



Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб

**Оксана Бойко, Ольга Титюк, Ольга Панівська,
Богдан Поручинський, Петро Бойко**

Волинський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Адреса для листування: boiko.oksana@vnu.edu.ua

Отримано: 20.05.21; прийнято до друку: 15.06.21; опубліковано: 02.09.21

Резюме. У статті розглянуто тенденції з використання методу флуоресціюючих антитіл як методу лабораторної діагностики заразних захворювань та інструменту наукових досліджень. Детально висвітлено принципи і суть, основні недоліки та переваги усіх варіантів методу флуоресціюючих антитіл.

Проаналізовано основні причини, що негативно вплинули на застосування реакції імунофлуоресценції для діагностики інфекційних хвороб. Встановлено об'єктивні (були пов'язані з недостатнім забезпеченням люмінесцентними мікроскопами та імунофлуоресцентними діагностикумами) і суб'єктивні причини (небажання фахівців діагностичних і наукових установ впроваджувати метод флуоресціюючих антитіл як високо специфічний і об'єктивно точний метод лабораторної діагностики).

Наведено докази діагностичної ефективності методу флуоресціюючих антитіл за діагностики низки захворювань, де цей метод був розроблений або став еталонним, як у випадку діагностики сказу. Висвітлено певні перспективні наукові напрями МФА.

Подальші дослідження стосуватимуться розробки процедур валідації та верифікації методу флуоресціюючих антитіл.

Ключові слова: люмінесцентна мікроскопія, прямий та непрямий варіанти методу імунофлуоресціюючих антитіл, імунофлуоресцентна діагностика інфекційних хвороб.

Capability of the immunofluorescence method for the laboratory diagnostics of infectious diseases

Oksana Boiko, Olha Tytiuk, Olha Panivska, Bogdan Poruchynsky, Petro Boiko

Lesya Ukrainka Volyn National University, Lutsk, Ukraine

Correspondence: boiko.oksana@vnu.edu.ua

Abstract. The main trends in the use of fluorescent antibodies method as a method of laboratory diagnostics of infectious diseases of humans, animals and plants as well as a research tool associated with the fluorescence phenomenon are described in the article. The capability of immunofluorescence test in three variations both in diagnostic work

and in screening researches is described. The principles and essence, main drawbacks and advantages of each of fluorescent antibodies method in certain scientific and diagnostic works are covered in detail.

The main reasons that negatively influenced the use of immunofluorescence reactions for the diagnosis of infectious diseases in both human and veterinary medicine are analysed. They (reasons) could be divided into 1) objective that were initially connected with insufficient supply of fluorescent microscopes and immunofluorescent kits, 2) subjective reasons which arose later and consisted in the reluctance of specialists of diagnostic/scientific institutions to promote and implement the fluorescent antibodies method at their levels as a highly specific and intensively accurate method of laboratory diagnosis.

The preference was given instead to usage of chromogenic or selective nutrient media, i.e. the cultural method of isolation and identification of pathogens. This led to the collapse of already established high-tech production of commercial immunofluorescent diagnostic kits in numerous biofactories of the Soviet Union, including in Ukraine. In a consequence an unreasonably decreased level of usage of immunofluorescence test both in routine diagnostic work and in scientific researches was noticed.

The article provides evidences for the diagnostic effectiveness of the fluorescent antibodies method in the diagnosis of numerous diseases, for which this method was developed and used initially or became the etalon test in case of rabies diagnostics. Some research directions based on the use of fluorescent antibodies method in particular for the effective indication and identification of toxigenic, pathogenic and virulent species of microorganisms in various objects (organism, abiotic environment, cultures) are highlighted. It is shown that at the current stage of microscopy and microphotography development the results of the fluorescent antibodies method can be easily documented.

Our further researches will concern the development of validation and verification procedures of the fluorescent antibodies method.

Keywords: luminescent microscopy, direct and indirect immunofluorescent test, immunofluorescence diagnostic of infectious diseases.

ВСТУП

У 2020 році людство зустріло новий виклик, пов'язаний зі спалахами емерджентних пандемічних інфекційних хвороб. У зв'язку з цим актуальним стало питання швидкої та точної діагностики збудника для швидкого лікування хворих. Метою нашої роботи було здійснити огляд літературних джерел і, спираючись на наукові дані, «знайти» місце реакції імунофлуоресценції у сучасній науці загалом та діагностиці деяких інфекційних захворювань зокрема.

Ця робота є першою в циклі робіт на тему «Розробка та виготовлення компонентів, оцінка та валідація, апробація та застосування імунофлуоресцентного методу при діагностиці інфекційних хвороб».

Відомо, що в основі реакції флуоресценції лежить фізичне явище люмінесценції – надлишок світіння тіла над тепловим випромінюванням того ж тіла в даній спектральній області і при даній температурі, що не припиняється відразу ж після усунення причини, що його зумовила (Obodovskiy, 2019). Залежно від тривалості світіння розрізняють два види люмінесценції речовин: флуоресценція – короткочасне світіння, яке зникає майже відразу після припинення дії збуджувального світла (10^{-9} с); фосфоресценція – тривале світіння, тривалість якого становить від 10^{-9} секунд до

декількох годин. Ці два види люмінесценції відрізняються не лише тривалістю світіння, а й тим, що кванти світла випромінюються з різних енергетичних рівнів збудженої молекули (Kohli&Mittal, 2012).

ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Перші експерименти з флуоресцентним світлом були здійснені ще в XIX столітті першовідкривачами «світла» Г. Деві, Т. Едісоном, Н. Теслою, Ч. П. Штейнмецом та ін. (DiLaura, 2008).

У 1903 році Г. Зідентопфом та Р. Зігмонді сконструювали перший ультрамікроскоп (Бусьгин, 1975), а в 1908 р. К. Келлер і Г. Зідентопф – перший люмінесцентний мікроскоп «Келлер» (Keller, 1938).

На теренах колишнього Радянського Союзу школою академіка С. І. Вавілова були створені умови та зроблені розрахунки для конструювання люмінесцентних мікроскопів (Михайлов, 1968). Спочатку було налагоджене серійне виробництво люмінесцентних пристроїв ОІ–17 із люмінесцентним ліхтарем ОІ–18 (1951 р.). Згодом було сконструйовано перший вітчизняний люмінесцентний мікроскоп МЛ–1. Потім були моделі МЛ–2, МЛ–3 (прості та зручні в роботі, недорогі), «ЛЮМАМ» (складна і вартісна, проте комерційно вигідна).

У 1940–1950 роках Альбертом Х. Кунсом, Мелвіном Х. Капланом та іншими у Медичній Школі Гарварду (США) був запропонований новий оригінальний принцип люмінесцентної мікроскопії – метод імунофлуоресценції, або метод люмінесціюючих антитіл (Coons, et al., 1942; Coons&Kaplan, 1950). Цей метод заснований на використанні люмінесцентного варіанту реакції антиген-антитіло, тобто реакції, яка відбувається при зв'язуванні антигенів з відповідними специфічними антитілами, міченими флуоресцентними барвниками.

Імунологічна сутність методу флуоресціюючих (люмінесцентних) антитіл зводиться до однофазних серологічних реакцій, тому метод включає в себе лише першу – специфічну фазу, чим і відрізняється від інших імунологічних двофазних методів, що складаються із специфічної і неспецифічної фази (Бойко, 1982).

З додаванням в імунну сироватку флуорохрому (специфічного люмінофорного барвника) утворюється нове з'єднання – «люмінесцентне» антитіло, яке зберігає як властивості антитіла, так і властивості флуорохрому, тобто коли антитіло не втрачає імунологічної специфічності, а як флуорохром – здатності до світіння. Водночас у люмінесцентного або міченого антитіла з'являються нові, притаманні тільки йому властивості:

1) здатність зв'язуватися з відповідним антигеном (на зрізах тканин, в препаратах-відбитках із патологічного матеріалу, в препаратах-відбитках із культур тощо);

2) утворювати комплекс, що світиться при розгляданні в люмінесцентному мікроскопі (Михайлов, 1968).

ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ СЬОГОДНІ

Імунофлуоресценція виявилась надзвичайно перспективною в різних галузях біології і знайшла застосування в гістохімічних, імунологічних, онкологічних, мікробіологічних і вірусологічних дослідженнях. Метод люмінесцентних антитіл було випробувано для виявлення різних корпускулярних антигенів (найпростіші, бактерії, рикетсії, віруси) в чистих і змішаних культурах, у культурі тканин, у зрізах органів і тканин, у виділеннях хворих, патологічному матеріалі.

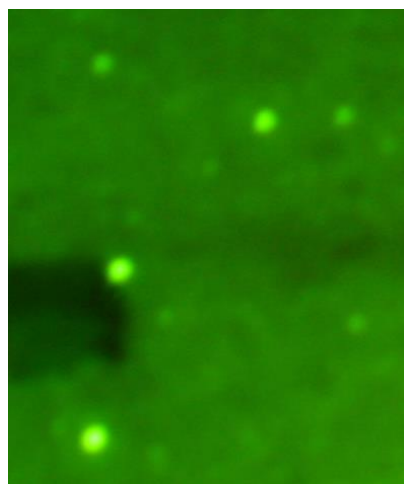
Метод люмінесцентних антитіл застосовується в трьох основних модифікаціях:

– прямий метод, який розробили Coons, A. & Kaplan, M. (1950);

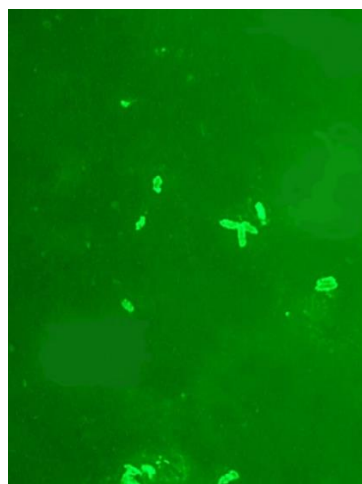
– непрямий метод, який розробили Weller, T. & Coons, A. (1954);

– непрямий метод із додаванням комплекменту, який описали Goldwasser, R. & Shepard, C. (1958).

Зміст прямого методу імунофлуоресценції полягає в нанесенні мічених флуорохромом антитіл на мікропрепарат із фіксованим на ньому антигеном з подальшою люмінесцентною мікроскопією. Препарат (антиген) може бути у вигляді мазка досліджуваної культури, взятої з поживного середовища, мазка-відбитка з інфікованих тканин або гістозрізу з органів чи тканин організму, моношару культури клітин тощо (рис. 1). Нанесені флуоресцентні антитіла витримують деякий час (близько 30 хвилин залежно від методу обробки) на поверхні препарату, після чого їх надлишок відмивають, препарат висушують і досліджують під люмінесцентним мікроскопом (Бойко, 2010, Бусол, 2010).



А



Б

Рис. 1. Позитивна РІФ (прямий варіант). Специфічне свічення включень вірусу сказу в нервовій тканині (А), і *Pseudomonas aeruginosa* в культурі (Б)

Прямий метод або прямий варіант МФА широко використовують для ідентифікації невідомого антигену за допомогою відомих флуоресцентних антитіл. Його ефективність визначається активністю та специфічністю антитіл. Досліджувати невідомі антитіла за допомогою відомого антигену теоретично можливо, але дуже незручно, бо тоді доведеться з кожної досліджуваної сироватки готувати флуоресцентні антитіла.

Прямий метод імунофлуоресценції ефективний у тих випадках, коли імунофлуоресцентний діагностикум, а власне так називають мічені флуорохромом специфічні глобуліни, містить достатньо високий рівень флуоресцентних антитіл, і при цьому вони не дають перехресних реакцій з гетерологічними антигенами (Бусыгин, 1975; Бойко, 2011).

Непрямий метод (варіант) МФА є двоступеневим. На першому етапі на мікропрепарат із фіксованим антигеном наносять гомологічні антитіла досліджуваної імунної сироватки (немічені), які зв'язуються з досліджуваним антигеном, утворюючи комплекс антиген-антитіло. На другому етапі, для виявлення утвореного комплексу антиген-антитіло, на препарат наносять антивидову мічену (флуоресцентну) сироватку, тобто мічені глобуліни тварини-продукта специфічних антитіл першого етапу. Отже, за позитивної реакції імунофлуоресценції на антигені, прикріпленому до предметного скельця, утворюється «двоповерхове» нашарування антитіл двох сироваток:

- специфічних антитіл досліджуваної сироватки;
- мічених антивидових антитіл до білків сироватки того виду тварин, від якого вона взята для дослідження.

Наприклад, якщо досліджують сироватку крові великої рогатої худоби (перший етап), то на другому етапі використовують мічені антибовісні глобуліни. Якщо на першому етапі була б овеча сироватка, то на другому етапі – мічені антибовісні глобуліни. Непрямий метод імунофлуоресценції є більш універсальним, бо за його допомогою можна не лише виявляти той чи інший антиген, але й установлювати в досліджуваній сироватці крові наявність і, більше того, рівень специфічних антитіл до збудника тієї чи іншої інфекційної хвороби (Мандигра та ін., 2011).

Непрямий метод МФА із зв'язуванням комплексу застосовують для індикації невідомого

антигену, якщо відоме антитіло, або ж для визначення наявності і навіть кількості антитіл, якщо відомий антиген. Суть цього методу ґрунтується на тому, що комплекс антиген-антитіло зв'язує комплемент, останній же виявляють специфічною до комплексу (антикомплементарною) флуоресцентною сироваткою.

Реакція непрямой імунофлуоресценції зі зв'язуванням комплексу (РНІФЗК) високочутлива і специфічна. Вона дозволяє застосовувати лише один вид мічених антитіл – специфічні флуоресцентні антитіла проти комплексу. При цьому немає видових обмежень досліджуваних сироваток, бо для зв'язування комплексу на препараті важливим є не вид тварин, від якого взята сироватка для дослідження, а наявність реакції антиген-антитіло. Якщо така наступила на досліджуваному препараті, то на наступному етапі до цього комплексу приєднується комплемент, а на останньому до комплексу антиген-антитіло-комплемент приєднуються мічені антикомплементарні глобуліни, і РНІФЗК буде позитивною (Бусол та ін., 2012). Основною умовою правильного ходу цієї реакції є надійна інактивація комплексу в досліджуваній сироватці.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВАРІАНТІВ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДУ

Кожен із трьох варіантів імунофлуоресцентного методу має свої переваги та свої недоліки.

Перший, тобто прямий варіант МФА, застосовується переважно в рутинній роботі мікробіологів-практиків (рис. 1). Його широко використовують для виявлення та ідентифікації патогенних мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибів, найпростіших). Він простий, позбавлений багатьох діагностичних помилок, що можуть спостерігатися під час використання непрямих модифікацій, які пов'язані з уведенням в реакцію додаткових білкових реагентів (Бойко та ін., 2010, Бусол та ін., 2010).

Непрямий варіант МФА знаходять своє застосування переважно при наукових дослідженнях і розробках, для виявлення і титрування специфічних антитіл, визначення серопревалентності тощо (Пундяк, 2012). З його допомогою можна чітко виявляти поверхневі структури бактеріальної клітини (джгутики, пілі, капсули), що не завжди вдається зробити, застосовуючи інші тинкторіальні методи (Бусол та ін., 2012) (рис. 2).

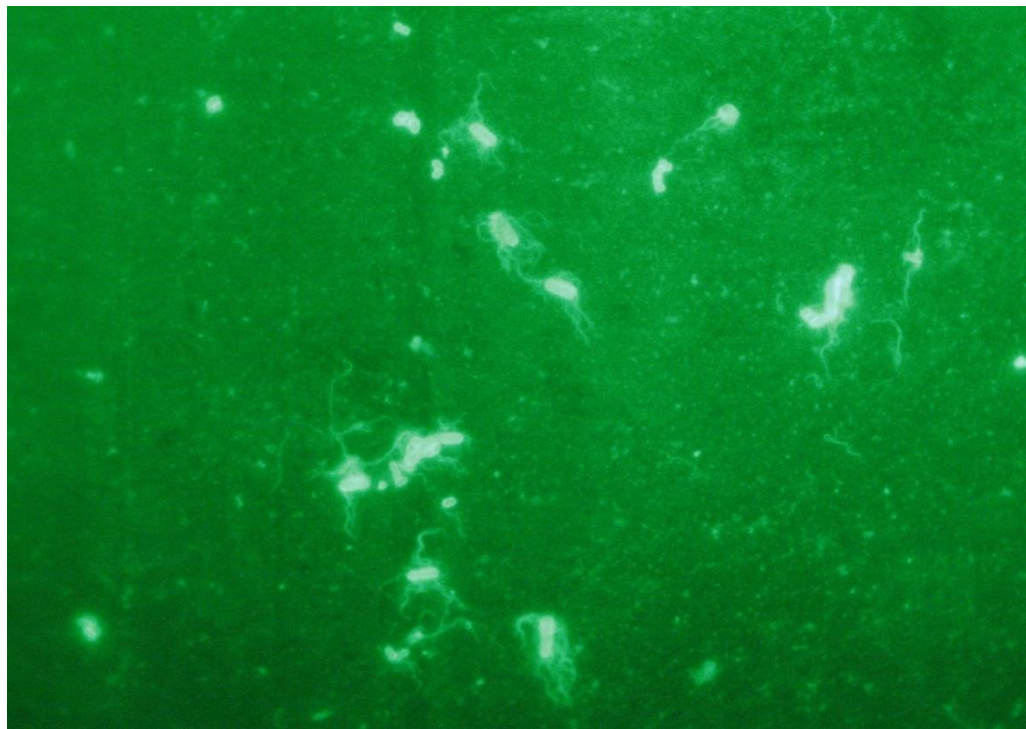


Рис. 2. *Вегетативні форми 16-годинної культури Clostridium chauvoei із джутиками (непрямий варіант МФА).*

Перевагою непрямого варіанту є те, що при його використанні відпадає необхідність мати великий набір різних специфічних флуоресціюючих антитіл, тому що він заснований на використанні мічених антивидових глобулінових антитіл, які виготовляються серійно.

До недоліків РІФ можна віднести:

- суб'єктивність (пов'язана з особистісною оцінкою головних критеріїв (характерна морфологія, розміри і розташування збудника в мазку; периферичний характер світіння об'єкта; колір флуоресценції; інтенсивність флуоресценції тощо) при мікроскопії. У зв'язку з цим суб'єктивний характер обліку реакції висуває особливі вимоги до кваліфікації персоналу, який проводить дослідження (Левина, 1977);

- наявність споріднених реакцій між близькими за антигенним складом мікроорганізмами, а також і між речовинами, що несумісні одна з одною (антиген Форсмана, речовини А і В групи крові тощо) (Бойко, 1982; Бойко, 2011);

- неспецифічна флуоресценція, в основі якої лежить або аутофлуоресценція антигену, або можлива адсорбція флуоресціюючої сироватки на різних елементах в препараті: лейкоцити, еритроцити, фібринові волокна, денатуровані білки (Бусьгин, 1975; Herman, 2020);

- потреба паралельно застосовувати інший (еталонний, арбітражний) метод дослідження.

Незважаючи на це, МФА в прямому варіанті є незамінним за діагностики сказу та низки інших вірусних інфекцій.

Популярність РІФ/РНІФ пояснюється економічністю та ефективністю, яка, в свою чергу, визначається специфічністю, об'єктивністю та швидкістю отримання результату.

Основними перевагами РІФ, що забезпечують їй широке застосування в діагностичній практиці та науковій роботі, є такі.

1. Універсальність: метод використовують у різних напрямках сучасної діагностики – мікробіології (вірусології, бактеріології, протозології, мікології), цитології, імунології, патоморфології, паразитології (Бойко, 2011; Herman, 2020; Brayton, & Colwell 1987, Zacccone et al., 1995).

2. Точність: метод дає достатньо точний морфологічний аналіз із чіткою роздільною здатністю, що поєднується з високою специфічністю імунологічних реакцій. З його допомогою можна виявляти як живі, так і мертві клітини (Brayton, & Colwell 1987; Herman, 2020).

3. Висока чутливість: за теоретичними підрахунками, використання імуно-флуоресценції забезпечує збільшення чутливості мікроскопічного, цито- і гістохімічних методів не менше, ніж у 1000 разів. Ця властивість, характерна всім флуоресцентно-цитохімічним методам, особливо істотна за умови визначення невеликих концентрацій речовин (Левина, 1977; Бусолта ін., 2012). Експериментально доведено високу чутливість усіх трьох варіантів МФА у дослідках із мікроорганізмами (Бойко, 1982; Бойко, 2011).

4. Наявність прямої кореляції між інтенсивністю флуоресценції і кількістю флуоресціюючої речовини. За низьких концентрацій визначальної речовини, з якими найчастіше має справу дослідник, інтенсивність флуоресценції прямо пропорційна кількості флуоресціюючої речовини, яка зв'язалася з досліджуваною речовиною. Варто відзначити, що при флуоресцентно-мікроскопічних вимірюваннях (мікрофлуориметрії) відсутня помилка, що може бути спричинена нерівномірним розподілом речовини у вимірюваному полі, помилка, яка дуже ускладнює мікроспектро-

фотометричні методи. Це означає, що для кількісного визначення флуоресціюючої речовини на мікроскопічному або цитологічному препараті досить зробити лише два вимірювання, після чого кількість флуорохрому визначається за різницею між інтенсивністю флуоресценції об'єкта та фону (Мейсель, 1972; Нерман, 2020).

5. Швидкість реакції. Постановка прямого варіанту МФА від моменту постановки до завершення дослідження становить 40 ± 10 хв (Бойко, 1982; Бойко, 2011).

6. Економічність: для постановки РІФ не потрібно дорого вартісного обладнання (за винятком люмінесцентного мікроскопа). За умови використання звичайних світлових мікроскопів типу МБІ-3, МБР-3 і т. д. для люмінесцентного аналізу використовують недороге додаткове обладнання, що й складаються з двох частин: освітлювача з лампою та її блоку живлення, опакілюмінатора і спеціальної насадки на мікроскоп, що дозволяє більш ефективно освітити препарат променями, які викликають люмінесценцію (Бойко та ін., 2010).

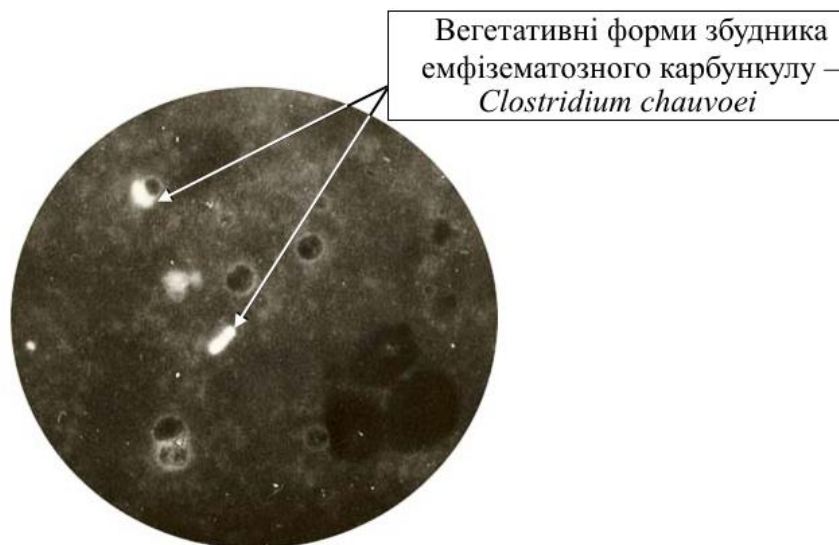


Рис. 3. Виявлення збудника емфізематозного карбункулу у мазку-відбитку із поверхні печінки (прямий варіант МФА)

Застосування цього методу в рутинній лабораторній практиці дало можливість спеціалістам лабораторії протягом 40 хвилин від часу доставки матеріалу поставити остаточний діагноз на емфізематозний карбункул (рис. 3). Вжиті своєчасно лікувально-профілактичні заходи в господарстві, де одночасно захворіло понад сто голів великої рогатої худоби на цю смертельну недугу, врятували всіх тварин, які захворіли, і

тих, які могли захворіти, завдяки швидкому й точному діагнозу, що був поставлений із допомогою прямого варіанту МФА (Бойко, 1982).

На етапі підйому зацікавленості діагностичними можливостями імунофлуоресцентного методу було отримано низку успішних наукових робіт, що стосувалися диференціації токсигенних штамів грибів від нетоксигенних (Михайлов,

1968), типізації токсигенних клостридій за типом токсину з допомогою цього методу.

ПРИЧИНИ НЕПОПУЛЯРНОСТІ МФА

Незважаючи на те, що переваги МФА були очевидними, він як метод діагностики не набув широко застосування. Спершу слід відзначити той факт, що більшість діагностичних лабораторій не мали змоги придбати дорогу модель люмінесцентного мікроскопа «ЛЮМАМ», а ті, хто й придбав ці мікроскопи, через складність використання почали їх уникати. З іншого боку, недостатнє на перших порах забезпечення імунофлуоресцентними діагностикумами було другою об'єктивною причиною низької популярності МФА як методу лабораторної діагностики.

Суб'єктивні причини низького застосування РІФ в діагностиці полягали в небажанні фахівців провідних методичних центрів і наукових установ пропагувати та впроваджувати метод флуоресціюючих антитіл як метод лабораторної діагностики. Перевагу віддали хроматогенним диференційно-діагностичним та селективним поживним середовищам, які на той час почали широко впроваджувати в діагностичну практику, тобто культуральному методу виділення та ідентифікації збудників бактеріальних та грибкових інфекцій. Це, в свою чергу, призвело до згортання щойно започаткованої імунофлуоресцентної діагностики в лабораторіях, що призвело до згортання вже налагодженого високотехнологічного виробництва комерційних імунофлуоресцентних діагностикумів на багатьох біофабриках колишнього Радянського Союзу і в тому числі в Україні, що стало на сьогодні об'єктивною причиною такого низького використання реакції імунофлуоресценції як у рутинній діагностичній роботі, так і в наукових розробках.

Імунофлуоресцентний метод залишився на узбіччі прогресу лабораторної діагностики, а запит на імунофлуоресцентні діагностикуми звівся нанівець (Бусол та ін., 2012).

Серійне виготовлення імунофлуоресцентних діагностикумів для прямої реакції імунофлуоресценції з метою індикації та ідентифікації збудників особливо небезпечних інфекційних захворювань, зокрема сибірки, туляремії, чуми, бруцельозу, було налагоджене на НВП Інституту епідеміології і мікробіології імені М. Ф. Гамалеї (Москва, РФ) та низці інших біологічних фабрик. Згодом тут було налагоджене серійне

виготовлення високоякісних імунофлуоресцентних діагностикумів «Імуноглобуліни антивидові мічені» для непрямого варіанту РІФ. Тут виготовляли мічені ФІТЦ (флуоресцеїну ізотіоціанату) імуноглобуліни проти глобулінів сироватки крові людей, коней, великої рогатої худоби, овець, кролів, гвінейських свинок, курей, а також мічені ФІТЦ антикомплементарні глобуліни. Всі три варіанти РІФ були забезпечені відповідними імунофлуоресцентними діагностикумами.

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДУ СЬОГОДНІ

В Україні на сьогодні лише лабораторія вірусології Науково-Навчального центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків) випускає імунофлуоресцентні діагностикуми для діагностики сказу та інфекційного ринотрахеїту.

В останні десятиліття інтерес до люмінесцентної мікроскопії зріс. Значною мірою це пояснюється виробничою розробкою та активним застосуванням методів специфічної люмінесцентної мітки білкових, ензимних, тканинних, клітинних компонентів тощо, тобто розширенням області застосування методу (Chozinski et al., 2016; Zaccone et al., 1995).

На сьогодні ця вже «стара» імунологічна реакція отримала «друге життя» завдяки появі гібридомних технологій, що дозволяють отримувати моноклональні антитіла. Їх застосування дозволило значно підвищити чутливість та специфічність РІФ (Herman, 2020; Бусол, та ін., 2012).

Важливим аспектом імунофлуоресцентного аналізу є здатність виявляти на поверхні бактеріальних клітин антигенні детермінанти, які віддзеркалюють певні властивості (біохімічні, токсигенні, типоспецифічні) того чи іншого мікроорганізму. Експрес-виявлення таких поверхневих маркерів на мікробних клітинах у мікропрепаратах із нативного біоматеріалу (секрети, виділення, біоптати тощо) дає лабораторному працівнику чи досліднику об'єктивний інформаційний матеріал для побудови схеми подальших досліджень, а в діагностичних лабораторіях може стати експрес-методом діагностики того чи іншого інфекційного захворювання, як це, наприклад, ми маємо за лабораторної діагностики сказу. Треба відзначити, що включення вірусу сказу в клітинах головного мозку уражених

тварин не мають сталої морфологічної структури – вони дифузно розсіяні по всій нервовій тканині головного мозку у вигляді дрібних накопичень, які звичайною світловою мікроскопією виявити неможливо (за винятком так званих тілець Бабеша-Негрі, що локалізуються в амонових рогах довгастого мозку). Завдяки високій чутливості антирабічних імунофлуоресцентних діагностикумів та майстерності лікарів-вірусологів МФА став найефективнішим методом за діагностики сказу.

Сьогодні в цій реакції використовуються як поліклональні сироватки, так і моноклональні антитіла, мічені флуоресцеїну ізотіоціанатом (ФІТЦ).

Проте в діагностиках низки інших інфекційних захворювань, збудниками яких є мікроби, МФА не знайшов такого широкого й безальтернативного застосування як за діагностики сказу. Причини такого становища були детально розглянуті в роботах В. О. Бусола та ін. (2012).

На даному етапі лабораторної діагностики заразних захворювань, коли рутинні діагностичні установи оснащені першокласними мікроскопами з люмінесцентними приставками, МФА як швидкий, точний, недорогий і надійний метод повинен зайняти належне місце серед інших інструментальних методів діагностики.

У випадку валідованих методик досліджень із використанням МФА отриманий позитивний результат може бути остаточним, бо дозволяє візуально оцінити об'єкт дослідження і, у випадку позитивної РІФ, ідентифікувати цей мікроорганізм як патогенний чи як токсигенний, а у випадку негативної РІФ – як непатогенний чи нетоксигенний.

Тому вдосконалення методик індикації та ідентифікації патогенних (токсигенних, вірулентних) видів мікроорганізмів із використанням МФА в будь-якому, але найбажаніше в прямому варіанті, їх валідація до кожного конкретного патогена є дуже важливим напрямом наукових розробок на сучасному етапі лабораторної діагностики інфекційних захворювань у гуманній і ветеринарній медицині та в сільськогосподарській мікробіології.

ВИСНОВКИ

Отже, метод флуоресціюючих антитіл є необ'єктивно забутим методом лабораторної діагностики заразних захворювань людини,

тварин і рослин. Розробка імунофлуоресцентних діагностикумів для науковців та працівників діагностичних лабораторій є перспективним напрямком наукових розробок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Brayton, P. R.; Colwell, R.R. Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Microbiological Methods* 1987, 6, 309-314.
2. Chozinski, T.J.; Halpern, A. R.; Okawa, H.; Kim, H.-J.; Tremel, G. J.; Wong, R. O.; Vaughan, J. C. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nature Methods* 2016. 13, 485–488.
3. Coons, A.H.; Kaplan, M. Localisation of antigen in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Experiment. Medicine* 1950. 91(1), 1–12.
4. Coons, A.H.; Grech, H.; Jones, R.; Berliner, E. The demonstration of Pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *The Journal of Immunology* 1942. 45, 159–170.
5. DiLaura D. A Brief History of In the beginning, *Optics and Photonics News*. 2008. 19 (9), 22-28.
6. Kohli, R.; Mittal, K. L. Developments in surface contamination and cleaning detection, characterization, and analysis of contaminants. 2012, 179–213.
7. Goldwasser, R.A.; Shepard, C.C. Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures. *Jour. Immunol.* 1958. 122–131.
8. Herman, B. (2020). *Fluorescence Microscopy*, 2nd ed. Garland Science: London, 2020; 188p.
9. Keller, C. Vereinfachernachweis von tubercelbacillen im fluoreszenzlicht. *Münch. Med. Wschr.*, 1938, 52.
10. Obodovskiy, I. Radiation: fundamentals, applications, risks, and safety. Elsevier, 2019, 207-220.
11. Weller, T.H.; Coons, A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. - *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 1954, 86, 789.
12. Zaccone, R.; Crisafi, E.; Caruso, G. Evaluation of fecal pollution in coastal Italian waters by immunofluorescence. *Aquatic Microbial Ecology* 1995, 9, 79–85.
13. Бойко, О.П.; Бусола, В.О.; Мандигра, М.С.; Бойко, П.К.; Кучерявенко, Р.О.

Виготовлення діагностичного для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa*. ВЦНУБіП: Київ, 2010; 20.

14. Бойко, П. К.; Бусол, В. О.; Мандигра, М. С.; Коваленко, Л.В.; Бойко, О. П. Застосування імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби. *Методичні рекомендації Київ, НУБіП: Київ, 2010; 16.*

15. Бойко, О. П. Епізоотологія та діагностика псевдомонозної інфекції тварин і птиці: дисертація ...канд. вет. наук, спец. 16.00.03. Одеса: Одеський ДАУ, 2011; 117.

16. Бойко, П.К.Иммунофлуоресцентная индикация и идентификация возбудителя эмфизематозного карбункула: автореф. дис. ... канд. вет. наук, М.: МВА, 1982; 23.

17. Бусыгин, К. Ф. Люминесцентная диагностика инфекционных болезней животных. *Колос, 1975, 10–11.*

18. Бусол, В. О.; Мандигра, М. С.; Бойко, П. К.; Бойко, О. П.; Кучерявенко, Р.О. (2012) Імунофлуоресцентний метод в експрес-діагностиці інфекційних захворювань тварин. *ВМУ, 2012, 9, 26–30.*

19. Бусол, В. О.; Мандигра, М.С.; Бойко, П.К. Застосування імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці псевдомонозної інфекції тварин. *Київ: ВЦ НУБіП, 2009, 16 с.*

20. Левина, Е.Н. Иммунолюминесценция в медицине. *Медицина, 1977; 239 с.*

21. Люминесцирующие антитела (в изучении некоторых микроорганизмов): под ред. Мейселя М.Н. *Москва, 1972; 141 с.*

22. Мандигра, М. С.; Бойко, П. К.; Бойко, О.П., Кучерявенко, Р. О. Лабораторна діагностика псевдомонозної інфекції з допомогою методу флуоресціюючих антитіл. *Ветеринарна медицина 2011, 95, 115–119.*

23. Михайлов, И. Ф. Флюоресцирующие антитела и методы их применения. *Медицина, 1968, 188.*

24. Пундяк, Т. О. Ретроспективний серологічний скринінг сальмонельозу великої рогатої худоби у західних областях України: автореф. дис. ... канд. вет. наук, спец. 16.00.03 - Київ, 2015, 19.