши“. Со следење на неговата судбина (дали се врзал одн. „потрошил“ или не) може да се добие и увид во исходот на изведената серолошка реакција. РВК-та е многу специфична *квалитативна и квантитативна* реакција со која обично се докажуваат (непознати) антитела со познат антиген додека обратното е доста ретко. Методата се изведува во *низ од епрувети* или во *микротитрациски плочи*, и се состои од два дела одн. реакции - главна (тест-систем, сл. 10.1. ①, ② и ③) и помошна (индикаторски систем, сл. 10.1. ④ и ⑤).

Постапка

Пример за „ - “ РВК-реакција	I. ГЛАВНА РЕАКЦИЈА (тест-систем)	Пример за „ + “ РВК-реакција
НЕИМУН ИСПИТУВАН СЕРУМ (отсуство на специфични антитела) + ПОЗНАТ 	Во епруветите одн. микротитрациските плочи се мешаат следните 3 компоненти: 1. Инактивиран двократно разреден испитуван серум (со непознати - испитувани антитела). Испитуваниот серум пред да влезе во реакцијата се загрева на температура од 55 °C 30 минути како би се инактивирал (уништил) комплементот. Потоа, тој се разредува	ИМУН ИСПИТУВАН СЕРУМ (присуство на специфични антитела) + ПОЗНАТ 

























<p>(ТЕСТ) АНТИГЕН + КОМПЛЕМЕНТ</p> 	<p>двократно во епрувети одн. микротитрациските плочи (на пр. од 1 : 4 до 1 : 1024). 2. Познат антиген. Во определена количина тој се додава во секое од претходно направените разредувања. 3. Серум од заморец (со точно определена количина на комплемент).</p>	<p>(ТЕСТ) АНТИГЕН + КОМПЛЕМЕНТ</p> 
ИНКУБАЦИЈА		
<p>нема имун комплекс = СЛОБОДЕН КОМПЛЕМЕНТ</p>  	<p>Се изведува на температура од 37 °C како би се овозможила реакција на антигенот и антителата:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Доколку ги има во испитуваниот серум, комплементот се врзува („троши“). • Обратно, ако нема специфични антитела кои би се врзале за антигенот, комплементот останува слободен. <p>Бидејќи реакцијата, било да е позитивна или негативна, не е видлива (нема видливи промени во епруветите одн. микротитрациските плочи), се продолжува со втората - помошна реакција.</p>	<p>има имун комплекс = ВРЗАН КОМПЛЕМЕНТ</p> 
II . ПОМОШНА РЕАКЦИЈА (индикаторски систем)		
  <p>ЕРИТРОЦИТИ +</p>  <p>ХЕМОЛИЗИНИ</p> 	<p>Во секоја епрувета/базенче се додаваат:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Еритроцити од овен и 2. Хемолизини од кунич (специфични антитела против еритроците од овенот). <p>Тие со комплементот (доколку е присутен) заедно претставуваат индикаторски систем на реакцијата.</p>	 <p>ЕРИТРОЦИТИ +</p>  <p>ХЕМОЛИЗИНИ</p> 
ЧИТАЊЕ НА РЕАКЦИЈАТА/ТЕСТОТ		
<p>ХЕМОЛИЗА „-“ РВК</p>  	<ul style="list-style-type: none"> • Во отсуство на специфични антитела во испитуваниот серум, комплементот останал слободен при што доаѓа до ХЕМОЛИЗА во помошната реакција (- НЕГАТИВНА РВК -). • Ако во испитуваниот серум имало специфични антитела кои реагирале со антигенот, комплементот се врзал и 	<p>НЕМА ХЕМОЛИЗА „+“ РВК</p>  

недостасува во втората - помошна реакција помеѓу хемолизините и еритроцитите одн. **ОТСУСТВО НА ХЕМОЛИЗА (+ ПОЗИТИВНА РВК +)**. Од ова се гледа важноста комплементот да биде во точно определена количина; ако е тој во вишок, во главната реакција нема да се потроши целата количина и ќе остане за помошната, при што ќе добиеме „лажно-негативна“ реакција (појава на хемолиза).



Слика 10.1. Позитивна и негативна РВК-реакција

Вообичаено е серумот што се тестира и да се титрира (квантификација на тестот) така што таму каде што има антитела, како тој се разредува така реакцијата во секоја епрувета/бунарче ќе се промени од *отсуство на лиза (позитивна реакција)* во *хемолиза (негативна реакција, сл. 10.2)*. Титарот кај РВК е највисокото разредување на серумот во кој не се лизирани повеќе од 50 % од еритроцитите.

Разредувања на испитуваниот серум	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Контролен серум	ТИТАР
Активна акутна инфекција							< 16
Реконвалесценција							≥ 256
Активна акутна инфекција							< 16
Реконвалесценција							= 64

Слика 10.2. Одредување на титар со реакцијата на РВК

Овој тип на тест во минатото бил многу важен за проверка на инфекции предизвикани од различни патогени, вируси, протозои и бактерии. Меѓутоа, целата постапка е комплицирана за изведба и бара многу контроли. Поради тоа, во голема мерка РВК-та е заменета со други типови на анализи, како што е ELISA-та.

Библиографија

- Tizard, Ian R. *Veterinary immunology* (Tenth edition). *Chapter 42: Immunodiagnostic Techniques*. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2018]
- Gershwin, Laurel J., editor. *Case studies in veterinary immunology, chapter 'The clinical Immunology Laboratory'*. New York, NY: Garland Science, [2017]
- Alhabbab, R.Y. (2018). Complement Fixation Test (CFT). In: *Basic Serological Testing. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77694-1_10

11. НЕУТРАЛИЗАЦИСКИ ТЕСТОВИ

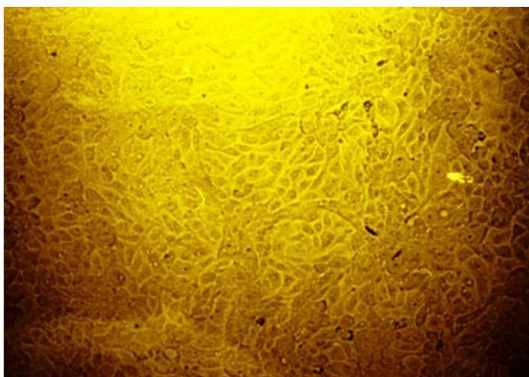
11.1 Општи карактеристики на неутрализациските тестови

Постојат многу методи и тестови со кои може да се детектираат антитела против вирусите, но со повеќето од нив не може да се направи разлика во оние антитела кои само се врзуваат за вирусот и во оние антитела кои имаат способност да ја спречат биолошката особина на вирусот да ги инфицира клетките. Вирус-неутрализациските тестови (или како уште се нарекуваат серум - неутрализациски тестови) се дизајнирани за детекција на титарот на специфичните антивирусни антитела кои имаат способност да се врзат за површинските молекули на вирионот и да го превенираат инфицирањето на клетките. Резултатите добиени со овој вид на метод даваат одлична корелација со нивото на заштита на домаќинот од инфекција со соодветниот вирус.

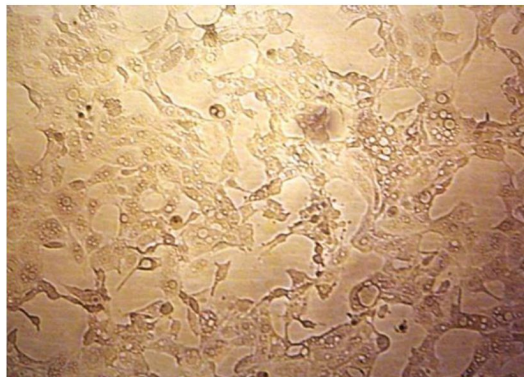
Преку неутрализациските тестови се врши проценка на способноста на антителата да неутрализираат одредена биолошка активност на антигените кога истите ќе се измешаат во *in vitro* услови. Овие тестови се користат за неутрализација на вирусите од страна на неутрализирачките антитела во насока на детекција одн. идентификација на непознат вирус со познати антитела или во правец на мерење на специфичните неутрализирачки антитела со користење на познат вирус. Покрај тоа неутрализациските тестови може да се користат за идентификација и на бактериски токсини како на пр. α -токсинот на *Clostridium perfringens* или стафилококниот α -токсин.

11.2 Тестови за детекција на неутрализирачки антитела

Размножувањето на вирусите во клеточна култура е придружено со оштетување на инфицираните клетки. Микроскопските промени на инфицираните клетки се означуваат како цитопатоген ефект (ЦПЕ) и може да бидат во форма на: промена во формата на клетките, одлепување на клетките од подлогата, создавање на синцициум, присуство на инклузиони телца во јадрото и/или во цитоплазмата на инфицираните клетки, клеточна смрт и др.



Слика 11.1 Култура на клетки MDBK



Слика 11.2 ЦПЕ предизвикан од вирус на говедска дијареја на MDBK-култура на клетки

Принцип

Тестовите за детекција на неутрализирачки антитела имаат широка примена во ветеринарната медицина. Овие тестови се базираат на можноста за неутрализација на одреден вирус од страна на за него специфични неутрализирачки антитела при што во културата на клетки приемчиви за вирусот се врши инхибиција на ЦПЕ. Сите вируси при размножувањето во клетките не предизвикуваат јасен ЦПЕ, поради што серум неутрализацискиот тест најчесто е комбиниран со додавање на комерцијални антитела одн. конјугат обележан со флуоресцентна боја или ензим пероксидаза. На ваков начин, оваа биолошка реакција меѓу вирусот и неутрализирачките антитела се прави „видлива“.

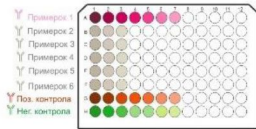
Учесници во реакцијата

- Познат вирус (во точно одредена концентрација)
- Култура на клетки
- Испитуван серум (во сериски разредувања)

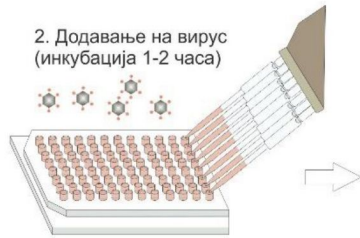
Постапка

1. Во микротитарска плоча се прават сериски разредувања на испитуваниот серум, позитивната контрола (серум со специфични антитела) и негативната контрола (серум без специфички антитела)
2. Во сите базенчиња на микротитарската плоча се додава познат вирус (во точно одредена концентрација)
3. Микротитарската плоча се инкубира 1 час на 37 °C со што се овозможува врзување на специфичните антитела (доколку постојат во испитуваниот серум) да се врзат за вирусот.
4. Се додава суспензија од клетки приемчиви за вирусот
5. Микротитарската плоча се инкубира 3 - 7 дена (во зависност од видот на вирусот) на 37 °C.
6. Микротитарските плочи секојдневно се прегледуваат за присуство и за отсуство на ЦПЕ.
7. Читањето се изведува со инвертен микроскоп. Последното разредување на серумот каде постои инхибиција на ЦПЕ се зема како титар на неутрализирачките антитела.

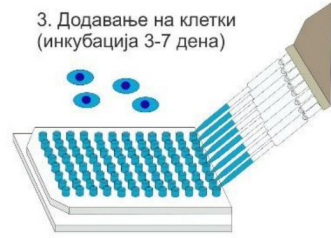
1. Разредување на серумот



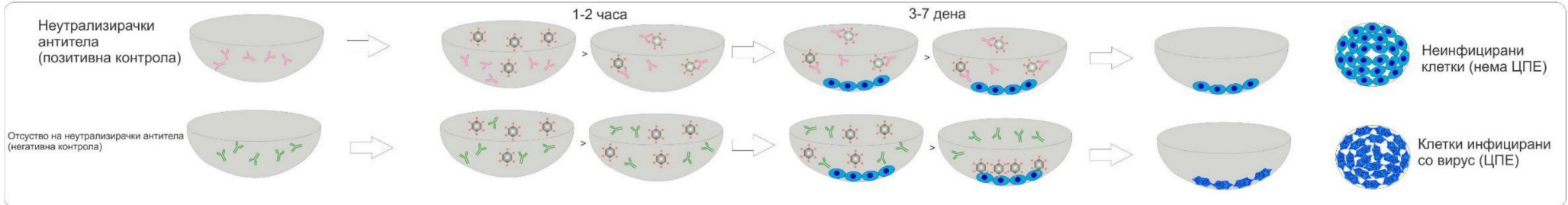
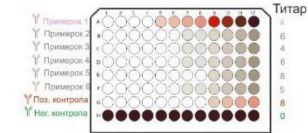
2. Додавање на вирус (инкубација 1-2 часа)



3. Додавање на клетки (инкубација 3-7 дена)



4. Детекција на ЦПЕ



Слика 11.1 Вирус-неутрализацки тест

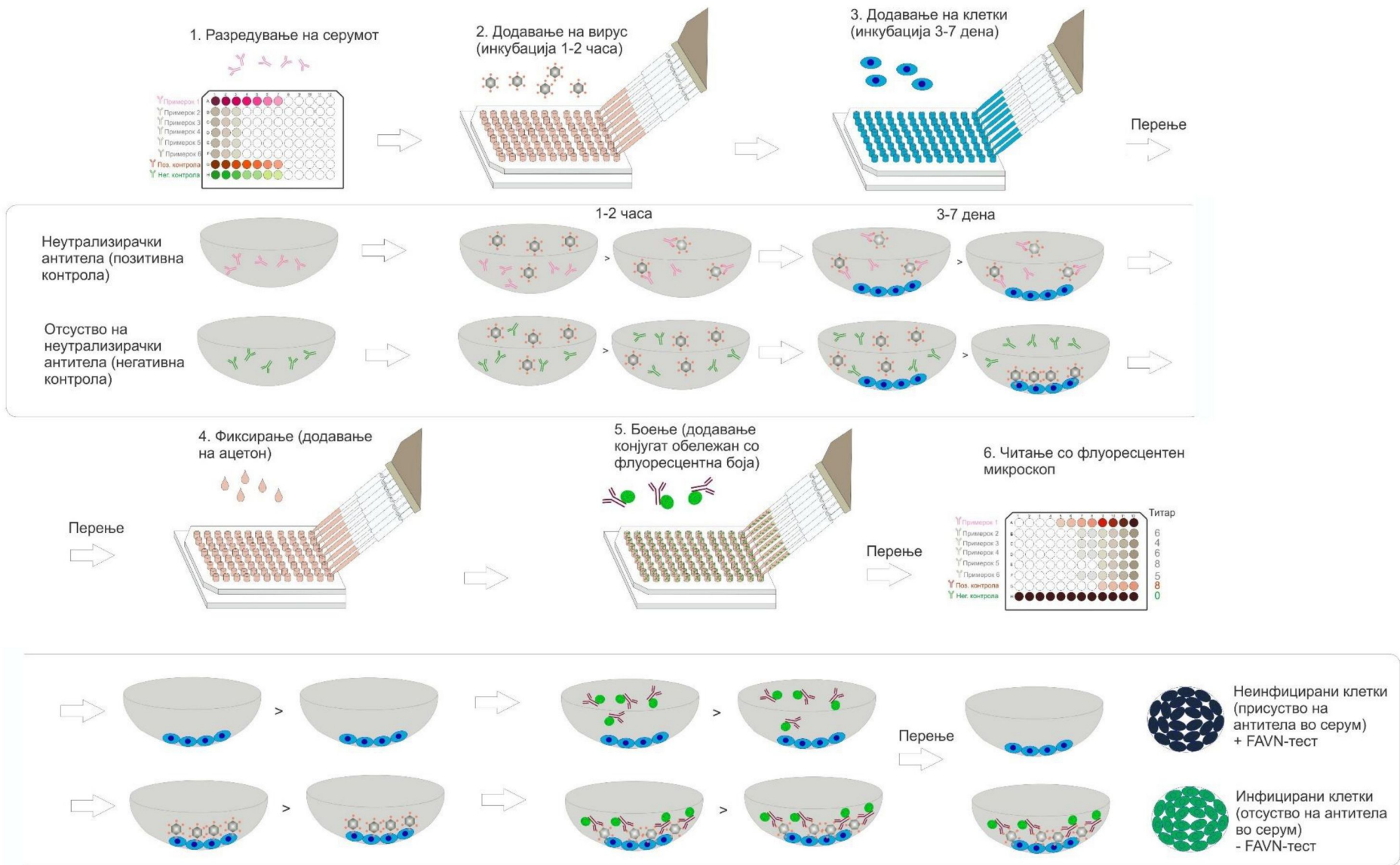
Флуоресцентниот вирус-неутрализирачки тест (FAVN - Fluorescent antibody virus neutralization assay) е стандарден/препорачан тест за детекција и квантификација на антителата против вирусот на беснило одн. утврдување на заштитниот титар против беснило.

Учесници во реакцијата

- Познат вирус (во точно одредена концентрација)
- Култура на клетки
- Испитуван серум (во сериски разредувања)
- Конјугат обележан со флуоресцентна боја (FITC)

Постапка

- Во микротитарска плоча се прават сериски разредувања на испитуваниот серум, позитивната контрола (серум со специфични антитела) и негативната контрола (серум без специфички антитела)
- Во сите базенчиња на микротитарската плоча се додава познат вирус (во точно одредена концентрација)
- Микротитарската плоча се инкубира 1 час на 37 °C со што се овозможува врзување на специфичните антитела (доколку постојат во испитуваниот серум) да се врзат за вирусот
- Се додава суспензија од клетки приемчиви за вирусот
- Микротитарската плоча се инкубира 3 дена на 37 °C и 5 % CO₂
- Се додава фосфатен пуфер одн. се врши перење на микротитарската плоча со цел да се отстрани вишокот вирус, неспецифични антитела, мртви клетки и сл.
- Се додава ацетон со цел за фиксирање на клетките за дното на базенчето и се инкубира 30 минути
- Се додава конјугат обележан со флуоресцентна боја и се инкубира 30 минути на 37 °C и 5 % CO₂
- Читањето се изведува со инвертен флуоресцентен микроскоп. Последното разредување на серумот каде нема флуоресценција (одн. размножување на вирусот во клетките) се зема како титар на неутрализирачките антитела.



Слика 11.2 Флуоресцентен вирус-неутрализациски тест

Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) *Veterinary immunology*. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). *Veterinary immunology: principles and practice*. Second edition. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.

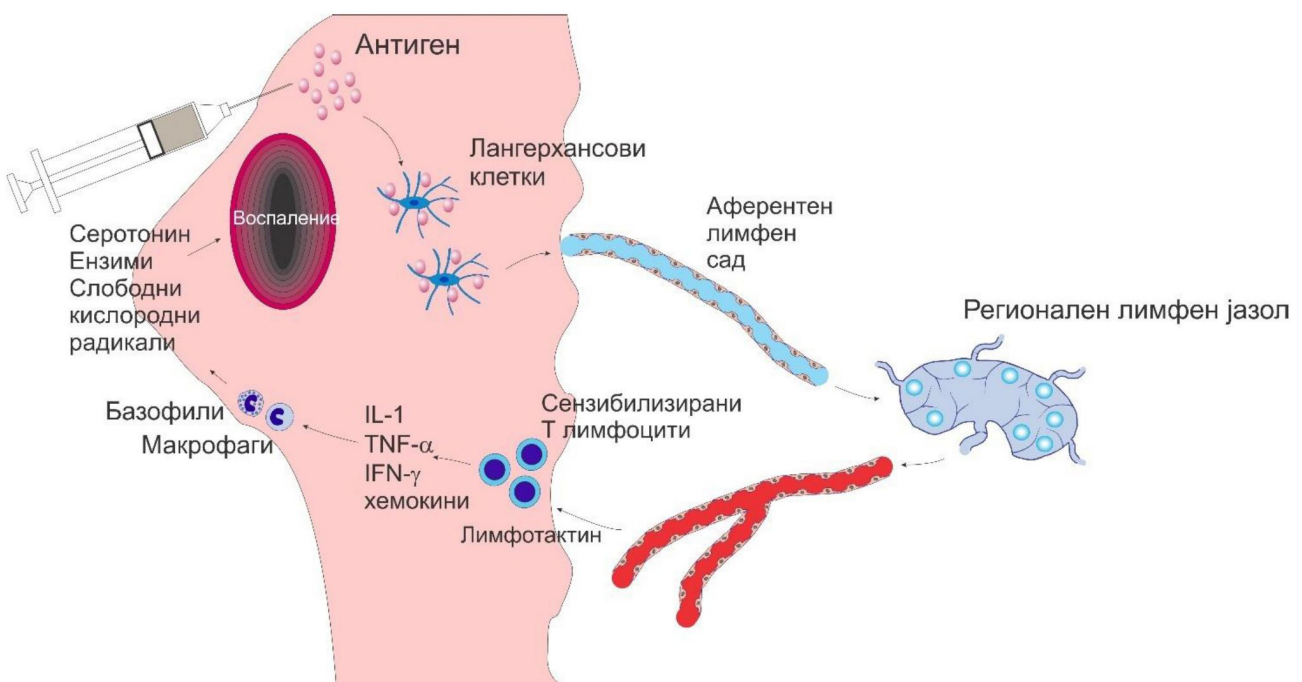
Cliquet, F., Aubert, M., & Sagne, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of immunological methods*, 212(1), 79-87.

12. ТЕСТОВИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА КЛЕТОЧЕН ИМУНОЛОШКИ ОДГОВОР

12.1 Краток осврт на основните карактеристики на доцниот тип на преосетливост

Тестовите за детекција на клеточниот имунолошки одговор се базирани на доцен тип на преосетливост одн. хиперсензитивност тип 4. За разлика од другите видови на преосетливост каде носители на имунолошкиот одговор се антитела, во овој случај тоа се сензибилизирани Т-лимфоцити. Во реакција со антигенот кој го поттикнал нивното создавање, настанува активација на овие лимфоцити, ослободување на цитокини и појава на воспалителна реакција. Овој тип на преосетливост најчесто е предизвикан од антигени од протеинска природа, но и од други молекули кои како хаптени може да се врзат за некој протеински носач. Овој вид на преосетливост се сретнува при инфекција со бактерии кои се факултативни интраклеточни паразити кои се предизвикувачи на хронични, грануломатозни воспаленија. Исто така може да биде предизвикан и од некои габи, вируси и паразити.

За да може да предизвика сензибилизација, антигенот мора да биде обработен и соодветно презентираан на Т-лимфоцитите во склоп на МНС II комплексот на површината на антиген-презентирачките клетки. Доколку станува збор за инфекција со бактерии кои се факултативни интраклеточни паразити како бактериите од *Mycobacterium tuberculosis* комплексот, овој процес се одвива во тек на размножувањето на бактериите во клетките. По препознавањето на презентираниот антиген, Т-лимфоцитите започнуваат да се делат со што настанува клон од специфично сензибилизирани Т-лимфоцити. При повторна средба со антигенот кој го предизвикал нивното создавање, сензибилизираните Т-лимфоцити излучуваат цитокини со чија помош поттикнуваат насобирање и активирање на моноцити како и на други мононуклеарни клетки и предизвикуваат воспаление.



Слика 12.1 Механизам на реакција на доцен тип на преосетливост

12.2 Интрадермален туберкулински тест

Типичен пример на реакција на доцен тип на преосетливост е интрадермалниот туберкулински тест (ИТТ). Според Светската организација за здравје на животните (World Organization for Animal Health- WOAH), ИТТ е стандардна метода за детекција на инфекцијата со бактерии од *Mycobacterium tuberculosis* комплексот кај различни видови цицачи: говеда, овци, кози, свињи, цервиди камили и др.

Учесници во реакцијата:

- Антиген/алерген – прочистен протеински дериват (ППД)
- Т-лимфоцити

Принцип

Принципот на оваа метода се темели на доцен тип на преосетливост, преку развој на локално воспаление како резултат на повторна реакција на сензибилизирани Т-лимфоцити со антигенот кој го предизвикал нивното создавање. Овој тест може да се користи како единичен интрадермален туберкулински тест (ЕИТТ) кој може да биде цервикален (на вратот) или каудален (на опашката) со користење на ППД – туберкулин од *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) или компаративен цервикален интрадермален туберкулински тест (КИТТ) со симултана апликација на туберкулин од *M. bovis* и туберкулин од *Mycobacterium avium* (*M. avium*). Единичниот тест има поголема сензитивност, за разлика од компаративниот кој има поголема специфичност и се користи за дистинкција на инфицираните животни со бактерии од *Mycobacterium tuberculosis* комплексот од оние животни инфицирани со нетуберкулозни микобактерии.

Доцниот тип на преосетливост се развива од 3 до 6 недели по инфекција, така што точната дијагностика кај скоро инфицирани или имунокомпромитирани животни може да биде доведена во прашање при што таквите животни може да бидат лажно-негативни.

Постапка

- **Единичен интрадермален туберкулински тест (ЕИТТ) кај говеда**

Единичниот цервикален туберкулински тест се изведува со апликација на туберкулин од *M. bovis* сој AN5.

Пред апликацијата, од местото на инјектирање се отстрануваат влакната и со кутиметар се мери и забележува дебелината на кожниот набор. При туберкулинизацијата, туберкулинот се вбригува интрадермално, од левата страна на вратот и тоа за ширина на дланка кранијално од предниот раб на лопатката и за една дланка вентрално од работ на вратот. Читањето се одвива по 72 часа со што со кутиметар се мери и забележува дебелината на кожниот набор.

Интерпретација на ЕИТТ

Задебелување на кожен набор по апликација на туберкулин од <i>M. bovis</i>	Интерпретација на резултатите
≤ 2 mm	НЕГАТИВНА РЕАКЦИЈА
>2 mm <4 mm	СОМНИТЕЛНА РЕАКЦИЈА
≥ 4 mm	ПОЗИТИВНА РЕАКЦИЈА

- **Компаративен интрадермален туберкулински тест (КИТТ) кај говеда**

Компаративниот цервикален туберкулински тест се изведува со симултана апликација на туберкулин од *M. bovis* сој AN5 и туберкулин од *M. avium* сој D4ER или TB56.

Пред апликацијата, од местото на инјектирање се отстрануваат влакната и со кутиметар се мери и забележува дебелината на кожниот набор. При туберкулинизацијата, туберкулинот се вбригува интрадермално, од левата страна на вратот и тоа за ширина на дланка кранијално од предниот раб на лопатката и за една дланка вентрално од работ на вратот. Растојанието меѓу местото на апликација на туберкулин од *M. avium* и местото на апликација на туберкулин од *M. bovis* мора да биде 10 – 15 см. Читањето се одвива по 72 часа со што со кутиметар се мери и забележува дебелината на кожниот набор на местото на апликација на двата туберкулина.

Интерпретација на КИТТ

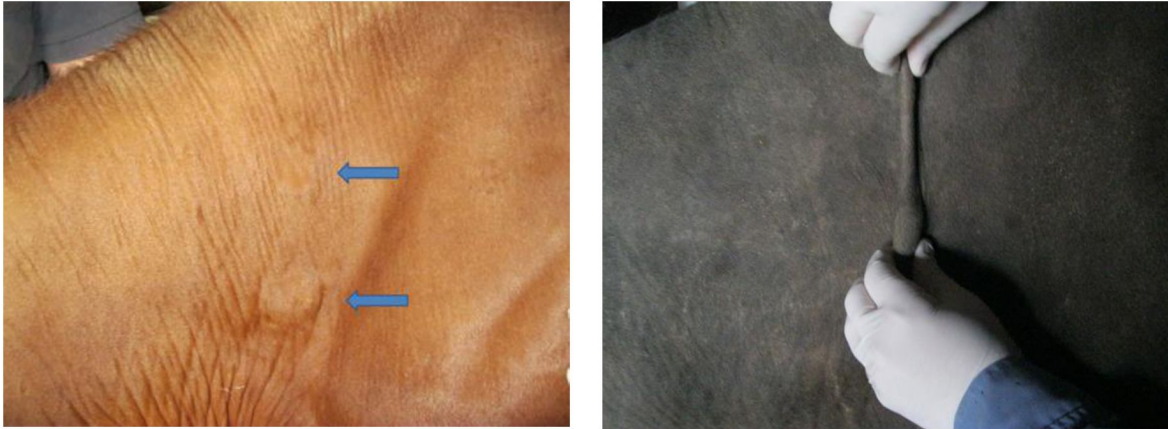
Прва серија на тестирање

Реакција на туберкулин од <i>M. bovis</i> ΔB (mm)	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Интерпретација на резултатите
<2	-	НЕГАТИВНА
≥ 2	≤ 0	НЕГАТИВНА
	$>0 \leq 4$	СОМНИТЕЛНА
	>4	ПОЗИТИВНА

Повторно тестирање на сомнителни случаи

Реакција на туберкулин од <i>M. bovis</i> ΔB (mm)	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Интерпретација на резултатите
<2	-	НЕГАТИВНА
≥ 2	≤ 0	НЕГАТИВНА
	$>0 \leq 4$	ПОЗИТИВНА*
	>4	ПОЗИТИВНА

*Интерпретацијата на резултатите во овој случај може да биде и позитивна во случај на повторно тестирање на претходна сомнителна реакција, а во контекст на ерадикација на заболувањето.



Слика 12.2 Пример за позитивна реакција на КИТТ

12.3 Лабораториски тестови за детекција на клеточен имунолошки одговор преку тестирање на примероци крв

Покрај интрадермалниот туберкулински тест, за мерење на клеточниот имунолошки одговор, постојат и комерцијални тестови базирани на детекција на гама-интерферон во примерок од полна крв.

Учесници во реакцијата:

- Антиген/алерген – прочистен протеински дериват (ППД)
- Т-лимфоцити

Принцип

Принципот на оваа метода се темели на детекција на цитокинет гама-интерферон кај животни (говеда, овци, кози, бафала) кои се инфицирани со *M. bovis*. Овој тест најчесто се користи како дополнителен тест во програмите за искоренување на туберкулозата. Овој тест дава брзи резултати, инфекцијата може да се детектира порано отколку со интрадермалниот туберкулински тест и има висока сензитивност.

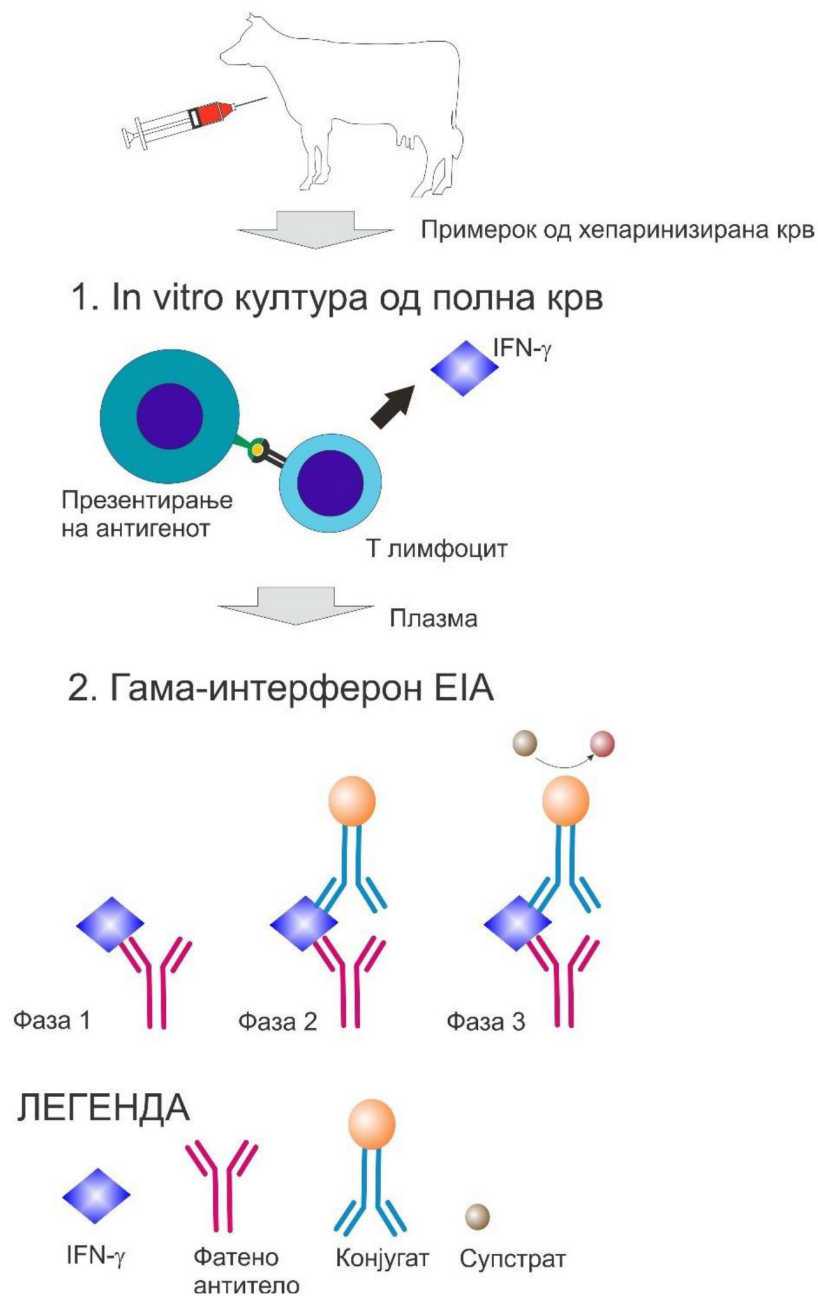
Постапка

Примероците полна крв се препорачува да се транспортираат до лабораторијата избегнувајќи екстремни температури (17 – 27 °C) и испитувањето да се започне што е можно поскоро, но не подоцна од денот по земањето крв. Примероците крв се инкубираат преку ноќ на 37 °C со ППД со цел да се стимулираат лимфоцитите за продукција на гама-интерферон. Лимфоцитите на неинфицирани говеда не создаваат гама-интерферон под дејство на ППД што значи дека продукцијата на овој цитокин е во корелација со инфекцијата. По инкубацијата, од полната крв се одвојува плазмата во која со помош на „сендвич“ ELISA се детектира гама-интерферон. Во случај кога крвта потекнува од животно инфицирано со *M. bovis*, создадениот

гама-интерферон се врзува за прифаќачкото антитело од ELISA-китот. На овој комплекс се врзува конјугатот обележан со ензим, по што додадениот супстрат ја менува бојата.

Интерпретација на тестот

Интерпретацијата на тестот се изведува спектрофотометриски според утврдената гранична вредност согласно со упатството на производителот.



Слика 12.3 Постапка на детекција на гама-интерферон

Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) Veterinary immunology. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). Veterinary immunology: principles and practice. Second edition. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.

WOAH Terrestrial Manual 2023. Mammalian tuberculosis (Infection with *Mycobacterium tuberculosis* complex) Chapter 3.1.13.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.13_MAMMALIAN%20TB.pdf

CFSPH, 2019, Zoonotic Tuberculosis in Mammals, including Bovine and Caprine Tuberculosis, https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf

13. УПОТРЕБА НА БРЗИ ИМУНОХРОМАТОГРАФСКИ ТЕСТОВИ

13.1 Краток осврт на основните карактеристики на брзите дијагностички тестови

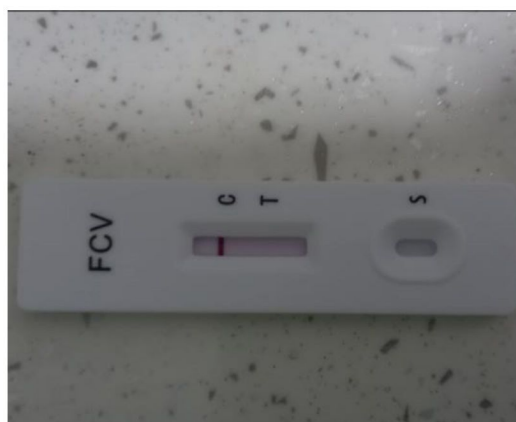
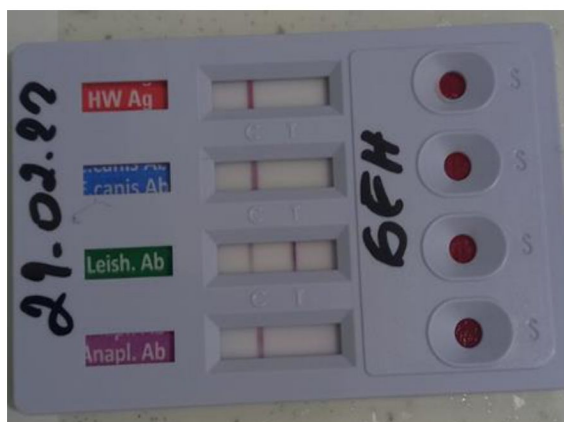
Брзите тестови за дијагностика или како уште се нарекуваат „тестови на местото на нега“ (POCT- Point of Care Tests) се тестови кои може да се изведуваат надвор од специјализирани лаборатории за дијагностика. Овие тестови се за еднократна употреба, резултатот се добива за неколку минути и наоѓаат широка примена во практиката.

Постојат голем број вакви тестови кои се употребуваат за различни цели. Во однос на дијагностика на заболувања од инфективна и од паразитска природа, овие тестови може да се однесуваат на:

- Тестови за детекција на антиген – антигените компоненти на патогените се детектираат со помош на специфични антитела;
- Тестови за детекција на антитела – детекцијата се врши директно од примерок на серум;
- Тестови за детекција на нуклеинска киселина – детекција на ДНК или РНК на патогените микроорганизми;
- Тестови за детекција на протеини на домаќинот како биомаркери – детекција на протеини на акутна фаза, цитокини и сл.

Во хуманата медицина овие брзи тестови може да се изведуваат во амбуланти, прирачни места за тестирања на гранични премини, аеродроми и сл. како и во домот на луѓето - искуство со кое се сретна човештвото особено во време на пандемијата со КОВИД-19.

Во ветеринарната медицина, употребата на овој вид на дијагностички тестови датира од 1983/84 година со употребата на тестот за дијагностика на *Dirofilaria*. Во ветеринарната медицина, брзите тестови може да се употребуваат на фарма, во ветеринарните амбуланти/клиники или во местото на живеење на милениците. Овие тестови се комерцијално достапни за испитување на едно или на повеќе заболувања.



Слика 13.1 Комерцијални брзи тестови

Дијагностичките тестови базирани на латерален проток (**LFA- Lateral flow assay, LFDs- Lateral flow devices**) може да имаат имунолошка основа одн. да служат за детекција на антиген или на антитела, но постојат и такви кои не се на имунолошка основа и се користат за докажување на хемиски материи, контаминенти или токсини во примероци храна и вода, биохемиски параметри како гликоза, лекови и нивни метаболити. Исто така постојат и тестови од овој тип на база на амплификација на нуклеински киселини (како LAMP - Loop-Mediated Isothermal Amplification и PCR - polymerase chain reaction) со кои се детектира ДНК или РНК на патогените микроорганизми.

Дијагностичките тестови базирани на латерален проток кои имаат имунолошка основа во литературата се поистоветуваат со брзите имунохроматографски тестови. И двата вида тестови се базираат на миграцијата на течен примерок низ мембрански стрип кој содржи специфични реагенси кои реагираат со целниот анализат (како антиген или антитело) во примерокот. Оваа интеракција води до формирање на видлива линија која укажува на позитивен резултат одн. присуство на целниот анализат во примерокот. Овие тестови може да се користат за различни видови примероци одн. полна крв, серум, плазма, фецес, урина, цереброспинална течност и др.

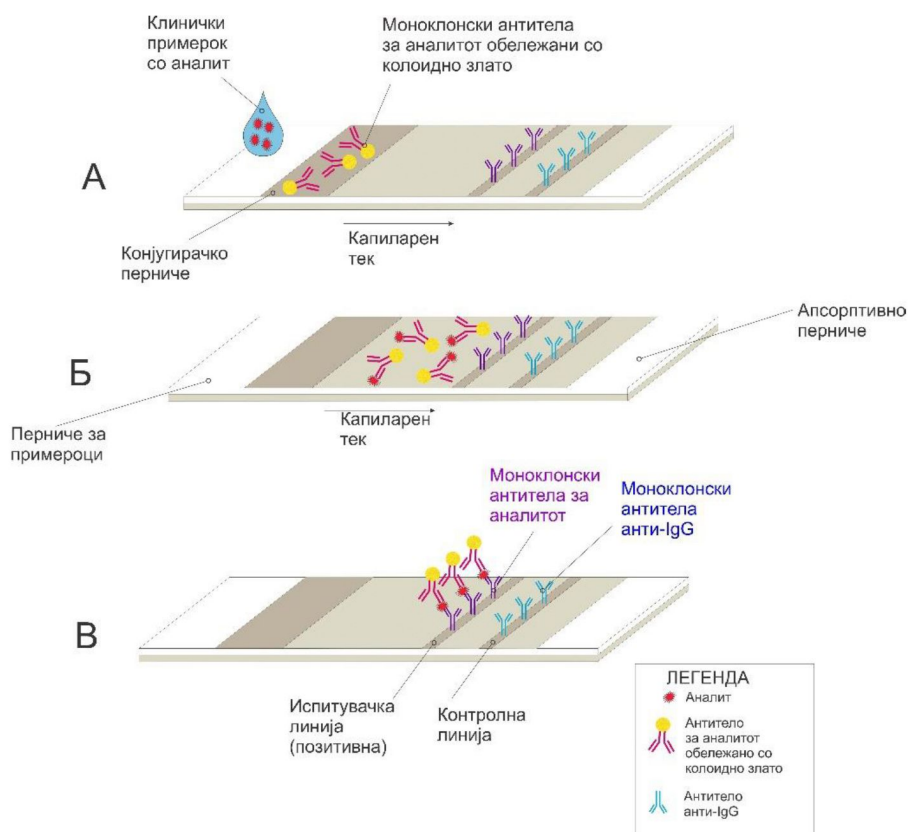
13.2 Имунохроматографски тестови базирани на латерален проток

Имунохроматографските тестови (ИХТ) се пластични стрипови кои ги имаат следните составни делови:

1. **Подлога за примерок.** Оваа подлога е направена од целулоза или од стаклени влакна кои имаат голема апсорптивна моќ и овозможуваат подеднаква дистрибуција на примерокот по должината на стрипот. На ова место се аплицира примерокот (серум, плазма, урина, полна крв, суспензија од брис и сл.),
2. **Подлога за конјугирање.** Исто како и подлогата за примерокот, и оваа подлога е направена од порозен материјал – целулоза или стаклени влакна. Во неа се содржат реагенсите за детекција одн. антигени или антитела кои се конјугирани со златни наночестички, бои или перли од латекс. Кога примерокот доаѓа до овој дел, целниот анализат (доколку е присутен) се врзува за конјугираните антигени или антитела создавајќи комплекс кој подоцна може да се визуализира.
3. **Мембрана.** Обично е направена од нитроцелулоза или поливинилиден флуорид. Овие материи имаат висок афинитет за врзување на протеините со што се овозможува ефикасна имобилизација на антигените и на антителата. На ова место се случува видливата реакција со која се детерминира дали тестот е позитивен или негативен. На мембраната се видливи две линии:
 - **Тест-линија:** Оваа линија содржи имобилизирани антитела или антигени кои се специфични за целниот анализат. Доколку анализатот е присутен во примерокот, заедно со конјугираните антигени или антитела се врзуваат тука и формираат видлива линија.
 - **Контролна линија:** Оваа линија е всушност контрола на квалитетот на тестот со која се осигурува дека тестот функционира. Оваа линија содржи имобилизирани

антитела кои се дизајнирани да ги прифатат конјугираните честички. Видливата контролна линија укажува дека примерокот се движел низ стрипот и инкорпорираните регенси работат соодветно на декларираното.

4. **Апсорптивна подлога.** Направена од целулоза или од сличен апсорптивен материјал и служи за осигурување на еднонасочното движење на примерокот, прифаќање на вишокот течност со што се оневозможува враќање на течноста назад кон нитроцелулозната мембрана.
5. **Надворешна обвивка.** Надворешната обвивка е најчесто направена од пластика, го дава обликот на тестот и овозможува структурна поддршка на неговите внатрешни компоненти.



Слика 13.2 Имунохроматографски тест базиран на латерален проток

13.2.1 Имунохроматографски тестови за детекција на антиген

Имунохроматографските тестови за детекција на антиген во ветеринарната медицина се користат за докажување на: *Dirofilaria*, *Parvovirus*, *Coronavirus*, *Giardia* кај кучиња, *Parvovirus*, *Coronavirus*, *Giardia* кај мачки, *Cryptosporidium*, *E. coli* K99, *Rotavirus*, *Coronavirus* кај говеда и др.

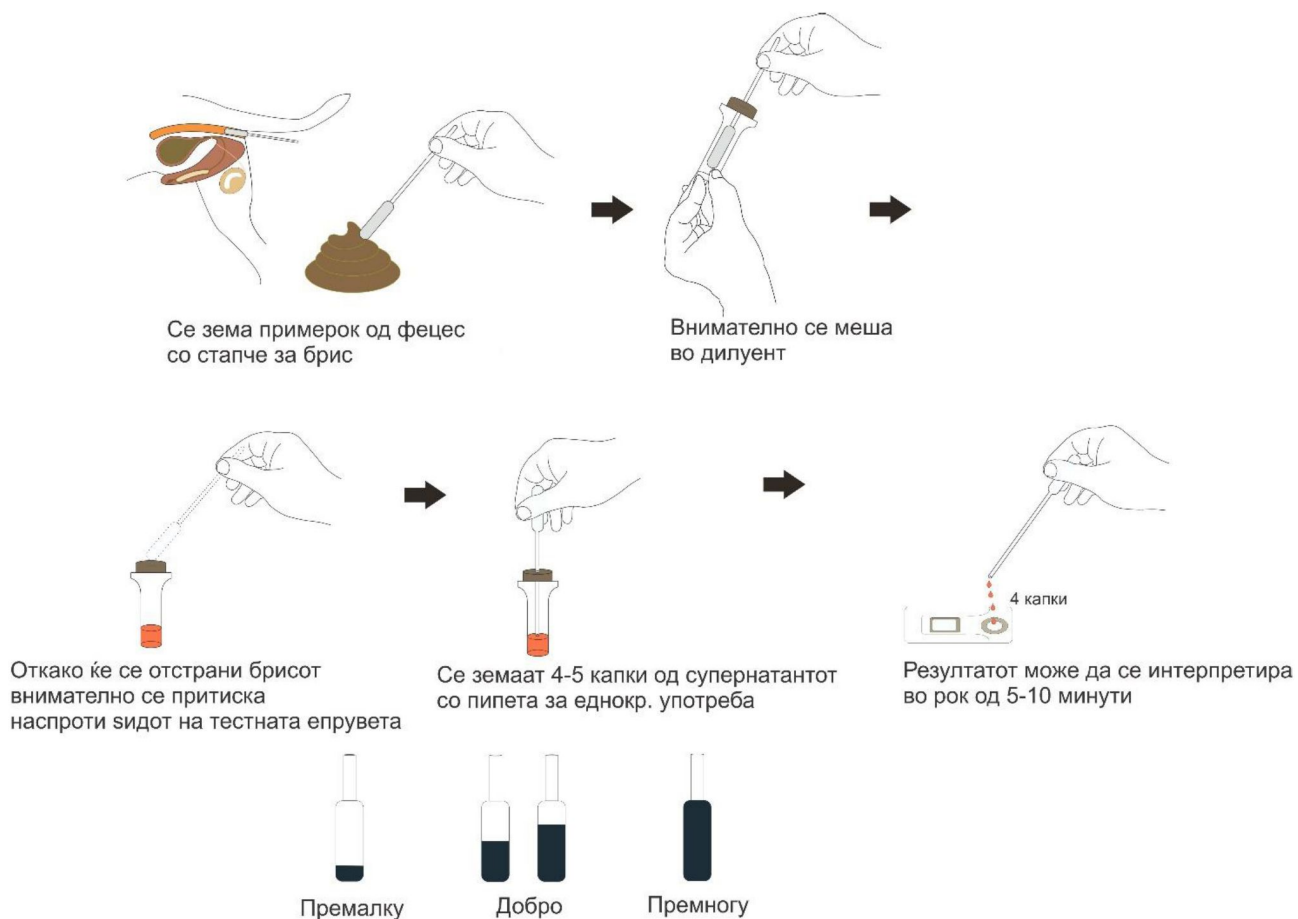
Учесници во реакцијата

- Антиген како целен анализ во примерокот
- Конјугирани антитела
- Антитела на мембраната

Принцип

Принципот на тестот се базира на врзување на антигенот како целен анализ со конјугираните антитела специфични за антигенот и нивно движење кон нитроцелулозната мембрана каде се имобилизираат со антителата на тест-линијата.

Постапка



Слика 13.3 Имунохроматографски тест за докажување на антиген во фецес

Интерпретација

- Позитивен резултат: видливи се контролната линија (K) и тест-линијата (T)
- Негативен резултат: видлива е само контролната линија (K)
- Невалиден резултат: контролната линија (K) не е видлива одн. тестот не функционира точно.

13.2.2 Имунохроматографски тестови за детекција на антитела

Имунохроматографските тестови за детекција на антитела во ветеринарната медицина се користат за докажување на антитела против: *Brucella canis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma spp.* и *Leishmania* кај кучиња, *Coronavirus* и *Toxoplasma gondii* и имунодефициентниот вирус кај мачки и др.

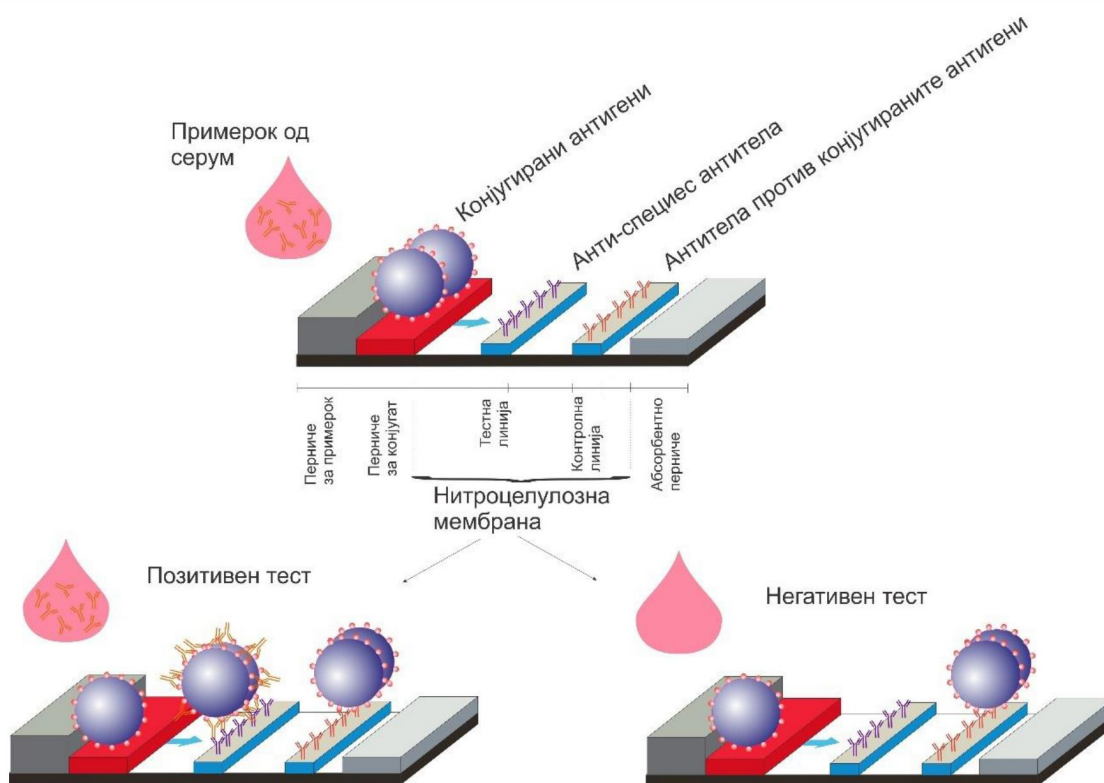
Учесници во реакцијата

- Антитела како целен аналит во примерокот
- Конјугирани антигени
- Антитела на мембраната

Принцип

Принципот на тестот се базира на врзување на антителата како целен аналит со конјугираните молекули/антигени специфични за антителата и нивно движење кон нитроцелулозната мембрана каде се имобилизираат со антигените на тест-линијата

Постапка



Слика 13.4 Имунохроматографски тест за докажување на антитела

Интерпретација

- Позитивен резултат: видливи се контролната линија (K) и тест-линијата (T)
- Негативен резултат: видлива е само контролната линија (K)

- Невалиден резултат: контролната линија (K) не е видлива одн. тестот не функционира точно.

13.3 Брзи дијагностички тестови на база на ELISA-техника

Друг вид „тестови на местото на неѓа“ кои интензивно се користат во ветеринарната медицина се тестови кои ја комбинираат технологијата на тестови со латерален проток и ELISA-техника. Овие тестови се комерцијално достапни како SNAP-тестови.

Основната разлика меѓу овие и претходно опишаните тестови е што кај SNAP-технологијата постои двонасочен проток и сигнална амплификација со што се зголемува сензитивноста и специфичноста на тестот.

13.3.1 Брзи дијагностички тестови на база на ELISA-техника за детекција на антиген

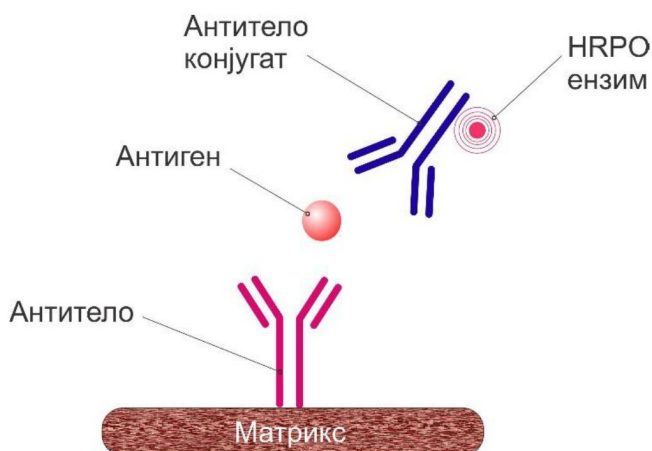
Овие тестови за детекција на антиген во ветеринарната медицина се користат за дијагностика на: Parvovirus, Giardia, Dirofilaria, Anaplasma, Erlichia кај кучиња, вирусот на мачешка леукемија и др.

Учесници во реакцијата

- Антиген како целен анализат во примерокот
- Обележани антитела со ензим (конјугат)
- Имобилизирани антитела специфични за антигенот

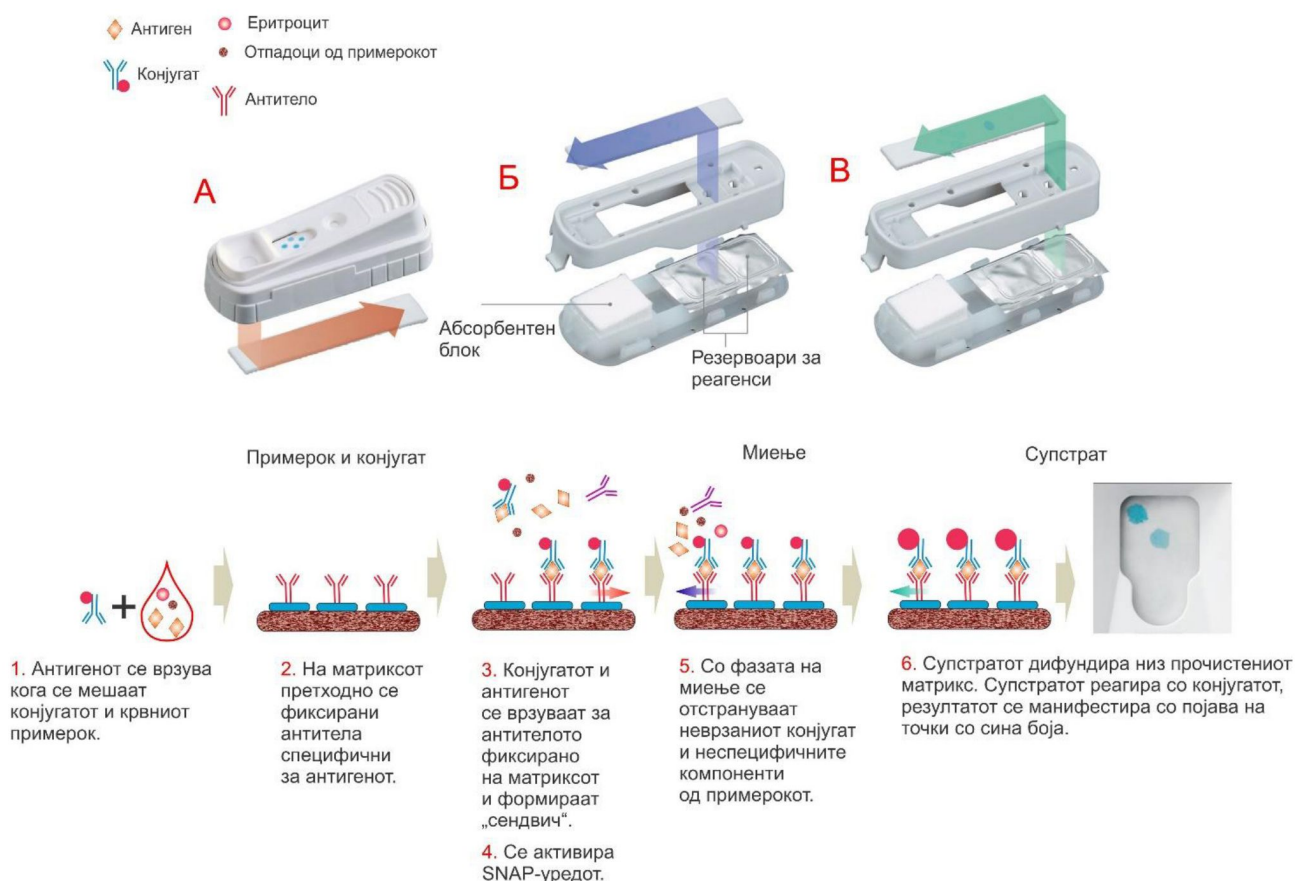
Принцип

Принципот на тестот се базира на врзување на антигенот како целен анализат за конјугатот и имобилизирани антитела во тестот. По иницијалниот проток во една насока, се активира протокот во другата насока со цел за подобро врзување на комплексот антиген-антитело-конјугат за имобилизирани антитела. Потоа следува чекор на перење со цел за отстранување на неспецифичните молекули. На крајот супстратот реагира со ензимот од врзаниот конјугат со појава на специфични сини точки на подлогата за интерпретација на тестот.



Слика 13.5 Шема за брзи дијагностички тестови на база на ELISA-техника за детекција на антиген

Постапка



Слика 13.6 SNAP-технологија за детекција на антиген

Интерпретација

- Позитивен резултат: видливи се контролната точка и тест-точката
- Негативен резултат: видлива е само контролната точка
- Невалиден резултат: контролната точка не е видлива одн. тестот не функционира точно.

13.3.2 Брзи дијагностички тестови на база на ELISA-техника за детекција на антитела

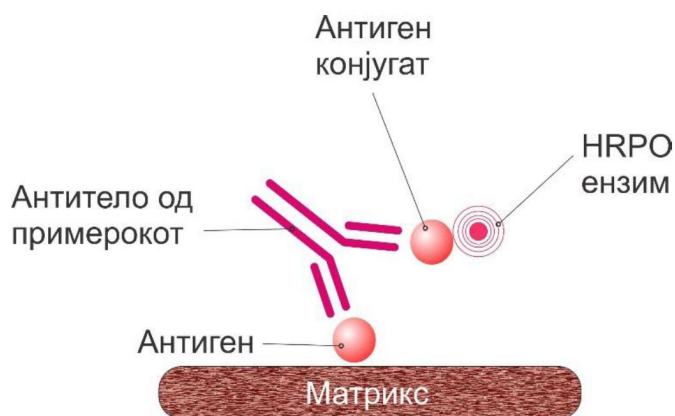
Овие тестови за детекција на антитела во ветеринарната медицина се користат за дијагностика на: антитела против *Leptospira spp.*, мачешки имунодефициентен вирус и др.

Учесници во реакцијата

- Антитела како целен анализат во примерокот
- Обележан антиген со ензим (конјугат)
- Имобилизирани антигени специфични за антигенот

Принцип

Принципот на тестот се базира на врзување на антителата како целен анализ за конјугатот и имобилизираните антигени во тестот. По иницијалниот проток во една насока, се активира протокот во другата насока со цел за подобро врзување на комплексот антитело-антиген-конјугат за имобилизираните антитела. Потоа следува чекор на перење со цел за отстранување на неспецифичните молекули. На крајот супстратот реагира со ензимот од врзаниот конјугат со појава на специфични сини точки на подлогата за интерпретација на тестот.



Слика 13.7 Шема за брзи дијагностички тестови на база на ELISA-техника за детекција на антитела

Постапка

Постапката е слична како за брзите дијагностички тестови на база на ELISA-техника за детекција на антиген со таа разлика што во случај на детекција на антитела, за матриксот се конјугирани специфични антигени (слика 13.6).

Интерпретација

- Позитивен резултат: видливи се контролната точка и тест-точката
- Негативен резултат: видлива е само контролната точка
- Невалиден резултат: контролната точка не е видлива одн. тестот не функционира точно.

Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) *Veterinary immunology*. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). *Veterinary immunology: principles and practice*. Second edition. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.

O'Connor, T. P. (2015). SNAP assay technology. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(4), 132-138.

Velayudhan, B. T., & Naikare, H. K. (2022). Point-of-care testing in companion and food animal disease diagnostics. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1056440.

14. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА

14.1 Краток осврт на основните карактеристики на проточната цитометрија

Проточната цитометрија е моќна технологија со која се овозможува брза анализа на повеќе параметри на индивидуални клетки или на честички во суспензија. Оваа техника наоѓа примена во имунологијата, хематологијата, онкологијата и во микробиологијата. Во ветеринарната медицина, оваа технологија наоѓа широка примена преку дијагностика на болести, мониторинг на имунолошки одговор и проценка на ефикасност на третман на одредени заболувања. Оваа метода има повеќе предности како:

1. Брзина – со оваа метода може да се анализираат илјадници клетки во секунда
2. Мултипараметарска анализа – со проточната цитометрија може симултано да се мерат различни карактеристики на клетките со што се добива целосна слика за клеточната популација.
3. Сензитивност - со оваа метода може да се детектира мал број на клетки и молекули
4. Сортирање на клетки – проточната цитометрија овозможува физичка сепарација на клетките врз основа на нивните специфични карактеристики и можност за понатамошна анализа.

Се разбира, оваа метода има и недостатоци како: висока цена, комплексност во изведување на методите, специфична и долготрајна подготовка на примерокот и сл.

14.2 Проточен цитометар и принципи на проточната цитометрија

Во суштина, проточниот цитометар функционира со насочување на проток од клетки или честички низ фокусиран ласерски зрак. Како што секоја клетка поминува низ ласерот, таа ја распрснува светлината во различни насоки и исто така може да емитува флуоресценција ако е обележана со флуоресцентни сонди или со антитела. Распрсканите и флуоресцентните светлосни сигнали потоа се собираат од страна на детектори, се претвораат во електронски сигнали и се анализираат со софистициран софтвер.

Учесници во реакцијата

- Клетки
- Антитела
- Флуоресцентни бои

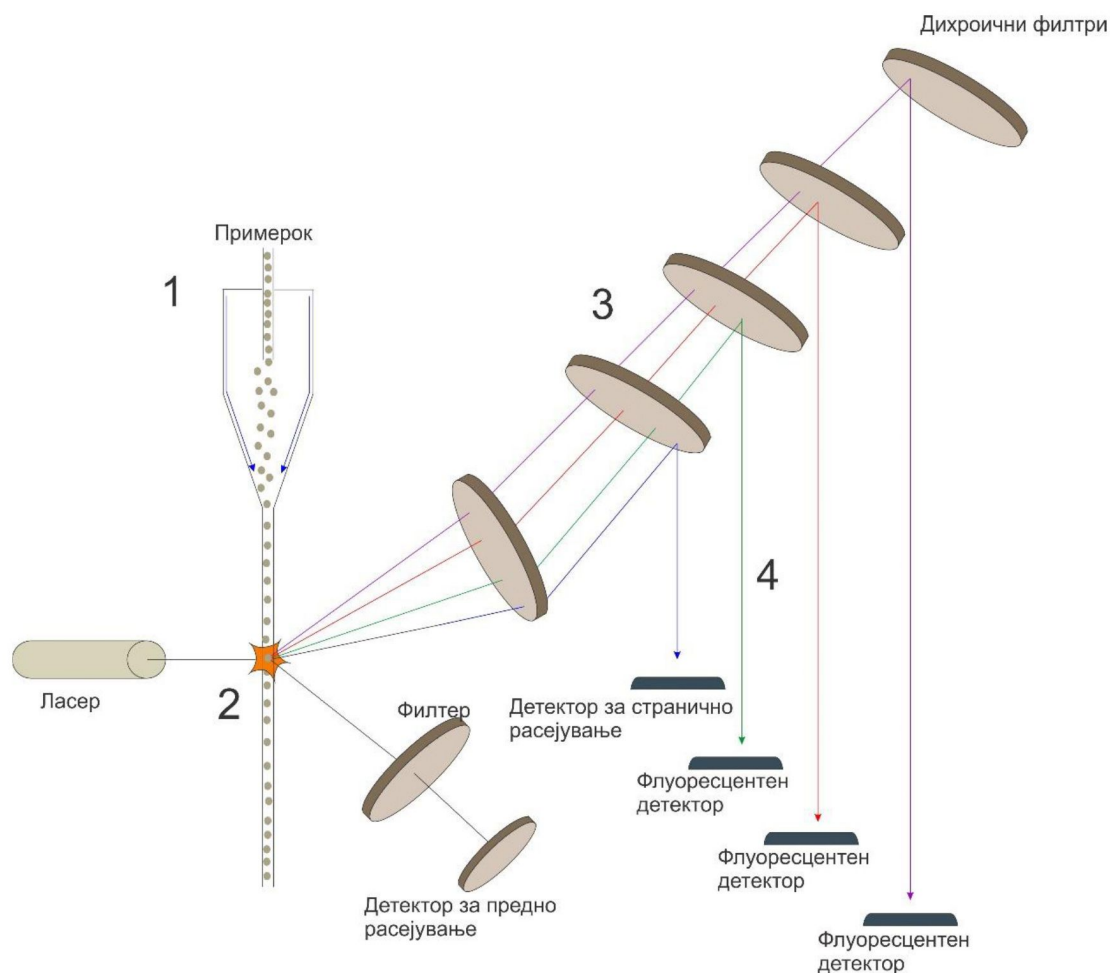
Принцип

Процесот започнува со подготовка на примерокот, каде што клетките или честичките се суспендираат во течност и се бојат со флуоресцентни бои или со антитела кои се врзуваат за специфични молекули од интерес. Обоениот примерок потоа се внесува во проточниот цитометар, каде што е хидродинамички фокусиран во единичен проток, обезбедувајќи секоја клетка поединечно да помине низ ласерскиот зрак.

Додека секоја клетка минува низ ласерскиот зрак, таа ја распрскува светлината во различни насоки. Предното расејување (FSC) е светлината расфрлана во насока напред, кое е во корелација со големината на клетката. Поголемите клетки расфрлаат повеќе светлина во насока напред отколку помалите клетки. Бочното расејување (SSC) е светлината расфрлана под агол од 90 степени во однос на ласерскиот зрак, кое е под влијание на внатрешната комплексност или грануларност на клетката. Клетките со посложена внатрешна структура, како што се оние кои содржат гранули или органели, расфрлаат повеќе светлина под агол од 90 степени отколку клетките со поедноставна внатрешна структура.

Покрај расејувањето на светлината, проточната цитометрија може исто така да ја детектира флуоресценцијата емитувана од клетките обележани со флуоресцентни бои или антитела. Овие флуорофори ја апсорбираат светлината на специфична бранова должина и емитуваат светлина на подолга бранова должина. Со користење на флуорофори кои емитуваат светлина на различни бранови должини, проточната цитометрија може истовремено да детектира повеќе клеточни маркери, обезбедувајќи мултипараметарска анализа на секоја клетка.

Распрсканите и флуоресцентните светлосни сигнали се собираат од детектори, кои го претвораат интензитетот на светлината во електронски сигнали. Овие сигнали потоа се обработуваат од софтверот на проточниот цитометар, кој генерира хистограми или графикони со точки кои ја претставуваат распределбата на клетките врз основа на нивните својства на расејување на светлината и флуоресценцијата. Овие податоци можат да се користат за да се идентификуваат и квантифицираат различни клеточни популации, да се процени нивната функционална состојба, па дури и да се сортираат врз основа на специфични карактеристики.



Слика 14.1 Проточна цитометрија

14.5 Употреба на проточна цитометрија во ветеринарната медицина

14.5.1 Имунофенотипизација

Имунофенотипизацијата, идентификацијата и класификацијата на леукоцитите врз основа на нивните површински или интраклеточни маркери е темел на проточната цитометрија во ветеринарната медицина. Оваа техника е особено вредна за дијагностицирање и класифицирање на лимфоидни малигнитети, како што се лимфомот и леукемијата, кај кучиња, мачки, коњи и др. Со анализа на експресијата на специфични маркери, како што се CD3, CD4, CD8, CD21 и МНС класа II, може да се одреди лозата (Б-клетки наспроти Т-клетки) и поттипот на лимфомот, што има значајни импликации за прогнозата и за начинот на терапија.

Имунофенотипизацијата со проточна цитометрија, исто така, е корисна во дијагностицирањето и следењето на имуно-посредувани болести, како што се имуно-посредувана хемолитична анемија и имуно-посредувана тромбоцитопенија кај кучиња и мачки. Со проценка на експресијата на различни маркери на еритроцитите и тромбоцитите, може да се идентификува присуството на автоантитела и да се процени ефективноста на имуносупресивната терапија.

14.5.2 Дијагноза на заразни болести

Проточната цитометрија може да се користи за директна или за индиректна детекција и квантификација на патогени преку мерење на имунолошкиот одговор на домаќинот. На пример, во контекст на инфекција со porcine circovirus тип 2 (PCV2), проточната цитометрија е користена за следење на промените во популациите на леукоцити во периферната крв, откривајќи лимфопенија поврзана со развојот на синдромот на губење на телесна тежина по одбивањето од цицање (PMWS). Слично, при инфекција со вирусот на класичната свинска чума (CSFV), проточната цитометрија е користена за идентификување на целните клетки за вирусната инфекција и за проценка на влијанието на вирусот врз фенотипот и функцијата на Т-лимфоцитите.

Во контекст на заразни болести, проточната цитометрија може да се користи за следење на прогресијата на болеста и одговорот на третманот. На пример, кај инфекцијата со вирусот на мачкина имунодефициенција (FIV), проточната цитометрија е користена за следење на промените во бројот на CD4+ Т-клетки, кои се клучен индикатор за прогресијата на болеста. Со следење на бројот на CD4+ Т-клетки со текот на времето, може да се процени ефективностa на антивирусната терапија и да се донесе одлука за прилагодување на третманот.

14.5.3 Следење на имунолошкиот одговор

Проточната цитометрија е вредна алатка за следење на имунолошкиот одговор кај животните, обезбедувајќи увид во ефикасноста на вакцините и во прогресијата на болестите. Со анализа на експресијата на маркери за активација, производство на цитокини и пролиферација на имуните клетки, истражувачите можат да го проценат одговорот на имунолошкиот систем на вакцинацијата или на инфекцијата. Овие информации се клучни за развојот и за оптимизацијата на вакцините, како и за следење на ефективностa на терапевтските интервенции.

Во развојот на вакцини против вирусот на говедска вирусна дијареја (BVDV), проточната цитометрија е користена за проценка на индукцијата на BVDV-специфични Т-клеточни одговори кај вакцинирани животни. Со мерење на експресијата на маркери за активација, како што се CD25 и CD69, и производството на цитокини, како што е интерферон-гама, може да се процени квалитетот на клеточниот одговор, обезбедувајќи вредни информации за оптимизација на вакцината.

14.5.4 Други значајни области на употреба

Покрај за горенаведените области на употреба, проточната цитометрија се користи и за: прочистување на матични клетки и на други клетки за трансплантација, изолирање на одредена популација на клетки за различни апликации, мерење на мембранскиот потенцијал на клетките, мерење на цитокини, проценка на фагоцитозната способност на клетките, проценка на оксидативниот стрес и др.

Библиографија

Tizard, Ian R. (2018) *Veterinary immunology*. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Sánchez-Torres, L. E., Espinosa-Bonilla, A., & Diosdado-Vargas, F. (2022). Flow cytometry, a universe of possibilities in the veterinary field. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13(3), 763-786.

Nielsen, J., Vincent, I. E., Bøtner, A., Ladekjær-Mikkelsen, A. S., Allan, G., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2003). Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary immunology and immunopathology*, 92(3-4), 97-111.

15. ДИЈАГНОСТИЧКА АПЛИКАЦИЈА НА ИМУНОЛОШКИТЕ ТЕСТОВИ

Имунолошките тестови се основни алатки во ветеринарната медицина, во смисла на дијагностика, надзор, контрола и искоренување на заразните болести кај животните. Како што во претходните поглавја е детално објаснето, овие тестови ја користат интеракцијата помеѓу антигените и антителата одн. сензибилизираните Т-лимфоцити со цел за проценка на здравствениот статус како на индивидуално ниво така и на ниво на стадо, јато одн. популација. На овој начин, со правилна селекција на тестот за дијагностика, соодветно изведување и професионална интерпретација на резултатите, имунолошките тестови и нивната адекватна употреба имаат голема улога во дијагнозата, превенцијата и контролата на заразните и на паразитните болести, со што на крајот се заштитува здравјето на животните и јавното здравје.

15.1 Употреба на имунолошките тестови во различни контексти

15.1.1. Потврда за слобода од болест

Серолошките тестови се неопходни за потврда дека индивидуалните животни или стада се слободни од одредени болести. Оваа потврда е предуслов за меѓународна трговија со животни и со производи од животинско потекло, бидејќи им дава сигурност на земјите увознички дека животните се ослободени од наведените болести. Со серолошките тестови се врши детекција на антитела специфични за одреден патоген, при што позитивниот резултат одн. детектираните антитела укажуваат на изложеност на патогенот или на вакцинација. Негативниот серолошки резултат одн. отсуство на антитела укажува дека животното не е инфицирано или не е вакцинирано. Изборот на заболувања за кои се врши испитувањето зависи од статусот во однос на болестите на одредена земја. Пример за овој тип на серолошки мониторинг би бил серолошко тестирање на овци и кози како доказ за земја слободна од чума кај мали преживари, серолошко тестирање на говеда, овци, кози и свињи како доказ за земја слободна од лигавка и шап и др.

15.1.2. DIVA-стратегија (Диференцирање на заразени од вакцинирани животни)

Стратегиите за диференцирање на заразени од вакцинирани животни се користат во состојби кога вакцинацијата се користи како алатка за контрола, но е важно да се направи разлика помеѓу животните кои се природно заразени и оние кои се вакцинирани против неа. Овој пристап е особено корисен во контролата на болести каде што вакцинацијата е широко распространета, но каде и откривањето на заразени животни останува важно за надзорот и за искоренувањето на болеста, бидејќи на овој начин се овозможува идентификација на инфицирани животни дури и во вакцинирана популација. Со DIVA-тестовите се овозможува детекција на антитела кон специфични антигени кои се присутни кај патогенот од „див тип/сој“ но отсутни во вакциналниот сој. Типичен пример за овој пристап е DIVA-стратегијата кај заболувањето лигавка и шап каде се користи ELISA-тест со кој се детектираат антитела против неструктурните протеини (NSPs). Овие неструктурни протеини се отсутни кај вакцинираните животни, со што се овозможува детекција на инфицирани животни во вакцинираната популација.

15.1.3 Програми за ерадикација

Програмите за искоренување на заразните заболувања имаат за цел да елиминираат одредени болести од дефинирани географски области или од популации на животни преку координирани и континуирани активности. Имунолошките тестови играат клучна улога во овие програми со потврдување на отсуството на целната болест во дефинираната област или популација. Успехот на програмите за искоренување често зависи од типот, континуитетот, времетраењето на спроведените мерки и може да вклучува ригорозно тестирање, вакцинација, контрола на движењето на животните, биосигурносни мерки, строги протоколи за карантин итн. Употребата на серолошките тестови во ерадикациските програми има големо значење бидејќи со истите се овозможува идентификација на инфицираните животни, мониторинг на ерадикациските програми и потврда на отсуството на инфекција во претходно инфицирани региони. Типичен пример за употреба на серолошките тестови во ерадикациските програми претставува употребата на тестот за брза аглутинација (Rose Bengal тест) и реакција на врзување на комплементот (РВК) за детекција на инфицирани говеда, овци и кози со *Brucella* spp. Животните кои се детектирани како позитивни се отстрануваат од стадото и нештетно се отстрануваат со цел да се спречи понатамошно ширење на болеста.

Покрај серолошките тестови со кои се детектира хуморалниот имунолошки одговор на домаќинот, во ерадикациските програми може да се користат и тестови за детекција на клеточниот имунолошки одговор. Така на пример, интрадермалниот туберкулински тест е стандарден тест за детекција на туберкулоза кај повеќе животински видови. Оние животни кои на овој тест ќе добијат позитивна реакција исто така нештетно се отстрануваат со цел да се спречи ширењето на болеста. Овој тест во некои земји се користи самостојно како единствен тест, но покрај овој, а во зависност од епидемиолошката состојба во земјата/регионот може дополнително како паралелен тест или во вид на сериско тестирање да се користи и тестот за детекција на гама-интерферон. При паралелното тестирање се користат и двата теста со цел да се зголеми можноста за детекција на инфицираните животни додека при сериското тестирање се потврдуваат резултатите од интрадермалниот туберкулински тест. Иако методите за детекција на клеточниот имунитет се основни во дијагностика на туберкулозата, и тестовите за детекција на хуморалниот имунитет (ELISA) може да се користат како дополнителни тестови. Иако сензитивноста на ELISA-методот за детекција на антитела е пониска од онаа на тестовите за детекција на клеточниот имунитет, особено кај скоро инфицирани животни, истите може да бидат од помош доколку се користат кај анергични животни (кои не реагираат на тестовите за детекција на клеточниот имунитет) како и кај животни во поодминат стадиум на болеста.

15.1.4 Следење на имунолошкиот одговор по вакцинација

По кампањите за вакцинација, серолошките тестови се користат за да се процени ефективностa на вакцината со мерење на одговорот на антителата кај вакцинираните животни. Оваа информација е клучна за да се утврди дали вакцината предизвикува заштитен имунолошки одговор, да се процени времетраењето на имунитетот и да се идентификуваат потенцијалните празнини во покриеноста на вакцината. Следењето по вакцинацијата, исто така, помага да се процени влијанието на различните стратегии за вакцинација, како што се употребата на различни видови вакцини, начини на администрација, времетраење и повторливост на вакциналните кампањи и сл. Со следење на нивоата на антитела кај

вакцинираните животни со текот на времето, протоколите за вакцинација може да се оптимизираат со цел да обезбедат долгорочен успех во контрола на болестите.

Типичен пример за овој начин на употреба на серолошките тестови е заболувањето беснило. Имено, вакцинацијата против беснило е задолжителна за кучињата и за мачките со цел да бидат заштитени од ова заболување. Тестот кој се користи за детекција и квантификација на имунолошкиот одговор по вакцинација кај кучињата и мачките е претходно обработен во вежба 11. Неутрализациски тестови. Со употреба на овој серолошки тест се овозможува квалитативна и квантитативна детекција на неутрализирачки антитела во серумот на животното. Она животно во чиј серум, со овој тест е утврдена концентрација на антитела од 0,5 IU/ml се смета дека поседува доволно антитела одн. има заштитен титар против болеста беснило.

15.2 Избор на соодветен тест

Изборот на соодветен тест за дијагностика на одредено заболување зависи од различни фактори, вклучувајќи ја природата на заболувањето, целта на тестирањето одн. дали треба да се докаже присуство на антиген или да се докаже имунолошки одговор, целните животински видови и достапните ресурси.

Светската организација за здравје на животните (WOAH) има објавено сеопфатни прирачници и упатства кои даваат детални информации за препорачаните дијагностички тестови за разни болести на животните. Овие упатства ја наведуваат целта, методологијата, толкувањето на резултатите како и мерките за контрола на квалитетот за секој тест. Подолу во текстот се прикажани неколку примери за користење на дијагностичките тестови, вклучително и имунолошките одн. серолошките тестови во дијагностика на заразни и на паразитни болести кај животните.

Табела 1. Достапни тестови и методи за дијагностика на класична чума кај свињите и цел на испитувањето (преземено од WOAH Chapter 3.9.2 CLASSICAL SWINE FEVER (INFECTION WITH CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS))

ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО						
Метод	Слобода од инфекција на популацијата животни	Слобода од инфекција на индивидуално животно пред движење	Придонес во ерадикација	Потврда на клинички случаи	Преваленца на инфекција - надзор	Имунолошки статус кај индивидуални животни или популација по вакцинација
ДЕТЕКЦИЈА НА ПРИЧИНИТЕЛ ^а						
Изолација на вирус	-	+	-	+++	-	-
RT-PCR	+	+++	++	+++	++	-
ELISA (антиген)	++	++	+	+	+	-
FAT	-	-	+	+	-	-
ДЕТЕКЦИЈА НА ИМУНОЛОШКИ ОДГОВОР						
ELISA (антитело)	+++	+++	+++	-	+++	+++
Вирус-неутрилизациски тест (FAVN, NPLA)	+	+++	++	++	+++	+++

Легенда: +++ препорачано за таа намена, ++ препорачано - но со недостатоци, + соодветно во одредени состојби, - несоодветно за таа намена.

RT-PCR – Полимераза ветришна реакција со реверзна транскрипција

ELISA – Имуноензимски тест, FAT – Директна имуофлуоресценција, FAVN – Флуоресцентен вирус-неутрилизациски тест, NPLA – Пероксидаза неутрилизациски тест

^аПрепорачано е да се користи комбинација на методи за детекција на причинител

Табела 2. Достапни тестови и методи за дијагностика на болест на чвореста кожа и цел на испитувањето (преземено од WHO Chapter 3.4.12 LUMPY SKIN DISEASE)

ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО						
Метод	Слобода од инфекција на популацијата животни	Слобода од инфекција на индивидуално животно пред движење	Придонес во ерадикација	Потврда на клинички случаи	Преваленца на инфекција - надзор	Имунолошки статус кај индивидуални животни или популација по вакцинација
ДЕТЕКЦИЈА НА ПРИЧИНТЕЛ						
Изолација на вирус	+	++	+	+++	+	-
PCR	++	+++	++	+++	+	-
TEM	-	-	-	+	-	-
ДЕТЕКЦИЈА НА ИМУНОЛОШКИ ОДГОВОР						
Вирус-неутрализациски тест	++	++	++	++	++	++
Индиректна имунофлуоресценција	+	+	+	+	+	+
ELISA	++	++	++	++	++	++

Легенда: +++ препорачано за таа намена, ++ препорачано - но со недостатоци, + соодветно во одредени состојби, - несоодветно за таа намена.

PCR – Полимераза верижна реакција, TEM – Трансмисивна електронска микроскопија, ELISA – Имуноензимски тест

Табела 3. Достапни тестови и методи за дијагностика на лајшманиоза и цел на испитувањето (преземено од WOAH Chapter 3.1.11. LEISHMANIOSIS)

ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО						
Метод	Слобода од инфекција на популацијата животни	Слобода од инфекција на индивидуално животно пред движење	Придонес во ерадикација	Потврда на клинички случаи	Преваленца на инфекција - надзор	Имунолошки статус кај индивидуални животни или популација по вакцинација
ДЕТЕКЦИЈА НА ПРИЧИНИТЕЛ ^а						
Цитологија	-	-	-	++	-	-
Хистологија	-	-		++	-	
Изолација	-	+		++	-	
Молекуларни методи	++	+++		++	++	
ДЕТЕКЦИЈА НА ИМУНОЛОШКИ ОДГОВОР						
Индиректна имунофлуоресценција	+++	++	-	++	+++	-
ELISA	+++	++		++	+++	
Директна аглутинација	++	++		++	++	
Брз имунохроматографски тест	-	-		++	+	

Легенда: +++ препорачано за таа намена, ++ препорачано - но со недостатоци, + соодветно во одредени состојби, - несоодветно за таа намена.

RT-PCR – Полимераза ветришна реакција со реверзна транскрипција
ELISA – Имуноензимски тест

^аПрепорачано е да се користи комбинација на методи за детекција на причинител

Библиографија

- Tizard, Ian R. (2018) Veterinary immunology. Tenth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- WOAH Terrestrial Manual 2022. Mammalian tuberculosis (Infection with Mycobacterium tuberculosis complex). Chapter 3.1.13.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.13_MAMMALIAN%20TB.pdf
- WOAH Terrestrial Manual 2022 Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Chapter 3.1.4.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
- WOAH Terrestrial Manual 2021 Leishmaniosis. Chapter 3.1.11.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf
- WOAH Terrestrial Manual 2022 Classical swine fever (Infection with classical swine fever virus). Chapter 3.9.2. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.02_CSF.pdf
- WOAH Terrestrial Manual 2024 Lumpy skin disease. Chapter 3.4.12.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf

АВТОРИ НА ВЕЖБИТЕ

- **проф. д-р Искра Цветковиќ:** Неутрализациски тестови, Тестови за детекција на клеточен имунолошки одговор, Имунохроматографски тестови, Проточна цитометрија, Дијагностичка апликација на имунолошките тестови.
- **ас. Ивана Шикоска:** Имунофлуоресцентни тестови, Имуноензимски тестови, Титрација на антитела.
- **проф. д-р Славчо Мреношки:** Вовед во серолошките реакции, Моноклонски антитела, Радиоимунолошки проби, Преципитација, Аглутинација, Вирусна хемаглутинација и нејзина инхибиција, Реакција на врзување на комплементот