

УДК 61.616-7

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Лазарев Д.Р., Медведева О.А., Парахина О.В.

Курский государственный медицинский университет

Россия, 305041, Курская область, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3

Актуальность. Одним из широко используемых высокоточных методов серологической диагностики инфекционных заболеваний является иммуноферментный анализ (ИФА). Данный метод чаще всего применяется для обнаружения вирусных или бактериальных антигенов и антител. Своевременная диагностика, с помощью ИФА позволяет не только правильно поставить диагноз заболевания, но и предупредить распространение инфекции. Кроме того, иммуноферментный анализ применяется для обнаружения различных гормонов и лекарственных средств в сыворотке крови. Наборы реагентов (тест-систем) для метода ИФА обладают различными аналитическими характеристиками и выпускаются как отечественными, так и зарубежными производителями. Актуальность проведенного исследования заключается в том, что оно позволяет систематизировать сведения об используемых на данный момент отечественных и зарубежных тест-системах (в том числе в г. Курске).

Цель – изучить наборы ИФА, используемых в клинических лабораториях лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) г. Курска и в России в целом.

Материалы и методы. Изучение и анализ литературы по выбранной теме, изучение оснащения тест-системами ИФА ОБУЗ «ОКИБ им. Н.А. Семашко» и ОБУЗ «Курская городская больница № 1 им. Н.С. Короткова».

Результаты. В результате проведенного исследования было выявлено, что на данный момент в клинических лабораториях лечебно-профилактических учреждений России чаще применяются зарубежные тест-системы ИФА, однако активно идет процесс импортозамещения. Такие заболевания, как чума, холера, туляремия, сибирская язва, гепатит В, энтеровирус, ротавирусная и норовирусная инфекция, гепатит Е диагностируются с помощью отечественных наборов ИФА. Однако существует большое количество заболеваний, которые в настоящее время обнаруживаются иностранными тест-системами ИФА: клещевой энцефалит, краснуха, ВИЧ, корь, простой герпес, гепатит С, коклюш, хламидиоз, синегнойная инфекция, дифтерия, ботулизм, столбняк, сифилис, стафилококкоз.

Заключение. Можно сделать вывод о том, что разработка тест-систем ИФА на территории нашей страны является перспективным направлением медицинской промышленности, так как это позволяет сделать производство наборов ИФА более дешевым без потерь качества, а также ускорить процесс доставки тест-систем в медико-профилактические и научно-исследовательские учреждения.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, диагностика инфекций, антиген, антитело, фермент-метка, тест-системы.

Лазарев Дмитрий Романович – студент 3 курса лечебного факультета, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0009-0009-7899-0773. E-MAIL: DMITRY-LAZ2004@YANDEX.RU (автор, ответственный за переписку).

ГМедведева Ольга Анатольевна – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0000-0002-2889-155X. E-MAIL: MEDVEDEVAOA@KURSKSMU.NET.

Парахина Ольга Владимировна – доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0000-0002-6372-0262. E-MAIL: PARAHINA-1970@MAIL.RU.

УДК 61.616-7

USE OF TEST SYSTEMS IN SERODIAGNOSIS OF VIRAL AND BACTERIAL INFECTIONS BY ENZYME-IMMUNOASSAY METHOD

LAZAREV D.R., MEDVEDEVA O.A., PARAKHINA O.V.

KURSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

305041, 3, K. MARX STREET, KURSK, RUSSIAN FEDERATION

RELEVANCE. ONE OF THE WIDELY USED HIGH-PRECISION METHODS OF SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES IS ENZYME IMMUNOASSAY (ELISA). THIS METHOD IS MOST OFTEN USED TO DETECT VIRAL OR BACTERIAL ANTIGENS AND ANTIBODIES. TIMELY DIAGNOSIS WITH THE HELP OF ELISA ALLOWS NOT ONLY TO CORRECTLY DIAGNOSE THE DISEASE, BUT ALSO TO PREVENT THE SPREAD OF INFECTION. IN ADDITION, ENZYME IMMUNOASSAY IS USED TO DETECT VARIOUS HORMONES AND DRUGS IN THE BLOOD SERUM. REAGENT KITS (TEST SYSTEMS) FOR THE ELISA METHOD HAVE VARIOUS ANALYTICAL CHARACTERISTICS AND ARE PRODUCED BY BOTH DOMESTIC AND FOREIGN MANUFACTURERS. THE RELEVANCE OF THE CONDUCTED RESEARCH LIES IN THE FACT THAT IT ALLOWS US TO SYSTEMATIZE INFORMATION ABOUT CURRENTLY USED DOMESTIC AND FOREIGN TEST SYSTEMS (INCLUDING IN KURSK).

OBJECTIVE: TO STUDY THE ELISA KITS USED IN CLINICAL LABORATORIES OF HEALTH CARE INSTITUTIONS (HCI) IN KURSK AND IN RUSSIA AS A WHOLE.

MATERIALS AND METHODS. STUDY AND ANALYSIS OF LITERATURE ON THE SELECTED TOPIC, STUDY OF THE EQUIPMENT OF THE N.A. SEMASHKO REGIONAL CLINICAL INSTITUTION OF THE CITY OF KURSK AND THE N.S. KOROTKOV KURSK CITY HOSPITAL NO. 1 WITH ELISA TEST SYSTEMS.

RESULTS. AS A RESULT OF THE STUDY, IT WAS REVEALED THAT AT THE MOMENT, FOREIGN ELISA TEST SYSTEMS ARE MORE OFTEN USED IN CLINICAL LABORATORIES OF HEALTH CARE INSTITUTIONS IN RUSSIA, BUT THE PROCESS OF IMPORT SUBSTITUTION IS ACTIVELY UNDERWAY. DISEASES SUCH AS PLAGUE, CHOLERA, TULAREMIA, ANTHRAX, HEPATITIS B, ENTEROVIRUS, ROTAVIRUS AND NOROVIRUS INFECTION, HEPATITIS E ARE DIAGNOSED USING DOMESTIC ELISA KITS. HOWEVER, THERE ARE A LARGE NUMBER OF DISEASES THAT ARE CURRENTLY DETECTED BY FOREIGN ELISA TEST SYSTEMS: TICK-BORNE ENCEPHALITIS, RUBELLA, HIV, MEASLES, HERPES SIMPLEX, HEPATITIS C, WHOOPING COUGH, CHLAMYDIA, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, DIPHTHERIA, BOTULISM, TETANUS, SYPHILIS, STAPHYLOCOCCOSIS.

CONCLUSION. CONSEQUENTLY, IT CAN BE CONCLUDED THAT THE DEVELOPMENT OF ELISA TEST SYSTEMS IN OUR COUNTRY IS A PROMISING AREA OF THE MEDICAL INDUSTRY, AS THIS MAKES IT POSSIBLE TO MAKE THE PRODUCTION OF ELISA KITS CHEAPER WITHOUT LOSS OF QUALITY, AS WELL AS SPEED UP THE PROCESS OF DELIVERING TEST SYSTEMS TO MEDICAL AND PREVENTIVE AND RESEARCH INSTITUTIONS.

KEYWORDS: ENZYME IMMUNOASSAY, INFECTION DIAGNOSTICS, ANTIGEN, ANTIBODY, ENZYME LABEL, TEST SYSTEMS.

LAZAREV DMITRY R. – 3 YEAR STUDENT OF THE FACULTY OF MEDICINE, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0009-7899-0773. E-MAIL: DMITRY-LAZ2004@YANDEX.RU (THE AUTHOR RESPONSIBLE FOR THE CORRESPONDENCE).

MEDVEDEVA OLGA A. – DOCTOR OF BIOLOGICAL SCIENCES, PROFESSOR, HEAD OF THE DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, IMMUNOLOGY, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0000-0002-2889-155X. E-MAIL: MEDVEDEVAOA@KURSKSMU.NET

PARAKHINA OLGA V. – ASSOCIATE PROFESSOR OF THE DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, IMMUNOLOGY, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0000-0002-6372-0262. E-MAIL: PARAKHINA-1970@MAIL.RU.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Одним из широко используемых высокоточных методов серологической диагностики инфекционных заболеваний является иммуноферментный анализ (ИФА). Данный метод чаще всего применяется для обнаружения вирусных или бактериальных антигенов и антител. Своевременная диагностика, с помощью ИФА позволяет не только правильно поставить диагноз заболевания, но и предупредить распространение инфекции. Кроме того, иммуноферментный анализ применяется для обнаружения различных гормонов и лекарственных средств в сыворотке крови. Наборы реагентов (тест-систем) для метода ИФА обладают различными аналитическими характеристиками и выпускаются как отечественными, так и зарубежными производителями. Актуальность проведенного исследования заключается в том, что оно позволяет систематизировать сведения об используемых на данный момент отечественных и зарубежных тест-системах (в том числе в г. Курске).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели применялся анализ литературы по выбранной теме, а также изучение оснащения тест-системами ИФА ОБУЗ «ОКИБ им. Н.А. Семашко» и ОБУЗ «Курская городская больница № 1 им. Н.С. Короткова».

При посещении вышеуказанных ЛПУ был проведен расспрос работников клинических лабораторий про тест-системы ИФА, используемые для выявления вирусных и бактериальных антител и антигенов. Также был произведен визуальный осмотр наборов ИФА и механизма их функционирования под контролем сотрудников вышеуказанных ЛПУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ИФА – это серологический метод, в основе которого лежит обнаружение антигена (АГ)/антитела (АТ) при помощи антител/антигенов, которые мечены фер-

ментом. Ферментами могут быть пероксидаза, щелочная фосфатаза или β -галактозидаза. После того, как антиген соединится с иммунной сывороткой, меченной ферментом, необходимо добавить субстрат (хромоген). Фермент разрушает субстрат и в результате этой реакции образуются окрашенные вещества. Количество связавшихся антигенов и антител имеют прямую зависимость: чем больше молекул АГ и АТ связалось, тем интенсивнее окраска. Интенсивность окраски регистрируется фотометром при определенной длине волны, а затем результат отмечают в единицах оптической плотности [3].

С помощью метода ИФА выявляют антитела или антигены в исследуемом материале, что позволяет определить вид возбудителя. Кроме того, обнаружение различных классов иммуноглобулинов позволяет отдифференцировать первичный иммунный ответ от вторичного. Например, при первичной острой инфекции обнаруживают IgM, а в случае хронизации процесса – IgG. Немаловажным фактором является то, что IgG обнаруживаются в сыворотке после вакцинации. Прочность связи между антителом и антигеном, т.е. авидность, позволяет определить давность инфицирования, что имеет особое значение в пренатальной диагностике [5].

Существуют 4 основных способа проведения ИФА: «Сэндвич» метод, Непрямой метод, Конкурентный метод, Прямой метод.

В «сэндвич» методе происходит двойной захват антигена. Используются антитела к двум различающимся по структуре эпитопам антигена. Такая техника постановки ИФА используется для обнаружения антигенов вируса гепатита А.

Непрямой метод предполагает добавление к антигену первичных антител, после чего добавляются меченные АТ. После инкубации регистрируется ферментативная активность образовавшихся на твердой фазе иммунных комплексов. Данный метод используется в диагностике гепатита С.

В конкурентном методе ИФА используется ограниченное количество антител/антигенов, содержащихся в исследуемом материале. За них конкурируют между собой диагностические антиген/антитело и АГ с ферментной меткой. Названный

способ применяется в определении гормонов и антигенов в высоких концентрациях, например в серодиагностике АГ энтеробактерий и вируса ящура.

В прямом методе происходит соединение антител/антигенов с ферментом-меткой, их отмывание и добавление комплекса АТ – фермент к осажденным АГ (АТ). С помощью данного метода обнаруживают антигены вирусов семейства ОРТНОМУХОВИРИДАЕ (вирусы гриппа) [3].

Качество проведения ИФА зависит от различных факторов, таких как: степень очистки и активности антигенов и антител, иммобилизация антигена на твердой фазе, структура буфера для покрытия, действие детергентов при отмывке, точность дозирования реагентов, температура и время инкубации, стабильность субстрата и продукта, температура реакции, буферный состав, стабильность фермента [8].

В научной литературе приводится множество примеров обнаружения неизвестных антигенов и антител с помощью коммерческих тест-систем для серодиагностики методом ИФА.

В практике лабораторной диагностики широко используются наборы реагентов (тест-системы) ИФА для выявления специфических антител к антигенам возбудителей вирусных инфекций: SARS-CoV-2 (итальянские компании DIASORIN LIAISON, BIOMERIEUX VIDAS, SIEMENS ATELLICA); клещевого энцефалита (отечественная компания R-БИОРНАРМ); краснухи (фирмы NUNC – Дания); ВИЧ (компаний VENNING и WELLCOZYME – Германия); бешенства (американские производители BIO-RAD PLATELIA RABIES II и Focus Diagnostics); простого герпеса (фирмы FISHER и DIAMEX IMMUNOSIMPLICITY – США); кори (китайские компании EUROIMMUN, CLIN-TECH MICROIMMUNE, NOVATEC, NOVALISA, SERION и SIEMENS ENZYGNOST); гепатита С (американская компания CLOUD CLONE CORP и отечественная фирма МилаЛаб) [2, 6, 7, 9,10].

Преимущество тест-систем МилаЛаб в том, что их стоимость значительно ниже и по качеству они не уступают наборам, производимым в западных странах.

В настоящее время вышеназванные тест-системы применяются в бактериологических лабораториях ОБУЗ «Курская городская больница №1 им. Н.С. Короткова» для обнаружения специфических антител к

вирусу гепатита С.

Анализ наборов реагентов для постановки ИФА в клинических лабораториях г. Курска показал, что зарубежные тест-системы для выявления вирусных АГ постепенно заменяются отечественными:

Тест-системы с моноклональными антителами к ORF2-капсидному белку вируса гепатита Е выпускаемые фирмой МИКРОГЕН СМВН (Германия), заменяются наборами, производимыми в России. Например, в ОБУЗ «Курская городская больница №1 им. Н.С. Короткова» для обнаружения АГ данного вируса используется тест-система ИФА «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР-ГМ»;

Тест-системы с моноклональными антителами к НВЕ- и НВСОР- антигенам вируса гепатита В (Россия). Для выявления или подтверждения поверхностного АГ вируса гепатита В используются наборы реагентов «ДС- ИФА-НВsAg»;

Тест-системы с моноклональными антителами (Мав 1С6) – диагностика АТ к энтеровирусам (Россия);

Набор ИФА ROTA-GEFEK, изготовленный в Гётеборгском университете биомедицины, содержит специфичные антитела и предназначен для выявления RVA-антигена ротавируса А. В России уже разработаны наборы ИФА для выявления АГ ротавируса и норовируса от фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Вышеназванные тест-системы не уступают в точности диагностики иностранному аналогу, значительно дешевле в цене и активно применяются в лаборатории ОБУЗ «ОКИБ им. Н.А. Семашко» г. Курска при диагностике вирусных антигенов.

Специфические антитела к возбудителям бактериальных инфекций определяют с помощью наборов ИФА как отечественного, так и зарубежного производства. Например, обнаружение АТ к капсульным полисахаридам стрептококка пневмонии проводится при помощи микрочипов разработанных в нашей стране. Зарубежные производители предлагают тест-системы для обнаружения следующих возбудителей инфекционных заболеваний: коклюша (фирмы SAVYON – Израиль, EUROIMMUN – Германия, TESTLINE – Чехия); хламидиоза (фирмы SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS и NOVAGNOST – Германия). Большой интерес представляет тест-система для выявления антител к PSEUDOMONAS

AERUGINOSA. Компоненты этого набора производятся разными американскими компаниями: MAXISORP (микротитровальная пластина 96F), BIOSCIENCES PHARMINGEN (реагенты) и MULTISCAN FC (фотометр).

Для обнаружения антител к бактериальным экзотоксинам широко применяются тест-системы, содержащие дифтерийный токсин IBL (Россия); ботулотоксин (компания Вотох – Ирландия, DYSPORT – Великобритания, JEUNEAU – Франция, XEOMIN – Германия), тетаноспазмин (фирма DENKA SOMRANU LIMITED – Япония).

Одним из перспективных направлений в серодиагностике бактериальных антигенов являются тест-системы, содержащие моноклональные антитела. Они синтезируются только одним клоном клеток и могут связаться с единственной антигенной детерминантой, что повышает точность серодиагностики. Производитель DETERMINE BIOTECHNOLOGY (Китай) изготавливает тест-системы с моноклональными АТ для обнаружения серотипов стафилококкового энтеротоксина. Возбудитель сифилиса диагностируется с помощью набора ИФА от ZEUSSCIENTIFIC (США) [4].

В настоящее время для диагностики особо опасных инфекций (ООИ) применяются коммерческие тест-системы, производимые в России. Иммуноферментная магноиммуносорбентная система (МИС), содержащая специфичные антитела к VIBRIO CHOLERAE, используется для обнаружения холерных вибрионов в окружающей среде [4]. МИС представляет собой реагенты, в которых вещество-сорбент модифицировано путем добавления магнитного материала, что позволяет увеличить область применения сорбента, то есть обнаружить холерный вибрион не только в сыворотке крови, но и в окружающей среде. Иммуноферментная тест-система, содержащая поверхностные V- и W-антигены возбудителя чумы, применяется для выявления АТ к YERSINIA PESTIS. В диагностике бруцеллеза используются как наборы для определения антител к BRUCELLA MELITENSIS, B.ABORTUS, B.SUIS, так и тест-системы для обнаружения возбудителя бруцеллеза в биоматериале и в окружающей среде. Липополисахаридный антиген FRANCISELLA TULARENSIS выявляют с помощью иммуноферментного тест-набора ELISA CLASSIC FRANCISELLA TULARENSIS ICG и

IGM. Антитела к возбудителю сибирской язвы обнаруживаются при помощи наборов с 96-луночным планшетом с плоским дном (CORNING, США) и буфером PBS, содержащим 0,05% TWEEN-20, pH 7,4 [1].

ВЫВОДЫ

Являясь технологичным и высокоточным серологическим методом, иммуноферментный анализ широко используется для обнаружения антител и антигенов к возбудителям различных бактериальных и вирусных инфекций (в том числе особо опасные инфекции). В настоящее время в России активно ведутся разработки тест-систем для серодиагностики методом ИФА. Разработка отечественных тест-систем является одним из перспективных направлений в серодиагностике вирусных и бактериальных инфекций методом ИФА в условиях импортозамещения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Лазарев Д.Р. – поиск и обработка материала, дизайн окончательного варианта статьи;

Медведева О.А. – редактирование материалов статьи;

Парахина О.В. – поиск дополнительной информации и редактирование материалов статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии источников финансирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобокулов О.О. Душанова Г.А., Набиева Ф.С. Значение иммуноферментного анализа в диагностике инфекционных заболеваний. *Вестник науки и образования*. 2021;4(1):106-108.
2. Хайтович А.Б., Ткач В.В., Ткач А.В. Методы специфической лабораторной диаг-

- ности SARS-2-COV-19. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2021;11(2):88-105.
3. Скучаева Е.А., Алешина Л.В. Иммунодиагностика гепатита в у беременных: выбор оптимального метода. XII Всероссийская конференция с международным участием «Год педагога и наставника», Саратов. 2023;469.
 4. Кретенчук О.Ф. Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе моноклональных антител. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;4:35-45.
 5. Дятлова А.П. Особенности различных методов проведения иммуноферментного анализа. Региональная научно-практическая конференция «Молодежная наука: инновации и технологии», Великий Новгород. 2022;110-114.
 6. Полтавченко А.Г. Рекомбинантный аналог домена III оболочечного гликопротеина вируса клещевого энцефалита и его применение для дифференциальной диагностики flavivirusных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;3:154-162.
 7. Серякова П.В., Акиншина Ю.А. Применение иммунохроматографического анализа для диагностики COVID-19. Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2021. *COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика*. 2021;93-93.
 8. Смирский В.В., Полуян О.С., Костюк С.А., Щербань А.И., Жаворонок С.В. Технологические компоненты и методологические основы конструирования тест-систем для иммуноферментного анализа. *Медицинские новости*. 2023;1(340):37-44.
 9. Хайдарова Б.И., Шадиева С.У., Исабаева Д.Х. Особенности иммунных реакций при краснушной инфекции, их диагностическая и прогностическая информативность. *Евразийский союз ученых*. 2021;2-2(83):26-29.
 10. Хамидов Ш.А., Садиков И.И., Абдукаюмов А.М., Рихсиев А.З., Зайцева О.А., Хаитбаев А.Х. Использование иммуноферментного анализа при обнаружении антител к вирусному гепатиту С. *UNIVERSUM: технические науки*. 2024;5(122):5-9.