

«РАЗРАБОТКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ELISA) ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЁЗА И ДРУГИХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ»

Саидов А.А. - докторант,

Абдалимов С.А. - заведующий контрольной лабораторией

Рузимуродов М.А. - научный руководитель, зам. директора

Научно-исследовательский институт ветеринарии, Самарканд, Узбекистан

E-mail: viti@mail.ru

Аннотация: В представленной статье приводятся данные по интерпретации норм и параметров характеризующие исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота при использовании отечественных реагентов для иммуноферментного анализа (ELISA) предназначенных для диагностики бруцеллёза.

Ключевые слова. Бруцеллёз, иммуноферментный анализ, диагноз, пероксидаза хоена, стоп-реагент, антитела, антиген, лиганда.

“DEVELOPMENT OF REAGENTS FOR ENZYME IMMUNE ANALYSIS (ELISA) USED IN THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS AND OTHER INFECTIOUS DISEASES”

Abstract: The presented article provides data on the interpretation of norms and parameters characterizing the studied blood serum of cattle using domestic reagents for enzyme immunoassay (ELISA) intended for the diagnosis of brucellosis.

Keywords. Brucellosis, enzyme immunoassay, diagnosis, choene peroxidase, stop reagent, antibodies, antigen, ligand.

“BRUSELLOZ VA BOSHQA INFEKTSION KASALLIKLAR DIAGNOZIDA FOYDALANILGAN FERMENTIMMUN TAHLIL (ELISA) UCHUN REAGENTLARNI ISHLAB CHIQISH”.

Annotatsiya: Taqdim etilgan maqolada brutsellyoz diagnostikasi uchun mo'ljallangan immunoassay fermenti (ELISA) uchun mahalliy reagentlar yordamida qoramollarning o'rganilayotgan qon zardobini tavsiflovchi me'yor va parametrlarni talqin qilish bo'yicha ma'lumotlar keltirilgan.

Калит сузлар. Brutsellyoz, ferment immunoassay, diagnostika, hoen peroksidaza, to'xtash reaktivi, antitelalar, antigen, ligand.

Введение. Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных и птиц являются основной проблемой развития животноводческой отрасли Узбекистана. Проблемными остаются также вопросы, связанные с безопасностью пищевой продукции.

Известно, что для успешного лечения и своевременной профилактики инфекционных заболеваний животных необходим ранний и точный диагноз.

Этого можно достичь при использовании диагностических тест-систем с высокой специфичностью и чувствительностью. Одной из актуальных задач, стоящих перед учеными и биотехнологами нашей страны, является не только совершенствование традиционных РА, РСК, РДП, РНГА, РГА, но и разработка новых современных диагностических тест-систем, таких как полимеразно цепная реакция (ПЦР), ДНК-гибридизация, иммуноферментный анализ (ИФА) и другие, также, большие надежды возлагаются на таргетную терапию когда моноклональные антитела, целенаправленно действуют на клетки бактерии. [1, 2, 3, 4].

В Узбекистане в настоящее время ИФА применяют для диагностики, мониторинга заболеваний, своевременного и обоснованного прогнозирования возникновения эпизоотии среди животных. Методы ИФА решением МЭБ признаны в качестве референс-теста и определяются природой взаимодействия антиген+антитело. Поэтому, при работе с каждой новой инфекцией необходимо изучение параметров проведения иммуноферментного анализа, с использованием различных реагентов оптимальных для данного микроорганизма (антигена или антитела). Одним из основных условий в ИФА является также степень очистки компонентов, т.е. природа «лиганда» и чувствительность приборов, регистрирующих результаты анализа.

Учитывая важность и необходимость проведения научных исследований по разработке тест наборов и реагентов для ИФА, НИИ ветеринарии в рамках государственного частного партнёрства организовано совместное с Российскими коллегами производственное предприятие СП ООО «UNIGEN». Производство ИФА наборов основано на технологиях Российского производителя ООО «ХЕМА». В настоящее время на основе давальческого компонента испытаны и произведены наборы для диагностики лейкоза крупного рогатого скота («Лейкоз IgG –ИФА»). Прошли успешную процедуру регистрации новые тест системы ИФА для диагностики птичьего гриппа («Influenza A Ab-ИФА») и чумы (Ньюкасла) птиц («NDV-Ab-ИФА»).

Проблемным вопросом для стран Центрально-азиатского региона является распространение бруцеллёза среди сельскохозяйственных животных.

Бруцеллез – социально опасная, острая зоонозная инфекция, склонная к переходу в хроническую форму. Возбудитель заболевания – бактерия рода *Brucella* крайне жизнеспособна во внешней среде. Ввиду наличия скудных клинических признаков при бруцеллёзе, лабораторная диагностика имеет большое значение. Поэтому разработка современных стандартных диагностикумов, обеспечивающих получение точных и достоверных результатов с минимальными затратами времени и ресурсов крайне важна и необходимо для Узбекистана.

В задачу наших исследований входило разработка опытных образцов реагентов для иммуноферментного выявления IgG антител к возбудителю бруцеллёза крупного рогатого скота (крс), а также определение норм параметров характеризующие исследуемые сыворотки.

Материалы и методы. Определение IgG антител к антигенам возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота проводили в непрямом варианте

иммуноферментного анализа. Перед проведением ИФА все компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки крови выдерживали при комнатной температуре от +18 до +25°C не менее 30 мин. Постановку ИФА осуществляли в объеме 100 мкл каждого реагента. На внутренней поверхности лунок планшета был иммобилизован антиген из бруцелл. В качестве исследуемого материала (образца) использовали сыворотку крови (плазму) крупного рогатого скота. Исследуемые образцы сыворотки перед применением разводили в 41 раз, т.е. в 400 мкл буфера разводили 10 мкл сыворотки. Контрольные сыворотки не разводили. Антитела из образца связывались с антигеном на поверхности лунки. Концентрат отмывочного раствора разводили дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды). Промывку проводили буфером объемом не менее 250 мкл. Образовавшийся комплекс выявляли с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG к.р.с. с пероксидазой хрена и получали связанный с пластиком «сэндвич» с пероксидазой. Окрашивание растворов в лунках проводили раствором тетраметилбензидина (ТМБ) в период инкубации субстрата. Инкубирование проводили в течении 60 минут при +37°C. Интенсивность окраски при этом была прямо пропорциональна содержанию специфических IgG антител к антигену. Действие ТМБ тормозили стоп-реагентом (5%-ный раствор серной кислоты). Величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета определяли на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета производили в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований были установлены параметры нормы характерные для исследуемых образцов. При этом интерпретация результатов была следующей при ИП>1.1 образец считался положительным, при ИП<0.9 – отрицательным, при значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 то есть находился в пограничной зоне (+/-) то результат считался сомнительным и такие образцы рекомендовали исследовать повторно. В случае повторного сомнительного результата тест считался неопределенным, и в этом случае следует проводить тестирование сыворотки полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы необходимо считать отрицательными.

Таким образом, в результаты полученных исследований позволяют сделать **вывод** о том что, опытные образцы отечественных реагентов для ИФА изготовленные на базе НИИВ являются чувствительными и специфичными и могут быть использованы для широких производственных испытаний.

Список использованной литературы:

1. Еремец В.И. Совершенствование и стандартизация тест -системы ИФА и РСК для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных и пушных зверей / Еремец В.И., Люлькова Л.С., Еремец Н.К., Самуйленко А.Я., Голотенков Д.А. // Мат. междунар. науч.-практич. конф., посвящ. 80-ле-тию каф. анатомии и гистологии с-х животных, 110-летию со дня рожд. проф. Н.И.

Акаевского и 15-летию кинологического центра,- Сб. науч. тр.-Троицк:УГАВМ. -2009. – С.222 – 224.

2. Люлькова Л.С. «Разработка диагностической тест-системы ИФА на основе антигена культурального вируса» Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации, Материалы Междунар. научно-практич. конференции 16-17 марта 2011 года, Покров 2011, стр.139-142.

3. Люлькова Л.С. Влияние бычьего сывороточного альбумина на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности, Москва. – 1985. – №1. – С. 12-15.

4. Международный Кодекс здоровья наземных животных (том I, II, 2019 г.).