

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 **A** 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 **B** 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 **C** 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



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

№ опыта	1	2	3	4	5	6	7	8	К-
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-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 ⁺	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**

№ СЫВОРОТ КИ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	К ⁺
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

