

УДК: 619:576.858:616-07:616.15

МЕТОД ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ У ПРАКТИЦІ

Терещенко О. В., Рябінін С. В.
Інститут птахівництва УААН

Резюме. На сьогоднішній день розроблено велику кількість різноманітних варіантів проведення ІФА, які мають як принципіальні, так і другорядні відмінності. Більшість методів, які дозволяють швидко і точно контролювати рівень антитіл в сироватках крові до антигенів різної природи, а також визначати присутність вірусу в біологічних матеріалах, засновано на імуноферментному аналізі (ІФА), перевагами якого є висока чутливість, специфічність, можливість проведення масштабних досліджень навіть в польових умовах і можливість автоматизації практично всіх стадій виконання реакції, враховуючи реєстрацію і обробку отриманих результатів.

Ключові слова: ІФА, антиген, антитіла, інфекція.

Summary. It has been worked out a great number of different variants of conducting the immunoferment analyze (IFA), which have differences of principle as well as less important ones. The most methods which allow to control the level of antibodies in blood serum to antigens of different nature quickly and accurately and also to determine the presence of the virus in biological materials are based on IFA. The advantages of such methods are high sensitivity, specificity, possibility of carrying out investigations on a large scale in field conditions and possibility of automatization of all stages of reaction performance, taking into account registration and processing of obtained results.

Key words: IFA, antigen, antibodies, infection.

Вступ. Епізоотичне благополуччя щодо інфекційних захворювань птиці в більшості випадків визначається своєчасною діагностикою та специфічною профілактикою. У зв'язку з розвитком промислового птахівництва, виникненням нових інфекційних захворювань птиці, проти яких проводять профілактичні щеплення, потрібна розробка чутливих, високоспецифічних автоматизованих методів виявлення збудників захворювань та оцінки імунного статусу птиці. Так, на початку 1970-х років пошуки простих чутливих методів виявлення і кількісного визначення антигенів і антитіл без застосування аглютинації або радіоактивних міток привели до розробки твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (від англ. enzyme – linked immunosorbent assay), який на сьогоднішній день став одним із найрозповсюджених методів дослідження в області ветеринарії для виявлення збудників інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин, насамперед чуми ВРХ, свиней,

хвороби Ауескі, лейкозу ВРХ, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей і т.д. [1, 6].

Цей перспективний метод застосовується як альтернатива таким реакціям, як: реакція нейтралізації, реакція імунодифузії, реакція імунофлюоресценції, реакція непрямой гемаглютинації.

Популярність ІФА пояснюється безпечністю (використовується інактивованій вірус) і зручністю роботи (автоматизація етапів реакції, відсутність необхідності роботи з культурою клітин), а також широким розповсюдженням приладів – спектрофотометрів, за допомогою яких за декілька секунд можна виміряти поглинання світла в 96 лунках планшета із оптично прозорого полістиролу, що дозволяє значно збільшувати кількість аналізів і спростувати методичну процедуру постановки ІФА.

Імунохімічний аналіз не обмежується ІФА, який базується на прямій взаємодії антигену з антитілом. Є методи знаходження і кількісного визначення антигенів по зміні їх фізичного стану при взаємодії з антитілами. Так, якщо антиген розташований на поверхні клітин, антитіла викликають їх склеювання (аглютинацію). На такому принципі ґрунтується визначення груп крові: склеювання еритроцитів при взаємодії поверхневих антигенів з доданими антитілами (гемаглютинація). Антитіла, які додані у відповідному співвідношенні до розчину макромолекулярних антигенів, викликають їх преципітацію – утворення великих, що візуально виявляються, агрегатів із молекул антигену, зв'язаних антитілами [1, 6].

Антигеном можуть виступати клітини мікроорганізмів, віруси, білки та полісахариди. Це повноцінні антигени. Антитіла утворюються не проти всієї молекули білка або бактеріальної клітини, а тільки невеликої ділянки на їх поверхні – антигенної детермінанти (епітопу). Такі ділянки у білків складають не менше п'яти амінокислотних залишків. Антигенні детермінанти розгалужених молекул полісахаридів представлені ланцюгами із чотирьох – шести залишків. Висока чутливість та швидкість аналізу (від декількох хвилин до декількох годин), можливість одночасного тестування великої кількості зразків і відсутність особливої необхідності попередніх операцій по очистці та концентруванню речовини, яка аналізується, надають ІФА беззаперечну перевагу перед іншими аналітичними методами. Через це сьогодні ІФА знаходить широке застосування в медицині, різноманітних галузях сільського господарства, промислової біотехнології, природоохоронній діяльності та науково-дослідницькій праці. Чутливість ІФА досягається також завдяки використанню різноманітних фізичних методів реєстрації ферментативної активності: фотометричних, флюорометричних, а в останні роки біо- і хемілюмінесцентних. В ряді випадків успішно застосовуються електрохімічні і мікрокалориметричні датчики [9, 10].

Для того щоб отримати ІФА – діагностикум потрібен якісно очищений антиген. За останні роки в біотехнології розроблено і впроваджено у виробництво багато методів очистки вірусного матеріалу від баластних білків: хімічні, фізико-хімічні і фізичні методи [2, 5].

Для очистки вірусних суспензій застосовується фізичний метод фільтрації через мембранні фільтри. Найбільш оптимальна очистка вірусного матеріалу спостерігається при поетапному його проходженні через фільтри з різним діаметром пор, від великих до малих. На кожній фільтруючій мембрані осаджуються частинки відповідного діаметру, починаючи з самих великих і закінчуючи розмірами часточок, присутність яких допускається в антигені. Найбільш перспективними напрямком в очистці вірусних суспензій є спосіб хімічної очистки за допомогою розчинів: хлороформа, фреона-113 [1, 4].

На завершальних етапах очистки вірусу використовуються методи ультрацентрифугування в градієнтах концентрації сахарози та хлористого цезію, рідше використовують молекулярно-ситову хроматографію на жорстких сорбентах [8].

Будь-яке захворювання людини і тварин можливо швидко і точно діагностувати шляхом ідентифікації збудника, його окремих антигенних компонентів, антитіл до цих компонентів або речовин, які не притаманні здоровому організму і які синтезуються при його патологічних станах (онкогенні, серцево-судинні та ендокринні захворювання). Диспансеризація населення, епідеміологічні обстеження, виявлення отруєнь, наявність наркотичних засобів в крові, визначення вмісту лікарських речовин в тканинах, вірусні захворювання рослин, визначення антибіотиків, вітамінів і інших біологічно активних речовин при відборі активних штамів-продуцентів в промисловій біотехнології, контроль за якістю медичних препаратів із донорської крові на відсутність вірусів – збудників ВІЧ-інфекції та гепатиту В – це лише невеликий перелік практичного застосування ІФА. Сучасні фундаментальні дослідження в біохімії, клітинній фізіології та імунології, мікробіології, вірусології, онкології важко уявити без ІФА. Реагенти для проведення ІФА сьогодні стали комерційними продуктами і можуть бути придбані за каталогами відомих фірм [10].

Більшість методів, які дозволяють контролювати рівень антитіл до реовірусної інфекції в сироватках крові курей, а також визначати присутність вірусу в біологічних матеріалах, засновано на імуноферментному аналізі (ІФА), перевагами якого є висока чутливість, специфічність, можливість проведення масштабних досліджень навіть в польових умовах, оперативність проведення досліджень, невеликі об'єми проб і можливість автоматизації практично всіх стадій виконання реакції, враховуючи реєстрацію і обробку отриманих результатів. Для виявлення антитіл, визначення їх концентрації в сироватках крові найбільше розповсюдження отримав непрямий варіант ІФА.

В зарубіжній і вітчизняній літературі є повідомлення про зростаючу роль в діагностиці інфекційних захворювань, мікотоксикозів і еймеріозів тварин імуноферментного метода, який має високу чутливість і не має недоліків, які притаманні іншим методам [13, 14].

На основі непрямого варіанта ІФА за кордоном рядом фірм, таких як (IDEX Laboratories (USA), Bio Chek (Holland), KPL (Kirkegaard and Perry Laboratories (USA), Синко ВНИИЗЖ (Росія), випускаються діагностичні

набори для визначення антитіл до реовірусної інфекції в сироватках крові курей [3, 7, 10, 12].

В Україні подібних тест-систем не існує, а зарубіжні, при однаковій специфічності, відрізняються по чутливості, що, в першу чергу, залежить від штаму реовірусу, який використовується для сенсibilізації на планшет. Застосування вітчизняного діагностичного набору для виявлення антитіл до реовірусної інфекції дозволило б знизити собівартість досліджень і забезпечити широке впровадження його у ветеринарну практику [6, 11, 12].

Список літератури

1. Борисов В. В. Очистка и концентрирование инактивированного вируса ССЯ-76 / В. В. Борисов, Д. А. Лозовой // Биотехнология нового века: проблемы и перспективы: сб. тр. к науч.- практ. конф.- Киров, 2001.- С. 9-10.
2. Гринин А. С. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных. / А. С. Гринин, И. Н. Титов. – М.: Колос, 1971. - С. 42-148.
3. Ефременко В. И. Использование липосомальных антигенов для получения гипериммунных сывороток / В. И. Ефременко, Т. В. Таран //Сборник материалов научно-практической конференции. – Киров, 2001. - С. 24-25.
4. Изучение процессов фильтрации суспензии лапинизированного вируса ящура через мембранные фильтры «Владипор» /Л. Ф. Берлизова, В. Л. Узюмов, В. П. Дубяга, [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии.- Владимир, 1980. - С. 85-86.
5. Картрайт Т. Очистка продуктов культивирования клеток животных / Т. Картрайт, М. Дучесне // Биотехнология клеток животных Т.2. - М., 1989.- С. 191-203.
6. Луговская Н. Н. Разработка иммуноферментной тест – системы для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур / Н. Н. Луговская, Н. С. Мудрак, В. В. Дрыгин //Диагностика и молекулярная биология вирусов. – Владимир, 2003. - С. 140-145.
7. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом / А. А. Гусев, А. Н. Панин. - Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ, 1998. - С. 53-57.
8. Мейхи Б. Вирусология. Методы / Б. Мейхи.- М.: Мир, 1987. - С. 310-370.
9. Розенберг Д. Вирусный артрит / Д. Розенберг, Н. Олсон; под ред. Б. У. Кэлнека. –М., 2003. - С. 819-828.
10. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев [и др.]. – М.: Высшая школа, 1991. - С. 77-83
11. Трефилов Б. Б. Антигенная специфичность и степень нейтрализации штаммов вируса теносиновита кур / Б. Б. Трефилов, Н. В. Сарбаева // Вирусные болезни с-х животных: тез. докл. Всерос. науч.- практ. конф.- Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ, 1995. - С. 272.
12. Трефилов Б. Б. Реовирусная инфекция птиц / Б. Б. Трефилов, Н. В. Никитина.- С.-Петербург, 1996.

13. Hung J. L. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens / J. L. Hung, C. K. Liam, H. L. Ming // Journal of Virological Methods. - 2002. - P. 129-138.
14. Lou G. Development and application of indirect ELISA for the antibody avian viral arthritis vims / G. Lou, H. Xuan // Bull of Vet. College PLA (China).- 1992. - V. 12. - P. 262-266.