

# 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 M (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**

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

**Таблица 3**  
**Активность мозгового антигена В в РСК**

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

**Таблица 4**  
**Активность мозгового антигена С в РСК**

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



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



## 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		
	А	В	С	Д	Е	Ф
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	++++	++++	++++	++++	++++	+++



## 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**

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



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

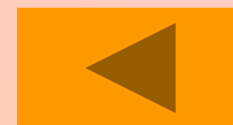
№ СЫВОРОТК И	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	К <sup>+</sup>	К <sup>-</sup>
ОП (о.е.)	1,20	0,90	0,85	0,90	0,90	0,95	0,85	0,75	0,80	0,85	0,90	0,19

Таблица 15

**Коэффициенты позитивности (КП) исследуемых сывороток  
крови**

№ СЫВОРОТ КИ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	К <sup>+</sup>
КП	3,1	2,3	2,1 8	2,3	2,3	2,4	2,1 8	1,9	2,0 5	2,18	2,3





**Рис. 1. Технологическая схема производства ИАЖ**





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

