

Винахід належить до імунохімії, ветеринарної медицини та може бути використаний для проведення імунологічних досліджень, діагностичних аналізів інфікованості великої рогатої худоби на зараженість туберкульозом.

Відомий тест в Україні для виявлення зараженості туберкульозом базується на туберкуліновій пробі. В Росії створена тест-система для виявлення сумарних антитіл до *Mycobacterium tuberculosis* в сироватці крові людини [1], в якій використовуються антигени мікобактерій та нероксидазний кон'югат моноклональних антитіл до імуноглобулінів G, A та M людини. Зразки від пацієнтів перед здійсненням аналізу попередньо розводять 1:100 в буфері для розчинення сироваток і тільки потім використовують для аналізу. Це свідчить про недостатнє очищення антигенів з мікобактерій. Імуноферментної тест-системи для визначення протитуберкульозних антитіл у ВРХ в Україні не випускається.

В основу винаходу покладено завдання створити імуноферментну тест-систему на основі антигенів, виділених з очищених культур штамів *Mycobacterium bovis*. Антигени сорбують на поверхні полістиролових планшетів. В складі кон'югатів використовують моноклональні антитіла (анти IgM та IgG ВРХ), мічені ферментом. Ферментативну реакцію визначають за допомогою субстратного розчину з хромогеном. За одну постановку (2 години) можна проаналізувати 88 сироваток.

Приклад 1

Визначення антитіл проти антигенів мікобактерій збудників туберкульозу в сироватці крові ВРХ.

В кожну лунку стрипів планшету вносять по 80мкл розчину для розведення сироваток і по 20мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (контрольні лунки).

В три лунки вносять по 20мкл негативного контролю (К - негативна на туберкульоз сироватка крові людини), а в дві інші - по 20мкл позитивного контролю (К⁺ - позитивна туберкульозна сироватка крові людини).

Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37°C протягом 60хв.

Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання планшетів.

В лунки стрипів вносять по 100мкл розчину моноклонального антивидового кон'югату - анти IgM та IgG-ВРХ, міченого пероксидазою, та інкубують при 37 С у термостаті 45хв.

Після закінчення інкубації промивають лунки шість разів і вносять туди по 100мкл розчину проявника (субстратний розчин з хромогеном) та інкубують при 18-22°C у темряві 10-25хв.

Зупиняють кольорову реакцію, вносячи до всіх проб по 50мкл стоп-реагенту.

Не більше як через 1хв. після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках у двохвильовому режимі за допомогою спектрофотометра. Значення ОГ зразка прямо пропорційне кількості антитіл у сироватці.

Приклад

Визначення чутливості та специфічності пропонованої тест-системи.

Досліджували сироватки крові по (100 достеменно позитивних та 100 достеменно негативних сироваток). Усі сироватки досліджували у чотирьох повторностях за описаною методикою. З 100 позитивних сироваток показали наявність антитіл проти збудника туберкульозу 97, що становить 97% чутливості. З 100 негативних сироваток виявилися справді негативними 95 (специфічність - 95%) у пропонованій тест-системі. В порівнюваній тест-системі з Росії з 20 достеменно позитивних сироваток 2 були негативними. Чутливість становила 90%. Специфічність порівняльної тест-системи становила 95%.

Таким чином, пропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів збудника туберкульозу у сироватках ВРХ. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Джерела інформації

1. АТ-Туб-Бест-стрип. Выявление суммарных антител (IgG, IgM, IgA) *Mycobacterium tuberculosis* в сыворотке (плазме) крови человека. Диагностические тест-системы. Новосибирск, 2000г.

2. А.Т. Михайлов, В.Н. Сими́рский "Методы иммунохимического анализа в биологии развития". М. "Наука", 1981.