

Bogdanova M.I, Matveyeva V.M, Stozkov B.M, Sugirbaeva G.D, Koshemetov Zh.K,
Sandybayev N.T, Nurabayev S.Sh, Nurpeisova A.S, Sultankulova K.T, Chervyakova O.V.

SELECTION OF PRIMER AND OPTIMIZATION OF METHOD OF PCR FOR AUTHENTICATION OF BRUCELLA ABORTUS

Аннотация. By means of the program Primer - BLAST is neat three pairs of primer for optimization of raising of PCR on authentication of Brucellaabortus. In the process of smoothing by means of the program BLAST the pair of species-specific primer of BrAf1 BrAr1 is chosen, that limited the area of DNA measuring 305п.н, because this pair of primer showed more sensible results in PCR. On the basis of these primer the terms of raising of PCR are optimized for differential diagnostics of causative agent of бруцеллеза of type of Brucellaabortus

Key words:PCR, DNA, brucella, test, amplifier

УДК 619:616-07/619.3

¹Богданова М.И, ²Нургазиев Р.З, ¹Кошеметов Ж.К, ¹Матвеева В.М,
¹Сугирбаева Г.Д, ³Нурпейсова А.С.

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности РГП
НИИПББ КН МОН РК. Жамбылская обл., Кордайский р-н, пгт Гвардейский

²Кыргызский Аграрный Университет, г. Бишкек

³Казахский Национальный Аграрный Университет, г. Алматы

РАЗРАБОТКА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ

Аннотация В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные условия постановки ИФА (температурные и временные режимы, а также буферные растворы). Было установлено, что применение отработанных нами оптимальных параметров постановки непрямого варианта ИФА, позволяет получать достоверные данные о наличие антител, обладающих специфичностью к полипептиду VP7 внутреннего капсида вируса КЛЮ, который является общим для всех серотипов возбудителя.

Ключевые слова: ИФА, антиген, вирус катаральной лихорадка овец, сыворотки крови, конъюгат, субстрат, активность, специфичность.

Введение

Одним из важных этапов для борьбы с инфекцией и предотвращения дальнейшего распространения вируса КЛЮ среди животных является своевременная диагностика данного возбудителя.

В лабораторной диагностике блютанга важное место занимают методы, основанные на обнаружении специфических к данному вирусу антител в сыворотке крови больных и переболевших животных.

Ретроспективную диагностику и серологический мониторинг КЛЮ ранее проводили, используя реакция связывания комплемента, реакция диффузионной преципитации, реакция нейтрализации, метод флуоресценции антител, реакцию радиального гемолиза и торможения гемагглютинации [1-3]. В указанных реакциях антигены вирусов группы КЛЮ, как и специфические антитела, перекрестно реагируют со специфическими

антителами и соответствующими антигенами близкородственных возбудителей групп эпизоотической геморрагической болезни оленей (ЭГБО), болезней Ибараки, Эбенанджи и Пальям [4, 5]. Однако эти методы не позволяют детально проанализировать структурно-функциональную организацию возбудителя, что является причиной не всегда достоверных результатов исследований, как при групповой диагностике, так и при типизации вновь выделенных изолятов [6].

Наряду с вышеуказанными тест-системами в настоящее время для диагностики КЛЮ многими исследователями, активно используется непрямой вариант ИФА, который отвечает всем основным требованиям, предъявляемым к средствам и методам лабораторной диагностики инфекционных болезней (высокая чувствительность, специфичность, достоверность и воспроизводимость результатов, стоимость исследований, универсальность и безопасность).

К достоинствам данного метода также относится возможность автоматизации процессов постановки реакции, возможность одновременного исследования большого количества проб, стандартизация учёта проб в полевых условиях и компьютерная обработка результатов.

Иммуноферментные наборы, предназначенные для серологической диагностики КЛЮ, выпускаются многими зарубежными фирмами, такими как "VMRD", "Veterinary Diagnostic Technology" и "Diagxotics" (США), а также "ID-VET" (Франция). Приобретения ИФА набора зарубежных фирм для потребителей Республики Казахстан ограничено, в связи с их высокой стоимостью [7].

Поэтому создаётся необходимость в разработке отечественных диагностических тест-систем на основе непрямого ИФА для своевременной постановки диагноза на вирус КЛЮ путем выявления видоспецифических антител в сыворотках крови переболевших животных.

Материалы и методы

- автоматические микропипетки на 1-5, 10-100, 20-200, 50-300 и 100-1000 мкл фирмы "Eppendorf" (Германия) и "Ленпипет" (Россия);
- холодильник бытовой NORD (Россия);
- низкотемпературный (минус 90°C) морозильник фирмы "DAIREI" (Германия);
- рН-метр Electrochemical analyser C931 фирмы "Consort" (Бельгия);
- аналитические весы AB104-S/FACT фирмы "Mettler Toledo" (Швейцария);
- фотометр марки «Мультикан».

Штаммы вирусов: В процессе проведения экспериментальных исследований был использован штамм вируса КЛЮ: "RT/RIBSP-07/16" серотип 16, выделенный от мелкого рогатого скота на территории Республики Таджикистан в 2007 году с биологической активностью 6,75 lg ТЦД₅₀/см³;

Специфический антиген вируса КЛЮ.

Исследуемые и контрольные сыворотки:

- специфическая сыворотка против штамма Хуросон-07/04" серотип 4 вируса КЛЮ;
- специфическая сыворотка против штамма "RT/RIBSP-07/16" серотип 16 вируса КЛЮ;
- сыворотки крови овец, привитых одно - и двукратно экспериментальной инаktivированной сорбированной и эмульгированной бивалентными вакцинами против вируса КЛЮ 4 и 16 серотипами;
- специфическая сыворотка против вируса оспы овец;
- специфическая сыворотка против вируса контагиозной эктимы овец;
- специфическая сыворотка против вируса чумы мелких жвачных животных;
- нормальные (контрольные) сыворотки крови, полученные от здоровых овец.

Постановка ИФА

Непрямой вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА). В работе использовали стандартный метод непрямого варианта ТФ-ИФА по Engvall и др. [8]. В качестве твердой фазы использовали плоскодонные 96-луночные полистироловые планшеты фирм: «Costar» (США). Учет результатов анализа осуществляли на фотометре марки Multiscan Plus фирмы «Labsystems» (Финляндия). В каждом опыте использовали контрольные нормальные и специфические сыворотки.

Выделение антивидовых антител

Выделение антивидовых (антиовечьих) кроличьих антител и оценка их активности. Выделение антител из антивидовых (антиовечьих) сывороток проводили с применением метода аффинной очистки кроличьих антител на иммуносорбенте (очищенные иммуноглобулины G овец, иммобилизованные глутаровым альдегидом) [9]. Оценка активности аффинно-очищенных антиовечьих кроличьих антител проводили в РДП.

Конъюгация антивидовых антител

Конъюгация антивидовых (антиовечьих) кроличьих антител с пероксидазой хрена. Конъюгацию антивидовых (антиовечьих) кроличьих антител с пероксидазой хрена осуществляли по методу Wilson M.B. и Nakane P.K. [10]. Для этого использовали пероксидазу хрена фирмы "Biozyme laboratories" (Великобритания) с чистотой R/Z = 2,6-3,4 и удельной активностью по белку от 650 до 1400 ед/мг.

Результаты и обсуждение

Определение оптимального разведения специфического культурального антигена вируса КЛЮ.

Оптимальное разведение специфического культурального антигена вируса КЛЮ (для сенсibilизации твердой фазы) определяли путем его шахматного титрования со специфической и нормальной сыворотками в непрямом варианте ИФА.

Антиген испытывали в разведениях от 1:25 до 1:3200. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение оптимального разведения специфического культурального антигена вируса КЛЮ в непрямом варианте ИФА

Разведения антигена	СН			СС								
	100	200	400	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
25	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
50	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
100	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
200	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–
400	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–
800	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1600	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3200	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Примечания												
1 «СН/СС» - нормальная/специфическая сыворотка												
2 «–/+»- отрицательный/положительный результат												

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что специфический культуральный антиген вируса КЛЮ дает положительную реакцию только со специфической сывороткой, при отрицательной реакции с нормальной сывороткой во всех испытанных разведениях.

Оптимальный титр культурального антигена, который позволяет выявить видоспецифические против вируса КЛЮ антитела в их предельной активности, составившей 1:12800, является 1:100 (5 мкг/мл). Исходя из этого, в дальнейшем для сенсibilизации твердой фазы использовали данное разведение специфического культурального антигена вируса КЛЮ.

В дальнейшем необходимо было определить оптимальное рабочее разведение антивидового конъюгата. Для определения рабочего разведения антивидового конъюгата его предварительно титровали в непрямом варианте ИФА со стандартными (специфической и нормальной) сыворотками. Предельным титром антивидового конъюгата считали его максимальное разведение, которое способно выявить антитела против вируса КЛЮ при отрицательном результате с нормальной сывороткой. Антивидовой конъюгат испытывали в разведениях от 1:50 до 1:6400. За оптимальное рабочее разведение антивидового конъюгата принимали его восьмикратный предельный титр. Результаты данных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Определение рабочего разведения антивидового иммунопероксидазного конъюгата в непрямом варианте ТФ-ИФА

Разведение антивидового конъюгата	СН			СС								
	100	200	400	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
50	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
200	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
400	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–
800	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–
1600	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
3200	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6400	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Примечания: 1 СН/СС - нормальная/специфическая сыворотка. 2 «–/+»- отрицательный/положительный результат.												

Из приведенных в таблице 2 данных видно, что предельный титр антивидового конъюгата в непрямом варианте ТФ-ИФА составил – 1:1600, отсюда его восьмикратное рабочее разведение составило – 1:200.

В дальнейшем для получения стабильных результатов в ИФА, нам необходимо было выбрать оптимальный буферный раствор для разбавления диагностических иммунореагентов (антигена и антивидового конъюгата), время и температурный режим их взаимодействия с твердой фазой при постановке ИФА. С этой целью для отработки температурно-временных условий при постановке ИФА испытаны следующие режимы:

- 1, 2 и 3 ч при $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$;
- 16-18 ч при $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$.

В качестве раствора для разбавления диагностических препаратов были испытаны:

- 0,1М раствор фосфатного буфера (ФБР), pH 7,2-7,4;
- 0,01М раствор фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,2-7,4;
- 0,15М раствор хлористого натрия (физиологический раствор), pH 7,2;
- 0,05М раствор карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ), pH 9,6.

- 0,01М раствор ФСБ, pH 7,2-7,4 с добавлением неионного детергента Tween-80 в конечной концентрации 0,05%;

- 0,15М раствор хлористого натрия (физиологический раствор), рН 7,2 с добавлением неионного детергента Tween-80 в конечной концентрации 0,05%;

- 0,01М раствор ФСБ, рН 7,2-7,4 с добавлением неионного детергента Tween-80 и казеина в конечных концентрациях 0,05 и 0,5% соответственно.

Исследованиями по оптимизации параметров постановки непрямого варианта ТФ-ИФА для выявления видоспецифических против вируса КЛЮ антител было показано, что наибольшей чувствительности данный метод достигает при следующих условиях постановки реакции:

1. Сенсибилизация твердой фазы специфическим культуральным антигеном вируса КЛЮ, взятым в рабочем разведении на 0,05М КББ, рН 9,6 в течение 2 ч при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ или 18 ч при $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$;

2. Блокировка активных сайтов сорбции полистирола 1%-ным БСА в течение 1 часа при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$;

3. Контакт испытуемых и контрольных (специфической и нормальной) сывороток с закрепленным на полистироле антигеном вируса КЛЮ в течение 2 ч при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$;

4. Взаимодействие антивидового конъюгата, взятого в рабочем разведении с комплексом "антиген+антитело" (испытуемая и контрольная сыворотка) в течение 50 мин при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, а затем хромогенного субстрата пероксидазы хрена (ABTS) с конъюгатом в течение 15-30 мин при комнатной температуре.

Учёт результатов реакции проводили визуально и автоматически по отношению оптической плотности (ОП) испытуемой сыворотки к таковой нормальной (контрольной) сыворотки, путем измерения содержимого лунок на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Результат считали положительным, если ОП₄₀₅ испытуемой сыворотки в 2 и более раз превышает таковую нормальной (контрольной) сыворотки, ОП₄₀₅ положительных проб должна быть не ниже 0,150.

Специфичность и чувствительность непрямого варианта ИФА, на основе приготовленных диагностических иммунореагентов (культуральный антиген вируса КЛЮ и антивидовой конъюгат) исследовали, используя сыворотки, специфические против данного вируса (от овец, привитых экспериментальными образцами инактивированных бивалентных вакцин против КЛЮ 4 и 16 серотипов); гетерологичные (оспы и контагиозной эктимы овец, чумы мелких жвачных) и нормальные (контрольные) сыворотки крови овец. Постановку реакции осуществляли, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Специфичность и чувствительность непрямого варианта ИФА при выявлении специфических антител к вирусу КЛЮ в различных сыворотках крови овец

№ п/п	Наименование исследуемых проб сывороток крови	Кол-во животных	Взятие сывороток крови после вакцинации, сут	Титр в непрямом ИФА
1	2	3	4	5
I	Гомологичные			
1	Сыворотки крови овец, привитых однократно эмульгированной инактивированной вакциной против блятанга 16 и 4 серотипов в комплексе с адьювантом Montanide ISA-71 VG	3	0	–
			7	1:200-1:400
			14	1:400-1:800
			21	1:800-1:1600
			28	1:1600-1:3200
2	Сыворотки крови овец, привитых однократно	3	0	–
			7	1:400-1:800

	сорбированной инактивированной вакциной против блютанга 4 и 16 серотипов в комплексе с ГОА+сапонин		14	1:400-1:800
			21	1:800-1:1600
			28	1:16001:3200
3	Сыворотки крови овец, привитых двукратно эмульгированной инактивированной вакциной против блютанга 16 и 4 серотипов в комплексе с адыювантом Montanide ISA-71 VG	3	0	–
			7	1:400-1:800
			14	1:3200-1:6400
			21	1:12800-1:25600
			28	1:25600-1:102400
4	Сыворотки крови овец, привитых двукратно сорбированной инактивированной вакциной против блютанга 4 и 16 серотипов в комплексе с ГОА+сапонин	3	0	–
			7	1:400-1:800
			14	1:1600-1:6400
			21	1:64001:12800
			28	1:12800-1:25600
II	Гетерологичные			
5	Специфические сыворотки против вирусам:	оспы овец	контагиозной эктимы	чумы мелких жвачных
		–	–	–
		–	–	–
		–	–	–
III	Нормальные (контрольные)			
6	Сыворотки крови здоровых овец	–		
7	Специфическая сыворотка против вируса КЛЮ	+		
Примечания 1 «0» - до вакцинации 2 «-» - отрицательный результат 3 «+» - отрицательный результат				

Из результатов таблицы видно, что культуральный антиген вируса КЛЮ в непрямом варианте ИФА положительно связывался только с гомологичными антителами при отрицательной реакции с гетерологичными и нормальными (контрольными) сыворотками, а также наблюдали отсутствие ложноположительных, либо сомнительных результатов. В сыворотках крови овец, привитых однократно экспериментальными образцами инактивированных бивалентных вакцин против КЛЮ 4 и 16 серотипов, специфические антитела выявляли в титрах от 1:200 до 1:3200.

При исследовании сывороток крови овец, привитых данными образцами бивалентных вакцин двукратно, титр специфических антител составил от 1:400 до 1:102400. При этом образцы сывороток, титр антител в которых составлял 1:400 и выше считали сероположительными, ниже данного разведения – серонегативными.

Выводы

1. Оптимизированы условия постановки непрямого варианта ИФА для выявления антител против вируса КЛЮ в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных.

2. Оптимизированный вариант ИФА показал специфичность и чувствительность при исследовании гомологичных и гетерологичных антител, кроме того отсутствовали ложноположительные, либо сомнительные результаты.

3. Установлено, что применение отработанных нами оптимальных параметров постановки непрямого варианта ИФА, позволяет получать достоверные данные о наличии антител, обладающих специфичностью к полипептиду VP7 внутреннего капсида вируса КЛЮ, который является общим для всех серотипов возбудителя. Применение данного иммуноферментного набора, в перспективе, будет способствовать углублению научных исследований по изучению риска распространения вируса КЛЮ.

Литература

1 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.

2 Jochim, M.M. Identification of BT and EHD viruses by immunofluorescence with monoclonal antibodies / M.M. Jochim, C.J. Suzzane // Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost; 26th Ann. Proc. - 1983. - P. 277-286.

3 Pearson, J.E. Protocol for the immunodiffusion tests for bluetongue / J.E. Pearson, M.M. Jochim // Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost; 22th Ann. Proc. - 1979. - P. 531-544.

4 Stott, J.L. Simple procedure for preparation of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus antigens for agar gel immunodiffusion / J.L. Stott, B.J. Osburn // J. Clinical. Microbiol. - 1983. - №18. - Vol.6. - P. 1310-1313.

5 Campbell, C.H. Antigenic relationship of Ibaraki, bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses / C.H. Campbell, T.L. Barber, M.M. Jochim // Vet. Microbiol. - 1978. - №3. - P. 15-22.

6 Hawkes, R.A. Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus / R.A. Hawkes, P.D. Kirkland, D.A. Sanders e.a. // J. Virol. Methods. - 2000. - Vol. 85(1-2). - P. 137-149.

7 Стрижаков, А.А. Сэндвич-метод твердофазного иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител для обнаружения антигенов вируса блютанга / А.А. Стрижаков, М.Б. Новикова, Б.Б. Куринов, А.В. Луницын // Сельскохозяйственная биология. - 2003. - №4. - С. 114-120.

8 Ванеева Л., Цветкова Н. Иммуноферментный метод, его настоящее и будущее // Иммунология. - 1980. - №2. - С. 13-19.

9 Фримель Г. Иммунологические методы. М: «Медицина». - 1987. - 472 стр.

10 Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the peroxidase method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies // Biomedical press. - 1978. - P. 215-244.

Богданова М.И., Нұрғазиев Р.З, Қошаметов Ж.Қ, Матвеева В.М.,
Сүгірбаева Г.Д, Нұрпейсова А.С

ҚОЙДЫҢ КАТАРАЛДЫ БЕЗГЕГІ ВИРУСЫ ТОБЫНА ТӘН АНТИДЕНЕЛЕРДІ АНЫҚТАУ ҮШІН ИФТ ӘДІСІНІҢ ЖАНАМА НҰСҚАСЫН ҚОЮДЫҢ ЖАҒДАЙЫН ЖАСАУ

Жүргізілген зерттеулер барысында ИФТ әдісін қоюдың ең қолайлы жағдайы (уақыттық және температуралық тәртібі, сонымен қатар буферлік ерітінділері) таңдалынып алынды. Бізбен жасалынған ИФТ әдісінің жанама нұсқасын қоюдың ең қолайлы параметрлері ҚКБ вирусының барлық серотиптеріне жалпы болып келетін

вирустың ішкі капсидіндегі VP7 полипептидіне тәнді антиденелерді табу үшін тиянақты оң нәтижелер беретіндігі дәлелденді.

Кілтті сөздер: ИФТ, антиген, қойдың қатаралды безгегінің вирусы, қан сарысуы, конъюгат, субстрат, белсенділік, тәнділік.

Bogdanova M.I, Nurgaziev R.Z, Koshemetov Zh.K, Matveeva V.M,
Sugirbaeva G.D, Nurpeysova A.S.

MINING OF STATEMENT OF INDIRECT ELISA TO IDENTIFY GROUPS OF SPECIFIC ANTIBODIES TO THE BLUETONGUE VIRUS

The studies were selected optimum setting ELISA (temperature and time regimes, as well as buffers). It has been found that the use of waste Center optimal parameters setting indirect ELISA embodiment, allows to obtain reliable data on the presence of antibodies having specificity for a polypeptide VP7 inner capsid BT, which is common to all serotypes.

Keywords: ELISA, antigen, bluetongue virus, serum, conjugate, substrate, activity, specificity.

УДК 543.272.82:612.392.7

Баткибекова М.Б., Наркозиева Г.А., Усубалиева А.М., Сагындыков У.З.

*Кыргызский государственный технический университет им. И. Раззакова, Бишкек,
Кыргызская Республика;
Кыргызско-Турецкий Университет «Манас», Бишкек, Кыргызская Республика;
Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой
промышленности, Алматы, Казахстан.*

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА В ЩАВЕЛЕ, САЛАТЕ, ЗЕЛЕНИ СЕЛЬДЕРЕЯ

В работе рассматривается содержание свинца в щавеле, салате, зелени сельдерея. Отбор проб для анализа был проведен в июле, августе, сентябре и октябре. Содержание свинца в исследованных овощах не превышает ПДК.

Ключевые слова: свинец, ПДК (предельно допустимая концентрация), овощи, щавель, салат, зелень сельдерея.

Как токсичный элемент свинец, привлек к себе всеобщее внимание в 60-е годы прошлого столетия, когда начались широкие исследования почв и растительности, вдоль дорог с интенсивным транспортом. В настоящее время концентрации свинца в окружающей среде выше, чем когда-либо в прошлом. Только с выхлопными газами автомобилей на земную поверхность поступает по разным оценкам 180-260 тыс. т свинца в год.

Концентрация свинца в атмосфере постоянно увеличивается, и существует определенный риск загрязнения атмосферным свинцом растительности у автомобильных дорог.