

¹Л.Ж. АЛЕКЕШЕВА, ²Б.Б. БАЙМУРЗИНОВ, ²Т.И. ТУГАМБАЕВ, ²Т.С. ПОНОМАРЕВА,
³А.Б. ДАНИЯРОВА, ³А.А. ТАБАЕВА

¹Казахский Национальный медицинский университет им.С.Д.Асфендиярова,

²Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций
им. М.Айкимбаева

³Казахский Национальный университет им. аль-Фараби

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Особо опасные инфекции (ООИ) – это инфекции, которые могут возникать среди населения в виде отдельных заболеваний, эпидемий и даже пандемий, чаще сопровождаая ЧС, характеризуются природной очаговостью, быстрым распространением и тяжелым течением. Экспресс-индикация это своеобразная разведка большой армии лабораторной диагностики и находится на переднем крае научного поиска новых, простых, экономичных, быстрых методов индикации микробов, часть из которых в дальнейшем идет на вооружение и совершенствование лабораторной практики.

Ключевые слова: *особо опасные инфекции, методы лабораторной диагностики, иммуноферментный анализ.*

Возрастающая актуальность проблемы особо опасных инфекционных болезней (далее – ООИ) в современных условиях обусловлена неуклонной тенденцией появления новых и возвращения старых нозологических форм, экономическим ущербом, угрожающим стабильности Республики Казахстан, возрастанием риска актов биологической агрессии, возникновения ЧС вследствие стихийных бедствий и техногенных катастроф.

Чума – одна из немногих инфекций, при которых окончательный диагноз принадлежит не клиницисту, а лабораторной службе. Больной подлежит изоляции в специально приспособленное помещение, где назначают раннее этиотропное лечение.

В данной работе разбирается этап диагностики ООИ на примере чумы. При установлении окончательного диагноза, определяется характер противоэпидемических мероприятий, устанавливается возможный источник инфекции и механизмы его передачи. Именно в таких случаях необходимо и оправдано применение экспресс-методов диагностики ООИ, для адекватного проведения противоэпидемических, профилактических и лечебных мероприятий.

Лабораторные методы диагностики. К настоящему времени для диагностики ООИ разработаны такие диагностические методы, как МФА, РН, РСК, РДП, РНГА и др.

1) метод флуоресцирующих антител (МФА) – визуальный учет специфического взаимодействия флуоресцирующих антител с гомологичным антигеном/8/;

2) иммуноферментный анализ (ИФА) - иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело;

3) реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) - метод выявления антигенов и антител, основанный на способности эритроцитов, на поверхности которых предварительно адсорбированы антигены или антитела, агглютинироваться в присутствии гомологичных сывороток или соответствующих антигенов;

4) реакция нейтрализации антител/антигена (РНAt/РНАг) - основана на нейтрализации антител/антигена специфическими антителами/антигеном, находящимся в исследуемом материале;

5) полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Метод твердофазного ИФА и его применение для диагностики ООИ.

Историческая справка. Среди методов иммунохимического анализа особое место занимает гетерогенный твердофазный иммуноферментный /4,7/, базирующийся на применении в качестве маркера различных ферментов (пирофосфатаза, пероксидаза, β-галактозидаза, щелочная фосфатаза и др.). ИФА используют для определения вирусных и бактериальных антигенов, серологического анализа инфекционных и неинфекционных заболеваний, а также для оценки эффективности вакцинации. Преимущество ИФА перед другими методами является высокая стабильность используемых реактивов и результатов, отсутствие необходимости работ с радиоактивными веществами, а также децентрализация при массовых обследованиях. В начале 1970-х гг. E.Engvall и P.Perlmann /4,8/ и независимо от них В.К. VanWeeman и А.Н.В.М. Schuurs /4,9/ предложили для выявления и количественного определения антигенов и антител без применения агглютинации частиц или радиоактивных меток более чувствительных и универсальных меток для иммуноанализа – ферменты. E.Engvall и P.Perlmann предложили сокращенно называть этот анализ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) /4,8/, что означает фермент-зависимый иммуносорбционный анализ. Суть состоит в том, что сначала отделяют меченые и немеченые антигены, связавшиеся с антителами, от свободных антигенов и только потом измеряют активность метки в одной из двух фракций. Такие методы относят к иммуноанализу с разделением компонентов. Поскольку фракционирование анализируемой смеси неизбежно предполагает использование гетерогенных фаз, иммуноанализ с разделением компонентов часто называют гетерогенным иммуноанализом.

В 1972 г. К.Е. Rubenstein et al. разработали иммуноферментный анализ, не требующий перед измерением ферментативной активности разделения связанных с антителами и свободных антигенов. Метод основан на изменении удельной активности фермента при связывании антител с антигенами, содержащими ферментную метку. Ферментативная активность нефракционированной анализируемой смеси пропорциональна количеству меченых ферментом антигенов, не связавшихся с антителами. При таком анализе гетерогенные фазы для разделения связанных и свободных антигенов не требуются, поэтому его называют иммуноанализ без разделения

компонентов /5/. С тех пор, как ферменты в 1971 г. впервые были предложены в качестве меток для иммуноанализа, ИФА широко используется в диагностике вирусных и бактериальных болезней /1, 2, 3, 4, 5/. Благодаря им решены важные научные проблемы биологии. Успех этих методов объясняется их высокой специфичностью, чувствительностью, простотой в исполнении и возможностью полной автоматизации процессов реакций /2,4/. Наибольшее применение в диагностике целого ряда вирусных заболеваний человека и животных нашли методы твердофазного ИФА /6, 7, 8, 9/. Твердофазный (гетерогенный) метод ИФА основан на использовании антител и антигенов, иммобилизованных на твердом носителе. Этот комплекс, названный иммуноадсорбирующим, позволяет уловить антиген или антитела в исследуемом растворе. Полученный таким образом иммунный комплекс выявляют путем введения вторичного антитела или антигена, но уже меченого ферментом. Впервые твердофазный ИФА был описан в 1972 г /5/, и в настоящее время он широко известен под названием метод "ELISA"- энзимсвязанный иммуноадсорбирующий анализ. В зависимости от того, исследуют антиген или антитело и применяют различные модификации этого метода.

Применение метода ИФА в практике подтвердило его широкие возможности для обнаружения бактериальных и вирусных антигенов и антител к ним, токсинов, гормонов и других биологически активных веществ. Показана возможность создания отечественных ингредиентов для иммуоферментного анализа. В Республике Казахстан разработкой иммуоферментного анализа начали заниматься с начала 80-х годов, в настоящее время этот метод хорошо освоен, разработан и используется во многих крупных научно-исследовательских центрах, лабораториях и диагностических учреждениях. Для обнаружения антигена применяют следующие варианты ИФА: прямой метод адсорбции антигена; прямой "Сэндвич"-метод; непрямой "Сэндвич"- метод (с использованием антивидовых антител); конкурентный метод с иммобилизованным антигеном; конкурентный метод с иммобилизованным антителом. Для выявления антител применяют такие методы, как прямой "Сэндвич" - метод (по принципу ингибирования), непрямой "Сэндвич-метод" и метод конкуренции антител. Все разнообразие методов твердофазного ИФА можно объединить в две группы - конкурентные и неконкурентные.

Конкурентные методы ИФА. Эти методы основаны на принципе конкуренции известного количества меченого антигена или антитела с неизвестным количеством того же самого антигена или антитела, но уже не меченого ферментом, за третий компонент реакционной смеси, адсорбированы на твердом носителе. В этих методах о наличии в пробе аналита судят по степени подавления специфического окрашивания.

Неконкурентные методы твердофазного ИФА. В отличие от конкурентных методов, концентрация антигенов или антител, определяемая данными методами, прямо пропорционально интенсивности окрашивания реакций.

Имуоферментные конъюгаты. Важным звеном при отработке иммуоферментных методов является приготовление и контроль иммуоферментных конъюгатов. Само же качество конъюгатов определяется свойствами фермента и антитела или антигена, входящими в его состав, а также способом изготовления конъюгата.

Заключение по обзору литературы.

Основные пути развития экспресс-индикации микроорганизмов на ближайшие годы:

- 1) создание и конструирование новых препаратов, способствующих ускорению и удешевлению исследований, повышению эффективности лабораторной диагностики инфекций и индикации патогенных и других микроорганизмов. На этом пути предстоит сделать очень многое, поскольку общепринятые диагностические препараты в значительной степени исчерпали свои потенциальные возможности;
- 2) разработка новых более чувствительных, простых методов лабораторного анализа.
- 3) разработка комплексных методов и видов исследований. Будет продолжаться дальнейшая интеграция методов и видов исследований, имеющих разные принципы действия, лежащие в их основе;
- 4) создание новых схем исследований;
- 5) разработка и создание новых методов регистрации и учета результатов экспресс-индикационных и лабораторных исследований.
- 6) разработка новой микроминиатюрной лабораторной посуды, аппаратуры и приборов для исследований;
- 7) автоматизация и компьютеризация исследований.

При сравнении этого теста с РН, оказалось, что титры антител, выявляемые обеими реакциями, почти одинаковы. Но чувствительность ИФА составила 85 %, а специфичность - 70% по сравнению с РН /6/. Авторы объясняют это высоким уровнем фона при учете реакций, которая обуславливается присутствием следов бычьего гаммаглобулина как в культуральных антигенах, так и в кроличьей (антибычьей) сыворотке, РСК это подтвердило. Авторы все же рекомендуют использование ИФА для замены РН, так как метод оказался более дешевым и простым в исполнении, результат можно получить через 4 часа после внесения испытуемых проб сывороток в лунки плашек, тогда как при использовании РН требуется минимум 4-8 сут.

Таким образом, ИФА является весьма перспективным методом, для диагностики особо опасных инфекций, обследования диких грызунов из природных очагов, их эктопаразитов, оценки иммунологического статуса животных и человека, изучение эффективности массового применения вакцин и других биопрепаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Dabrowska I, Dworecka-Kaszak B, Brillowska-Dabrowska A. The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets // *Acta Biochimica Polonica*. –Vol. 61, Issue: 2. – 2014. – P. 375-378.
- 2 Patent Number: JP2004258024-A; JP4117563-B2. Detecting dermatophytes, involves using antibody having reactivity with dermatophytes such as *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis* and *Epidermophyton floccosum* / Kajitani K; Hoki S; Ishida H.; Patent Assignee: TOYOCO KK.
- 3 Маркина М.В., Романов В.В. Иммуноблот в диагностике инфекционных заболеваний. Новые возможности. Практическое руководство по интерпретации полученных результатов. http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/immunoblot_infect.shtml
- 4 Современные методы лабораторной диагностики. Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний. Справочное пособие для врачей. - Ростов-на-Дону: 2012. - С. 25-28.
- 5 Tomtishen J.P 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology* 2012; 9: 22. doi: 10.1186/1743-422X-9-22.
- 7 Кочиш Л.Т. Высокотехнологичная компания “Алкор Био”: современный подход к разработке и производству иммуноферментных тест-систем для алергодиагностики // Справочник заведующего КДЛ. – 2011. – №4. – С. 33-36.
- 8 Соболев А.В., Аак О.В. Современная алергодиагностика: опыт работы // *Hi+Med*. Высокие технологии в медицине. – 2011. – Вып. №2. – С. 8-10.
- 9 Курчева С.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В., Старцева О.Л., Жарникова И.В., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. Разработка диагностической тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза в непрямом методе иммуноферментного анализа // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 2., С.15.
- 11 Киселева Р.Ю. Сравнительный анализ выявления амфетаминов методом ИФА и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией / Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Анохин Л.А., Петроченко С.Н., Смирнов А.В., Морозова В.С., Брюн Е.А. // *Судебно-медицинская экспертиза*. – 2010. – № 2- С.42-44.
- 12 Киселева Р.Ю. Современные методы оценки иммунного статуса для диагностики заболеваний зависимости на основе иммуноанализа / Киселева Р.Ю., Петроченко С.Н., Постоюк Н.А., Брюн Е.А., Мягкова М.А. // *Материалы Конгресса «Человек и проблемы зависимости»*. – Архангельск: 28-29 апреля 2010.

¹Л.Ж. АЛЕКЕШЕВА, ²Б.Б. БАЙМУРЗИНОВ, ²Т.И. ТУГАМБАЕВ, ²Т.С. ПОНОМАРЕВА,
³А.Б. ДАНИЯРОВА, ³А.А. ТАБАЕВА

¹С.Д.Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық Медицина Университеті,

²М.Айқимбаев атындағы карантиндік және зоонозды жұқпалар

Қазақ ғылыми орталығы

³Аль-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті

АСА ҚАУЫПТЫ ИНФЕКЦИЯЛАРДЫ ЗЕРТТЕУГЕ АРНАЛҒАН ИММУНОФЕРМЕНТТІК АНАЛИЗ ТЕСТ-СИСТЕМАЛАРЫ

Түйін: Аса қауіпті жұқпа аурулар – халық арасында жеке жұқпа, эпидемия немесе пандемия ретінде байқалатын, төтенше жағдайларды туындайтын жұқпалар. Бұл жұқпаларға тән қасиет табиғи ошақтық таралу, халық арасында тез өршу және аурудың ауыр түрдегі ағымы. Экспресс-индикациялау дегеніміз ауқымды зертханалық диагностикалау жүргізу. Ол әлі де ғылыми ізденісте қоздырғышты тез диагностикалаудың жаңа, қарапайым, экономикалық тиімді әдістері.

Түйінді сөздер: Аса қауіпті жұқпалы аурулар, зертханалық зерттеу әдістері, иммуноферментті анализ.

¹L.ZH. ALEKESHEVA, ²B.B. BAYMURZINOV, ²T.I. TUGAMBAYEV, ²T.S. PONOMAREVA,
³A.B. DANİYAROVA, ³A.A. TABAYEVA

¹Asfendiyarov Kazakh National medical university

²Kazakh Scientific center of Quarantine and Zoonotic Diseases named after Aikimbayev M.

³Al'-Farabi Kazakh National University

SYSTEM TEST FOR ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY APPLIED IN THE DIAGNOSIS OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIONS

Resume: Particularly dangerous infections (RDN) - is an infection that can occur in the population in the form of individual diseases, epidemics and even pandemics, often accompanying emergencies, characterized by natural focality, the rapid spread and severe. Express indication is the kind of exploration of a large army of laboratory diagnostics. It is at the forefront of scientific research of new, simple, cost-effective, rapid microbial methods of indications, some of which later are applied in laboratory practices and thus constantly bring improvement. This area is very non-conventional, its development could lead in the coming years to new methods of microorganisms express indication.

Keywords: particularly dangerous infections, laboratory diagnosis methods, enzyme-linked immunosorbent assay.