9. Подгаевская Е. Н. Онтогенез душицы обыкновенной – *Origanum vulgare* L. // Онтогенетический атлас лекарственных растений. Т. 3. Йошкар-Ола, 2002. С. 202–205.
10. Приказ Министерства по природопользованию и экологии РК от 30.12. 2016 №2488 «Об утверждении перечня объектов растительного и животного мира, занесенных в Красную книгу Республики Карелия» [Электронный ресурс] 2016. URL: http://www.gov.karelia.ru/Power/Committee/Forest/doc_1_26072017.docx (дата обращения : 10.07.2018).
11. Программа и методика биогеоэкологических исследований. М.: Наука, 1974. 403 с.

Карпова М.А.

Сравнение субстратов ТМБ и ОФД в тест-системе для выявления вируса возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) иммуноферментным методом

*ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»
(Россия, Москва)*

doi: 10.18411/lj-05-2020-05

idsp: ljjournal-05-2020-05

Аннотация

Инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых вызывает до 90% гибели молоди лососевых рыб, что несет существенный урон рыболовным хозяйствам. В результате проведенных исследований нами был подобран хромогенный субстрат для тест-системы на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения антигена IPNV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб.

Обеспечение такими наборами ветеринарных лабораторий позволит проводить массовые обследования рыб для установления диагноза, а также изучения распространения IPNV в рыболовческих хозяйствах.

Ключевые слова: Инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых, IPNV, ИФА, хромогенный субстрат, ТМБ (тетраметилбензидин), ОФД (ортофенилендиамин).

Abstract

Infectious pancreatic necrosis of salmon causes up to 90% of the death of young salmon, which causes significant damage to fish farms. As a result of our research, we selected a chromogenic substrate for a test system based on a solid-phase "sandwich" version of ELISA for determining the IPNV antigen in infected cell cultures and in fish tissue homogenates.

Providing such kits of veterinary laboratories will allow conducting mass surveys of fish for diagnosis, as well as studying the spread of IPNV in fish farms.

Keyword: Infectious pancreatic necrosis of salmon, IPNV, ELISA, chromogenic substrate, TMB (tetramethylbenzidine), OPD (orthophenylenediamine).

Введение. Возбудитель инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) является одним из основных факторов потерь в аквакультуре [1, 2]. IPNV был выделен из важных, в хозяйственном отношении, видов лососевых рыб, таких как форель, лосось, сиг и хариус, а также из многих других видов рыб, включая сельдь, камбалу, палтус, треску, сайту, угря, окуня, щуку, окуня, карпа, цихлид и миногу. Поскольку аквакультура атлантического лосося резко расширилась, то заболевание распространилось во всем мире. [3]. В настоящее время IPN экономически важная болезнь в производстве лосося [4].

Следовательно, своевременная и быстрая диагностика IPN является актуальной проблемой промышленного рыбоводства. Современные аналитические методы в диагностике различных заболеваний позволяют повысить эффективность профилактики и лечения. В последнее время для диагностики различных заболеваний все шире используют иммуноферментные тест-системы. Во многих клинических лабораториях, санитарно-эпидемиологических станциях, ветеринарных учреждениях успешно используют иммуноферментный анализ (ИФА) [5]. Он становится повседневным методом обнаружения специфических антигенов и антител в биологических жидкостях и гомогенатах тканей. Сегодня ИФА все шире используется благодаря ряду преимуществ. К ним относятся: высокая специфичность, чувствительность и воспроизводимость получаемых результатов, достаточность для анализа минимальных объемов исследуемых образцов, доступность и стабильность реагентов, простоту и быстроту проведения анализа, инструментальный учет результатов реакции и автоматизацию почти всех этапов ИФА, возможность проведения массовых анализов и, не в последнюю очередь, относительно невысокая стоимость диагностических наборов.

Суть метода заключается в соединении компонентов реакции антиген – антитело с измеряемой ферментной меткой. Антиген или антитело, вступающие в реакцию, метятся ферментом. По превращению субстрата под действием фермента можно судить о количестве вступившего во взаимодействие компонента реакции антиген – антитело. Фермент в данном случае служит маркером иммунной реакции и позволяет наблюдать ее визуально или инструментально. Необходимо подобрать такой фермент, который длительно сохраняет свою каталитическую активность, не теряет ее при связывании с антигеном или антителом, и обладает высокой специфичностью по отношению к субстрату.

Для выявления активности фермента в комплексе антиген-антитело с целью визуального и инструментального учета реакции используют хромогенные субстраты, растворы которых, изначально бесцветные, в процессе ферментативной реакции приобретают окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству фермента.

Результат реакции при образовании окрашенного продукта определяют визуально или с помощью спектрофотометра, измеряющего поглощение света с определенной длиной волны.

Целью данного исследования является подбор субстрата для проведения иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Антитела, сенсibilизированные на планшетах с разведением 20мкг/мл. Вирусоспецифические антитела против IPNV штамм N07-1, полученные в нашей лаборатории по разработанной ранее схеме из сывороток гипериммунизированных кроликов [6,7].

Иммунопероксидазный конъюгат к IPNV, с рабочим разведением 1:16000. Был получен с помощью оптимизированной методики M.B. Wilson и P.K. Nakane [8,9].

Антиген. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген IPNV штамм N07-1, выращенный на культуре клеток EPC и OMG [10].

ТМБ (тетраметилбензидин).

ОФД (ортофенилендиамин).

Результаты и обсуждение

Индикатором иммунопероксидазной реакции является способность ферментов вызывать цветные реакции при действии на соответствующий субстрат. Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высоко специфична.

Основные требования к субстрату:

- обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в конъюгате;

- образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат;
- субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

В таблице 1 приведены основные субстраты, используемые с ферментом пероксидаза хрена.

Таблица 1.

Субстраты, используемые при проведении ИФА с пероксидазой хрена.

Субстрат	Хромофор	Буфер
Перекись водорода (0,004%)	Ортофенилендиамин (ОФД).	Фосфатноцитратный, pH 5.0
Перекись водорода (0,004%)	Тетраметилбензидин (ТМБ)	Ацетатный буфер, 0.1 М, pH 5.6
Перекись водорода (0,002%)	2,2'-Azino diethylbenzothiazoline sulfonic acid (ABTS)	Фосфатноцитратный, pH 4.2
Перекись водорода (0,006%)	Диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната)	Фосфатный, 0.2 М, pH 6.8
Перекись водорода (0,002%)	Диаминобензидин	Tris или PBS, pH 7.4

В качестве субстратного реагента наиболее часто применяется тетраметилбензидин (ТМБ) и ортофенилендиамин (ОФД). Поэтому в нашей тест-системе было решено испытать эти два субстрата.

Схема постановки IPNV-ИФА-ВИЭВ:

1. Перед началом анализа промыть планшет
2. Внести по 100 мкл контролей и образцов
3. Инкубация один час при комнатной температуре (21–23°C)
4. Промыть пять раз планшет внести 100 мкл конъюгата в рабочем разведении
5. Инкубация один час при комнатной температуре (21–23°C)
6. Промыть пять раз планшет внести 100 мкл субстрата
7. Инкубация 20 мин при комнатной температуре (21–23°C)
8. Добавить 100 мкл стоп-реагента (2М серная кислота)
9. Измерить длину волны.

Реакцию проявляли 20 минут, и после остановки 2М серной кислотой, измеряли значения оптической плотности при длине волны 450 нм для ТМБ или 492 нм для ОФД. Учет реакции проводили на планшетном фотометре Multiskan FC с программным обеспечением SkanIt (Thermo Scientific).

Исследуя сравнение оптической плотности субстратов ТМБ и ОФД в качестве хромогена получили следующие результаты. Применение в качестве субстрата ОФД снижало чувствительность реакции, а использование ТМБ в течение двадцати минут дает цветную реакцию и не снижает чувствительность. Результаты отражены на рисунках 1 и 2.

Рисунок 1. Сравнение оптической плотности ТМБ и ОФД с разной концентрацией антител с отрицательным контролем

Рисунок 2. Сравнение оптической плотности ТМБ И ОФД с разной концентрацией антител с положительным контролем

Разработанная нами тест-система обладает рядом преимуществ перед чешским диагностическим набором TestLine. [11].

Во-первых, время постановки реакции сокращено, так как в качестве антигендетектирующие антитела используются те же, что и для сорбции планшета. В наборе сравнения используются дополнительные антивидовые антитела (свиные). По данной схеме время анализа увеличено на 15ч.

Во-вторых, в наборе IPNV-ИФА-ВИЭВ в качестве антигендетектирующих антител используются антитела кролика к вирусу IPN, что приводит к повышению точности реакции в то время в наборе TestLine IPNV Ag ELISA используются свиные антитела к иммуноглобулинам кролика.

Предложенная нами схема постановки реакции позволяет проводить анализ при комнатной температуре. При этом в коммерческом наборе сравнения необходимо задействовать термостатирование. Оптимизированы объемы вносимых компонентов, что снижает ошибку оператора. Использование малого количества компонентов при производстве диагностикума позволяет снизить себестоимость тем самым масштабировать изготовление.

1. Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России. // Ветеринария. 2011. № 8. С. 3-7.
2. Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Борисова М.Н., Дьяконов Л.П., Надточей Г.А., Шуляк А.Ф. Выделение вируса инфекционного некроза поджелудочной железы // Ветеринария. 2005. № 1. С. 31-32.
3. Skjesol A. Studies of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and immune evasion strategies. – University of Tromsø Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, 2009. – 64p.
4. OIE [Электронный ресурс] // Aquatic code 2006 [Официальный сайт]. URL: http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_chapitre_1.2.3.htm (дата обращения: 15.02.2020).
5. Иммуноферментный анализ [Электронный ресурс] // Иммунохимия [Официальный сайт]. URL: http://media.ls.urfu.ru/immunohimiya/immunohimiya/reakcii_antigen-antitelo_i_ih_prakticheskoe_primenenie/immunofermentnyi_analiz/ (дата обращения: 15.02.2020).
6. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Карпова М.А., Гулюкин М.И. Разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPN) иммуноферментным методом / Мат. Междунар. научно-практ. конф. «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», Щелково, 2012.
7. Завьялова Е.А., Карпова М.А., Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И. Экспериментальное обоснование схемы иммунизации кроликов для получения антисыворотки против вируса-возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) // Ветеринария и кормление. 2012. № 3. С. 42-44.
8. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е.Северина, Г.А.Соловьевой – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 508с.
9. Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс Справочник биохимика –М.: Изд-во «Мир», 1991. – 545с
10. Акиншина Г.Т., Белоконов В.С., Билько Н.М., Гулюкин М.И., Гальнбек Т.В., Дагданова А.В., Курило Л.Ф., Куш А.А., Савченкова И.П., Стегний Б.Т., Тугизов Ш.М., Завьялова Е.А. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Москва, 2009. (2-е издание, дополненное)
11. IPNV Ag ELISA [Электронный ресурс] // TestLine Clinical Diagnostics [Официальный сайт]. URL: <http://www.testlinecd.com/ipnv-ag-elisa> (дата обращения: 15.02.2020).