РАЗРАБОТКА И АДАПТАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Лисова А.Н.

Руководитель

д.б.н. Самойлова Т.И.

Целью работы явилась адаптация и разработка диагностического препарата – тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) и G (IgG) к вирусу клещевого энцефалита методом иммуноферментного анализа.

Задачи:

- подобрать оптимальный антиген, пригодный для использования в тест-системе;
- приготовить культуральные и мозговые антигены вируса клещевого энцефалита с использованием местных штаммов;
- приготовить иммунную асцитическую жидкость к вирусу клещевого энцефалита с использованием местных штаммов и нормальную асцитическую жидкость;
- проверить возможность использования приготовленных сывороток в качестве положительного и отрицательного контролей;
- разработать схемы технологического процесса и провести пробный иммуноферментный анализ с использованием полученных материалов

Таблица 1

Приготовленные антигены

Антиген	A	B	C	D	E	F
Пассаж	V	VI	VII	VI	VII	VIII
Объект для накопления	белые мыши	белые мыши	белые мыши	культура клеток	культура клеток	культура клеток

Таблица 2

Активность мозгового антигена **А** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Степень задержки гемолиза	+++ +	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++

Таблица 3

Активность мозгового антигена **В** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Степень задержки гемолиза	+++ +	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++

Таблица 4

Активность мозгового антигена **С** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Степень задержки гемолиза	+++ +	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++

Таблица 5

Активность культурального антигена **D** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	40% клеток	40% клеток	30% клеток	10% клеток	10% клеток

Таблица 6

Активность культурального антигена **E** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	30% клеток	30% клеток

Таблица 7

Активность культурального антигена **F** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	20% клеток	20% клеток

Таблица 8

Проверка полноты инактивации опытных антигенов (I пассаж)

Антигены	A	B	C	D	E	F
Кол-во здоровых мышей через 10 дней после инъекции	4	4	4	4	4	4
Общее количество мышей через 10 дней после инъекции	4	4	4	4	4	3

Таблица 9

Проверка полноты инактивации опытных антигенов (II пассаж)

Антигены	A	B	C	D	E	F
Кол-во здоровых мышей через 10 дней после инъекции	4	4	4	4	4	4
Общее количество мышей через 10 дней после инъекции	4	4	4	4	4	4

Таблица 5

Активность культурального антигена **D** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	40% клеток	40% клеток	30% клеток	10% клеток	10% клеток

Таблица 6

Активность культурального антигена **E** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	30% клеток	30% клеток

Таблица 7

Активность культурального антигена **F** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	20% клеток	20% клеток

Таблица 5

Активность культурального антигена **D** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	40% клеток	40% клеток	30% клеток	10% клеток	10% клеток

Таблица 6

Активность культурального антигена **E** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	30% клеток	30% клеток

Таблица 7

Активность культурального антигена **F** в РСК

Разведение антигена	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Степень задержки гемолиза	50% клеток	40% клеток	30% клеток	20% клеток	20% клеток

Характеристики полученных антигенов по выбранным критериям

Таблица 10

Критерии	Антигены					
	мозговые			культуральные		
	A	B	C	D	E	F
Активность*	1:32	1:64	1:128	10% клеток	30% клеток	20% клеток
Полнота инактивации	+	+	+	+	+	+
Трудоемкость	требуют примерно одинаковой трудоемкость					
Стоимость	более ресурсозатратно			менее ресурсозатратно		

* - активность для мозговых антигенов выражена в полной степени гемолиза при наибольшем разведении, для культуральных максимальный процент светящихся клеток в разведении 1:32.

Таблица 11

Уровень накопления антител в полученной ИАЖ

Разведение	Цельная сыворотка	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Степень задержки гемолиза	++++	++++	++++	++++	++++	+++

Таблица 12

Варианты постановки ИФА

№ опыта	антиген	сыворотка	конъюгат
1	культуральный	ИАЖ	«антимышь»*
2	культуральный	ИАЖ	«античеловек»**
3	мозговой	ИАЖ	«антимышь»
4	мозговой	ИАЖ	«античеловек»
5	культуральный	Сыворотка***	«античеловек»
6	мозговой	Сыворотка	«античеловек»
7	культуральный	Нормальная АЖ	«античеловек»
8	мозговой	Нормальная АЖ	«античеловек»

* антитела против IgM и IgG белой мыши, меченные пероксидазой

** антитела против IgG, меченные пероксидазой

*** сыворотка крови человека с диагнозом клещевой энцефалит

Таблица 13

Оптическая плотность исследуемых образцов, при различных вариантах постановки ИФА

№ опыта	1	2	3	4	5	6	7	8	K^-
ОП (о.е.)	0,90	0,85	0,75	0,60	0,82	0,70	0,30	0,34	0,18

- Соотношение оптических плотностей положительного и отрицательных контролей допустимое, т.е. результаты, полученные при постановке ИФА считали достоверными.

- В разрабатываемой тест-ситеме предпочтительно использовать культуральный антиген **Е**.

- В качестве положительного контроля можно использовать полученную ИАЖ в сочетании с конъюгатом «античеловек».

- В качестве отрицательного контроля в разрабатываемой тест-системе целесообразно использовать сыворотку крови здорового человека.

Таблица 14

Оптическая плотность исследуемых сывороток крови

№ сыворотки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$К^+$	$К^-$
ОП (о.е.)	1,20	0,90	0,85	0,90	0,90	0,95	0,85	0,75	0,80	0,85	0,90	0,19

Таблица 15

Коэффициенты позитивности (КП) исследуемых сывороток крови

№ сыворотки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$К^+$
КП	3,1	2,3	2,18	2,3	2,3	2,4	2,18	1,9	2,05	2,18	2,3

1. Иммунизация лабораторных животных

2. Введение адъюванта Фрейнда

3. Инактивация ИАЖ

4. Проверка ИАЖ

Получение иммунной асцитической жидкости (ИАЖ)

Рис. 1. Технологическая схема производства ИАЖ

Инфицирование культуры клеток

Определение инфекционной активности вируса КЭ

Обеззараживание вируссодержащего материала

Инактивация антигена вируса КЭ

Очистка антигена вируса КЭ

Концентрирование антигена вируса КЭ

Проверка активности антигена вируса КЭ

Получение антигена вируса КЭ

Рис. 2. Технологическая схема производства антигена вируса КЭ

ВЫВОДЫ

- Проведенные исследования позволили приготовить и отобрать антиген для использования в разработанной иммуноферментной тест-системе. Наиболее пригодным является антиген, полученный на культуре клеток.

- Показали возможность использования полученной иммунной асцитической жидкости в сочетании с конъюгатом «античеловек» в качестве положительного контроля в тест-системе.

- Разработали (определили технологические схемы производства компонентов препарата), адаптировали и оптимизировали иммуноферментную тест-систему для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита.

Спасибо за внимание