

М.И. Богданова

ЗЕРТХАНАЛЫҚ ТЕСТ ЖҮЙЕЛЕРІ ҮШІН ҚОЙДЫҢ КАТАРАЛДЫ БЕЗГЕГІНЕ ҚАРСЫ ИММУНОГЛОБУЛИН АЛУ

Катаральды қой безгегіне ИФТ әдісін қою үшін иммуноглобулиндер әртүрлі әдістермен бөлініп, ең қолайлы әдісі анықталынды.

Кілт сөздер: катаральды қой безгегі, иммуноферментті талдау (ИФТ), диффузды преципитация реакциясы (ДПР)

M.I. Bogdanova

RECEIVING IMMUNOGLOBULIN TO THE VIRUS CATARRHAL FEVER SHEEP FOR LABORATORY TEST SYSTEMS

Developed various of methods for isolation of immunoglobulins with bluetongue, suitable for the production by ELISA

Key words: Catarrhal fever of sheep, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), reaction of a diffusive pretsipitation (RDP).

УДК 619:616-07/619.3

М.И. Богданова

РГП "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН Республики Казахстан

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИФА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ

Аннотация. Из антисыворотки к вирусу КЛЮ выделяли иммуноглобулины с использованием нескольких методов. На основе выделенного активного гамма-глобулина приготовлен вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат.

С применением приготовленных диагностических препаратов были проведены исследования по отработке ТФ-ИФА для обнаружения антигена вируса КЛЮ. В ходе, которых были отработанные оптимальные временные и температурные параметры постановки прямого варианта ИФА, подобраны буферные растворы и рабочие концентрации компонентов реакции, а также изучена чувствительность и специфичность полистироловых планшетов различных фирм-производителей.

С использованием полученных препаратов разработан метод ИФА, позволяющий выявлять группоспецифические антигены вируса блютанга в различных вируссодержащих материалах.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноглобулин, конъюгат.

Введение

Группа возбудителей блютанга (синий язык, катаральная лихорадка овец) входит в состав *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Блютанг по определению МЭБ, отнесен к заболеваниям списка А, а также вирус блютанга и еще два вируса рода *Orbivirus* – Чангиола и Орунго отнесены ко 2-ой группе патогенности для человека. В настоящее время известны 24 серотипа возбудителя блютанга, которые вызывают сходную клиническую картину у зараженных восприимчивых животных. К вирусу восприимчивы овцы, крупный рогатый скот, олени, ламы и другие виды диких жвачных животных [1].

Для диагностики катаральной лихорадки овец большое значение имеет серологический анализ. Наиболее простым в исполнении и легко воспроизводимым являются реакции диффузионной преципитации и связывания комплемента, но они малочувствительные, реакция нейтрализации является длительной, трудоемкой и требует для постановки культуры клеток.

Однако эти методы не позволяют проанализировать структурно-функциональную организацию возбудителя, что является причиной не всегда достоверных результатов исследований вновь выделенных изолятов. ТФ-ИФА в этом плане обладает рядом существенных преимуществ - высокая чувствительность, специфичность и экспрессность метода, возможность автоматизации процессов реакции и универсальность иммуноферментных конъюгатов[7]. Применение ТФ-ИФА в ветеринарной практике для специфической диагностики и индикации многих вирусных инфекций животных, подтвердило его широкие возможности для обнаружения бактериальных и вирусных антигенов и антител к ним, токсинов, гормонов и других биологически активных веществ [2,3,4].

В связи с этим, целью данной работы являлось разработка ТФ-ИФА на основе диагностических препаратов (сыворотка, гамма-глобулин и конъюгат), для обнаружения антигена вируса КЛЮ.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали вирус катаральной лихорадки овец, эпизоотический штамм "RT/RIBSP-07/16" серотип 16, выделенный от мелкого рогатого скота в 2007 году в Республике Таджикистан.

Культуры клеток. Для культивирования вируса КЛЮ и получения вирусосодержащих суспензий с целью приготовления культурального специфического антигена была использована перевиваемая линия клеток почки зеленой мартышки (VERO), выращенная в 1,5 литровых матрасах стационарным методом.

Животные. В качестве доноров специфических антител применяли взрослых овец местных пород.

Антиген. Для иммунизации животных использовали концентрированный очищенный антиген, в качестве стимулятора иммуногенеза использовали сапонин.

Вирусспецифический гамма-глобулин выделяли спиртовым осаждением по методу Кона и сернокислым аммонием [5-6].

Вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат получали по методу Wilson и Nakane[7]. Для конъюгации вирусспецифических антител использовали пероксидазу хрена фирмы «Biozyme laboratories» (Ukraine) с чистотой RZ = 2,6-3,4 и удельной активностью по белку от 650 до 1400 Ед/мг.

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Постановку реакции проводили по общепринятой методике.

Результаты и обсуждение

Для разработки лабораторных тест-систем важную роль играет качество (специфичность и активность) диагностических препаратов, используемых в эксперименте. В связи с этим, нам необходимо было приготовить из вирусосодержащей суспензии концентрированный очищенный антиген для иммунизации животных, с целью получения специфической антисыворотки. В результате проведенных исследований был отработан оптимальный метод очистки и концентрирования антигена с помощью осаждения 10% сернокислым аммонием. Для получения антисыворотки к вирусу КЛЮ предварительно, за 1 месяц до гипериммунизации, животных иммунизировали вирусосодержащей суспензией КЛЮ с активностью – 6,5 lg ТЦД₅₀/см³, затем проводили трехкратное введение очищенного антигена в возрастающей дозе (80-900 мкг). Материал вводили внутримышечно в область предлопаточных лимфоузлов с интервалом между введениями в 2-3 недели в комплексе с сапонином (0,05%). Оценку активности и специфичности

полученной сыворотки проводили в РДП. Активность специфической сыворотки, полученной по данной схеме, составила в РДП – 1:32.

Из полученной антисыворотки выделяли вирусспецифические иммуноглобулины с использованием нескольких методов (спиртовым осаждением по Кону, сернокислым аммонием). Активность вирусспецифических иммуноглобулинов, исследовали на активность и специфичность в РДП. Результаты этих исследований представлены в таблице №1.

Таблица 1 – Оценка активности и специфичности гамма-глобулинов, выделенных спиртовым методом Кона и сернокислым аммонием

Метод выделения гамма-глобулинов	Активность в РДП	
	AgS	AgN
Спиртовое осаждение по Кону	1:32	-
Сернокислый аммоний	1:16	-

Примечания: 1. «AgS» – антиген специфический. 2. «AgN» – антиген нормальный.

3. «-» – отрицательный результат.

Представленные в таблице №1 данные свидетельствуют о том, что наиболее активные гамма-глобулины выделены с помощью спиртового осаждения по методу Кона, активность которых составила в РДП – 1:32.

На основе выделенного гамма-глобулина приготовлен вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат. Рабочая активность приготовленного конъюгата в ИФА составила – 1:50.

С применением приготовленных диагностических препаратов (гамма-глобулин, конъюгат, антигены нормальные и специфические) были проведены исследования по отработке ТФ-ИФА для обнаружения антигена вируса КЛЮ. В ходе, которых были отработанные оптимальные временные и температурные параметры постановки прямого варианта ИФА, подобраны буферные растворы и рабочие концентрации компонентов реакции, а также изучена чувствительность и специфичность полистироловых планшетов различных фирм-производителей.

Отработанный вариант ИФА включает сенсibilизацию лунок планшетов вирусспецифическим иммуноглобулином, взятым в рабочей концентрации, в течение 16-18 ч при 4°C в 0,01 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) с pH - 9,6. Затем следует трёхкратная отмывка лунок планшета 0,01 М фосфатно-буферным солевым раствором (ФСБ) с добавлением 0,1% твина-80 (ФБСТ). Внесение контрольных и испытуемых проб антигенов. Инкубация антигенов с лунками планшета в течение 4 ч при 37°C или 18 ч при 4°C. Пятикратная отмывка и внесение конъюгата в рабочем разведении с добавлением 0,01% БСА. Выдерживание планшетов с конъюгатом в течение 1,5 ч при 37°C, пятикратная отмывка и добавление рабочего раствора субстрата АБТС. Так же установлено, что оптимальным режимом инкубации субстрата пероксидазы (АБТС) с конъюгатами для слабо положительных проб является 60 минут, оптическая плотность положительного контроля должна быть не ниже 0,2 оптической единицы, а отрицательного – не более 0,15. Все компоненты реакции вносятся по 100 мкл и разводятся в ФБСТ. Наивысшая активность антигена вируса КЛЮ достигнута при постановке ИФА, где в качестве твёрдой фазы использовались полистироловые планшеты зарубежных фирм из стран Финляндии, России, московского завода «Медполимер», Италии и США («Costar»), удовлетворительную активность показали полистироловые планшеты фирмы «Costar». Оценку эффективности, специфичности и чувствительности метода ИФА для обнаружения антигена вируса КЛЮ проводили, исследуя вируссодержащие суспензии и культуральные специфические антигены данного вируса, где определяли их титр и возможные перекрестные реакции с антигенами вирусов гетерологичных возбудителей. Результаты этих исследований представлены в таблице 2

Как видно из результатов данной таблицы, разработанный нами метод ТФ-ИФА обладает высокой специфичностью и чувствительностью, так как во всех положительных пробах выявлен антиген вируса КЛЮ в титре от 1:32 до 1:320. В то же время все нормальные антигены и антигены вирусов гетерологичных возбудителей показали отрицательные результаты в ИФА.

Таблица 2 – Оценка эффективности, специфичности и чувствительности метода ТФ-ИФА для обнаружения антигена вируса КЛЮ

№ п/п	Наименование проб	Результаты в ИФА
<i>Специфические культуральные антигены вируса КЛЮ</i>		
1	AgS КЛЮ, очищенный с помощью ПЭГ- 6000	1:128 - 1:256
2	AgS КЛЮ, очищенный с помощью сернокислого аммония	1:256 - 1:320
3	BCC КЛЮ, полученная на культуре клеток (VERO).	1:32 - 1:64
<i>Антигены вирусов гетерологичных возбудителей</i>		
4	AgS вируса ОО	-
5	AgS вируса ОК	-
6	AgS вируса КЭО	-
<i>Контроль (нормальные антигены)</i>		
7	20%-ная суспензия печени здоровой овцы	-
8	20%-ная суспензия легких здоровой овцы	-
9	20%-ная суспензия селезенки здоровой птицы	-
10	AgN культур. (VERO)	-

Примечания: 1. «-» - отрицательный результат. 2. «AgS» - антиген специфический. 3. «AgN» - антиген нормальный. 4. «ОО» - оспа овец. 5. «ОК» - оспа коз. 6. «КЭО» - контагиозная эктима овец.

Выводы

Таким образом, с использованием полученных препаратов разработан метод ИФА позволяющий выявлять группоспецифические антигены вируса блютанга в различных вирусосодержащих материалах.

Литература

1. Бакулов И.А., Котляров В.М. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных // Материалы межд. науч.-практ. конф. 16-18 апр. 2002 г., г. Покров 2002
2. Стрижаков А.А., Новикова М.Б., Стрижакова О.М. Гистохимический ИФА для обнаружения антигенов вируса блютанга // Материалы междунар. научно-практ. конф., ВНИИВВиМ, г. Покров, 1998г., С. 76.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа // Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. // М. Высшая школа. 1991. - С. 288.
4. Мамадалиев С.М., Матвеева В.М., Кошметов Ж.К. Применение метода ИФА для обнаружения антигена вируса чумы КРС. Материалы межд. научно-практ. конф., посв. 100-летию со дня рождения академика М.Н.Лушихина "Биотехнология в мире животных и растений" г. Бишкек. 2005 г. – Бишкек. 2005. С. 212-213.
5. Пономарева. Н.А., Нечаева А.С. «Гамма-глобулин» - Москва. - 1985г.
6. Ахмедов А.М. Белки сыворотки крови при инфекционных болезнях животных // М: «Колос». - 1968. - С. 31-36.
7. Wilson M.B., Nakane P.K. Resent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxides (HRPO) to antibodies // Biomedical press. -1978. - P. 215-244.

М.И. Богданова

КАТАРАЛДЫ ҚОЙ БЕЗГЕГІ ВИРУСЫНЫҢ АНТИГЕНІН АНЫҚТАУ ҮШІН ИФТ ӘДІСІН ЖАСАП ШЫҒАРУ

Белсенді және тәнді иммуноглобулиндер мен конъюгаттар дайындалында. Осы препараттардың негізінде қатаральді қой безгегін биосынамалардан баламалау үшін ИФТ әдісі жасалынып шығарылды.

Кілт сөздер: имуноферментті талдау (ИФТ), иммуноглобулин, конъюгат.

M.I. Bogdanova

DEVELOPMENT METHOD FOR DETECTION OF ANTIGEN ELISA BLUETONGUE VIRUS

Prepared active and specific immunoglobulins and kanyugat. With the use of these drugs developed a direct ELISA method for the diagnosis of bluetongue virus in biomaterials.

Keywords: enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunoglobulin, conjugate.

ӘОЖ 619.614.31.637.636

А.Ә. Жұмагелдиев, Н. Демешов, Қ.М. Ромашев

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

БӨДЕНЕ ЖҰМЫРТҚАСЫ ҚҰНДЫ ТАҒАМДЫҚ ӨНІМ

Аңдатпа. Мақалада бөдене жұмыртқасы мен тауық жұмыртқасының химиялық құрамы, аминқышқылдары, дәрумендері мен макро-микроэлементтерінің мөлшері салыстырыла отырып зерттелді.

Кілт сөздер: бөдене, май, ақзат, аминқышқылы.

Кіріспе

Еліміздің әлеуметтік экономикалық дамуының басты стратегиялық мақсаты – халықты қауіпсіз азық-түлік өнімдерімен қамтамасыз ету.

Аграрлық кешеннің дамуы – елдің азық-түлік қауіпсіздігін, халық шаруашылығының көптеген салаларын шикізатпен қамтамасыз етуді, өндіріс тиімділігін, көлемін арттыру, халықты жұмыспен қамту сияқты оң нәтижелерге қол жеткізеді. Инновациялық дамудың негізінде ғылымды өндіріспен ұштастыру арқылы технологиялық кеңістік қалыптасыру өзекті мәселеле болып табылады. Қазіргі кезде дүние жүзінде етке деген сұраныс күн санап арта түсуде. Ал, құнды ақзат көзі ретінде алынған жұмыртқа диеталық, құнды тағам ретінде дастархан мәзірінен көптеп табылуда. Бөдене кәсіби ауланатын құс, кейінгі кездері бұл құсты шаруа қожалықтарында көптеп өсіруде. Бөдене жұмыртқасы жөнінде жарнама көбеюде. Дүкен сөрелерінен бөдене еті мен жұмыртқаларын көптеп кездестіретін болдық. Бірақ, бөдене жұмыртқасын тағам ретінде пайдалану мүмкіндігі, сапасы, биологиялық, тағамдық құндылығы, тағамдық қауіпсіздігі туралы мәселелер өз шешімін тапқан жоқ. Сондықтан да, бөдене жұмыртқасының тағамдық құндылығын химиялық құрамы, аминқышқылдарының мөлшері, суда және майда еритін дәрумендері мен микро-макро элементтері тексеріліп, ветеринариялық санитариялық сараптаулар жүргізіп, қауіпсіздігін анықтау уақыт талабы десек қателеспеген болар едік.