



IMMUNOFERMENTAL USUL BILAN BIOTINNI ANIQLASHDA STREPTAVIDIN ISHLATISH

Ishonkulova Gulhon Tagaymuratovna

Ishankulova Mehri Muratovna

Toshkent viloyati Angren shahar

Davolash fakulteti Angren universiteti o'qituvchilari

Annotatsiya: Ushbu maqolada, o'rtacha yo'riq virusiga qarshi biotin-streptavidin yordamida immunofermental tahlilning sezgirligini solishtirish natijalari keltirilgan.

Kalit so'zlar: antitanachalar, o'rtacha yo'riq virusi, immunofermental usul, cho'chqalar virezikul ekzantemasi virusi (VVE), cho'chqalar virezikul kasalligi virusi (VVK), radiyal immunodiffuziya reaksiyasi (RIR), virus-spetsifik.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОТИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРЕПТОАВИДИНА ПРИ ЯЩУРЕ

Аннотация: В данной статье представлены результаты сравнительной оценки чувствительности иммуноферментного анализа с использованием биотин-стрептавидиновой системы при диагностике ящура. Исследование показало, что данный метод обладает высокой чувствительностью и точностью, что позволяет эффективно выявлять заболевание на ранних стадиях. Авторы подчеркивают, что использование данного подхода может значительно улучшить диагностику ящура по сравнению с другими методами, обеспечивая более быстрые и надежные результаты. Это открывает новые возможности для диагностики и контроля за распространением болезни.

Ключевые слова: антитела, вирусу ящура, иммуноферментный метод, вирус везикулярной экзантемы свиней (ВЭС), вирус везикулярной болезни свиней (ВБС), реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД), вирусспецифические.

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR DETERMINATION OF BIOTIN USING STREPTAVIDIN IN FOOT-AND-MOUTH DISEASE

Abstract: This article presents the results of a comparative evaluation of the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the biotin-streptavidin system for diagnosing foot-and-mouth disease (FMD). The study showed that this method has high sensitivity and accuracy, allowing for effective detection of the disease in its early stages. The authors emphasize that using this approach can significantly improve FMD diagnosis compared

to other methods, providing faster and more reliable results. This opens up new opportunities for disease diagnosis and control.

Keywords: antibodies, foot-and-mouth disease virus, enzyme immunoassay, porcine vesicular exanthema virus (PVES), swine vesicular disease virus (SVD), radial immunodiffusion reactions (RID), virus-specific.

Введение: Известен ряд методов повышения чувствительности иммуноферментного анализа (ИФА). Одним из таких является использование биотин-авидина (стрептоавидина). По данным ряда исследователей введение этой системы в иммуноферментный анализ позволяет повысить чувствительность анализа. В то же время имеются сообщения о непригодности прямого варианта авидин- биотинового теста для повышения чувствительности ИФА из-за высокого уровня фона.

В настоящем сообщении приведены результаты определения диагностической ценности иммуноферментного метода с применением биотин-стрептоавидиновой системы при определении антигенов вируса ящура.

Методы и результаты исследование:

В работе использовали коммерческие антигены вируса ящура разных типов, вируса везикулярной экзантемы свиней (ВЭС) и вируса везикулярной болезни свиней (ВБС), изготовленные на экспериментальном заводе "Юрьецветбиопрепарат", а также суспензии, приготовленные из инфицированных крольчат, мышат, афт морских свинок, свиней, овец и крупного рогатого скота (КРС), культуральные вирусы, полученные в культурах клеток ВНК-21, FB-RS-2, СИ.

Для проведения исследования использовали препараты антител и вирусу ящура с титрами в реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) не менее, чем 1:1600, выделенные по ранее разработанной авторами методике из гипериммунных сывороток свиней, кроликов, морских свинок, овец и крупного рогатого скота. Биотинилирование антител, проводили добавлением к 1 мл раствора иммуноглобулинов (10 мг/мл в 0,1 М NaHCO₃ - бикарбонатном буфере, pH 8,8) 120 мкл 0,1 раствора м - оксисукцимидного эфира биотина в диметилформамиде. После инкубации в течение 2 часов при комнатной температуре раствор диализовали против 0,05 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,5.

Конъюгаты вирусспецифических антител с пероксидазой и β -лактамазой и β -Д-галактозидазой получали согласно ранее апробированным методам.

Конъюгаты стрептоавидина с пероксидазой, β -Д-галактозидазой и β -лактамазой получены из Института биоорганической химии им. Шенякина (г.Москва):

Постановку ИФМ с хромогенным субстратами осуществляли на полистироловых панелях, изготовленных ВНИИМТ (г.Москва). При постановке с флюорогенными субстратами использовали специальные чёрные и белые панели "Микрофлюор" фирмы "Dynateck 90 ФРГ", которые сенсibilизировали растворами иммуноглобулинов в концентрации 10 мкг/мл белка в 0,02М карбонатном буфере (pH 9,6) в течение 1 часа при

37°C или 18 часов при 4°C. Не связавшиеся антитела удаляли трёхкратной отмывкой панелей раствором, изготовленным из сухой композиции ВНИИ 9-1 и в сенсibilизированные лунки вносили по 0,1 мл разведённого двойным шагом антигена вируса ящура (контрольного и исследуемого), начиная с разведения 1:2. После инкубации в течение 1 часа при 37°C лунки трижды промывали раствором ВНИИ 9-1 и в каждую лунку вносили по 0,1 мл рабочего разведения биотинилированных антител, которые подбирали экспериментальным путём. Панели инкубировали 60 мин. при 37°C, промывали как описано выше и добавляли по 0,1 мл рабочего разведения одного из конъюгатов (стрептоавидин-пероксидазы), стрептоавидин или стрептоавидин - β -Д-галактозидазы, - β -лактамазы. После инкубации в течение 1 часа при 37°C лунки промывали, как описано выше и вносили субстрат, приготовленный по ранее подобранной прописи.

Учёт результатов ИФМ и ИФМ с биотинстрептоавидиновой системой с хромогенными субстратами проводили визуально или спектрофотометром МР-700, а с флюорогенными "Микрофлюор" фирмы "Dynateck". на микрофлориметре.

Параллельно антигены исследовали в реакции связывания комплемента (РСК), широко используемой для диагностики ящура.

В первой серии опытов по "Шахматке" определяли рабочие разведения конъюгатов. В таблице I приведены значения разведений конъюгатов, при которых выявляются наименьшие количества исследуемых антигенов.

Как видно из данной таблицы, активность конъюгатов ферментов со стрептоавидином и антителами существенно не отличалась.

В дальнейших опытах конъюгаты использовали в разведениях, приведённых в таблице I.

Во второй серии опытов изучали чувствительность разных модификаций твёрдофазного иммуноферментного метода.

Данные, приведённые в таблице 2 свидетельствуют о том, что ИФМ с биотин-стрептоавидиновой системой и хромогенным субстратом позволяет выявлять антигены в разведениях в 2-8 раз превосходящих аналогичные показатели обычной ИФМ и в 200 раз РСК. Использование флюорогенного субстрата дополнительно повышает чувствительность биотин-стрептоавидиновой системы в три раза.

Таблица I

Характеристика используемых конъюгатов антител (n =3-5)

п/п.	Конъюгаты	Активность конъюгатов
1.	Биотинилированные антитела	1:8000-1:2000
2.	Стрептоавидин-пероксидаза	1:6000-1:1500
3.	Стрептоавидин- β -лактамаза	1:600-1:200
4.	Стрептоавидин- β -Д-галактозидаза	1:6000-1:750
5.	Антитела+пероксидаза	1:6000-1:1500

Биотин-стрептоавидиновая система специфична и позволяет определять типовую принадлежность возбудителя ящура.

Вывод: таким образом показано, что использование ИФМ с биотини- лированными антителами и конъюгатами стрептоавидина с пероксидазой, β -лактамазой, β -Д-галактозидазой позволяет проводить определение вируса ящура и повысить в несколько раз чувствительность метода. В то же время нам не удалось добиться значительного повышения чувствительности ИФМ за счёт использования этой системы, несмотря на теоретическую возможность повышения её в несколько десятков раз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мищенко В.А., Шажко Е.А., Базаров М.А. и др. Сравнительная оценка разных вариантов твёрдофазного иммуноферментного анализа // Актуальные вопросы вет. вирусол. Владимир, 1987, Ч.2. С.50-51.
2. Мищенко В.А., Базаров М.А., Конюшкина Т.Б. Иммуноферментный метод определения вируса ящура о использование конъюгатов β -лактамазы с вирусспецифическими антителами // Антибиотики и химиотерапия. 1989. - № 34 и 10.- С.739-741.
3. Мищенко В.А., Шажко К.А., Базаров М.А. и др. Сравнительная оценка методов конъюгация антител к вирусу ящура с пероксидазой хрена // Актуальные проблемы вет. вирусол. Владимир, 1987. Ч.2.- С.49-50.
4. Мищенко В.А., Базаров М.А., Смирнов А.Б. и др. Изучение диагностической ценности иммуноферментного метода с флюорогенными субстратами щелочной фосфатазы и β -Л-галактозидазы // Актуальные проблемы вет. вирусол. 1988. Ч.1. С.61-62.
5. Мищенко В.А., Базаров М.А., Конюшкина Т.Б. и др. Влияние субстрата пероксидазы на чувствительность иммуноферментного метода // Сельхозонология. 1990. 6. С.190-192.
6. Шажко Е.А., Мищенко В.А., Улупов Н.А. и др. Способ получения гамма-глобулина / А.с. 1119697, 1982.
7. Осипов А.П., Егоров А.М. Молекулярные усилители в иммунохимическом анализе // Всесоюзное химическое общество им. Д. И. Менделеева. 1989. № 34.1.0.18-23.