

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БИОТИН-СТРЕПТО
АВИДИНОМ ПРИ ЯЩУРЕ**

Базаров Мурат Ахмаджонович, доктор ветеринарных наук, доцент.

Умирзаков Иззатилло Салохиддин ўғли, Ассистент.

Андижанский институт сельского хозяйства и агротехнологий.

*Кличева Икболой Бахтиержановна, кандидат медицинских наук,
заведующий кафедрой, доцент.*

Маликов Тоиржон Марифович, Ассистент.

Андижанский государственный медицинский институт

Аннотация. В данной статье представлены результаты сравнительной оценки чувствительности иммуноферментного анализа биотин-стрепто авидином при ящуре.

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

**BIOTIN-STREPTO-AVIDIN ENZYME IMMUNOASSAY IN
FOOT-AND-MOUTH DISEASE**

*Bazarov Murat Akhmadzhonovich, Doctor of Veterinary Sciences,
Associate Professor.*

*Umirzakov Izzatillo Salokhiddin Ogli, Assistant.
Andijan Institute of Agriculture and Agrotechnology.*

*Klicheva Ikboloy Bakhtierzhanovna, Candidate of Medical Sciences,
Head of Department, Associate professor.*

*Malikov Toirzhon Marifovich, Assistant.
Andijan State Medical Institute*

Annotation. This article presents the results of a comparative evaluation of the sensitivity of the biotin-strepto-avidin enzyme immunoassay for foot-and-mouth disease.

Key words: 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 Na - 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 -лактамозой получены из Института биоорганической химии им. Шемякина (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 ВНИИИ 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 ВНИИИ 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 MP-700, а с флюорогенными "Микрофлюор" фирмы "Dunateck ". 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
I.	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
6.	Антитела + β -лактамаза	1:400-1:200
7.	Антитела+ β -Д-галактизидаза	1:6000-1:1000

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

Вывод: таким образом показано, что использование ИФМ с биотинилированными 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 иммуоферментного 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 иммуоферментного 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.
8. Базаров М.А., Собиров И.А., Акбаров А.С., Вазиров Ш.С. «Эпизоотическая ситуация бешенства в республике Таджикистан» <https://doi.org/10.5281/zenodo.7895327>
9. Базаров М.А., Собиров И.А., Тожибаева М.Х., Вазиров Ш.С. «Молекулярно - генетической характеристики изолятов вируса бешенства в республике Таджикистан» <https://doi.org/10.5281/zenodo.10002328>
10. Базаров М.А., Собиров И.А., Солиев Б.Ч., Тожибаева М.Х., Вазиров Ш.С. Молекулярно- генетической характеристики изолятов вируса бешенства в республике Таджикистан <https://doi.org/10.5281/zenodo.10002328>
11. Базаров М.А., Собиров И.А., Солиев Б.Ч., Сотволдиев К.Х., Вазиров Ш.С. «Эпизоотологические аспекты бешенства в районах

Республиканского подчинения (РРП) Таджикистана»
<https://doi.org/10.5281/zenodo.10002336>

12. Базаров М.А. «Эпизоотология ва инфекцион касалликлар»
фанидан ДАРСЛИК №55013 «Classic» 2024.