УДК 619:580.20/08-018

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

[1]Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности РГП НИИПББ КН МОН РК. Жамбылская обл., Кордайский р-н, пгт Гвардейский
[2]Кыргызский Аграрный Университет, г. Бишкек
[3]Казахский Национальный Аграрный Университет, г. Алматы

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация. В результате проведенных исследований был разработан метод ИФА для диагностики вируса чумы мелких жвачных животных. Разработанная тест-система обладает высокой специфичностью и чувствительностью.

Ключевые слова: иммуноглобулин, антитела, конъюгат, антиген, сыворотки крови

Введение

Чума мелких жвачных животных (чума МЖЖ) - la peste des petits ruminants - высококонтагиозное вирусное заболевание, характеризующееся некротическим стоматитом, диареей и бронхопневмонией. Возбудитель – РНК-содержащий вирус, относится к семейству Парамиксовирусов, роду Морбилливирус [1, 2].

В настоящее время для диагностики инфекционных болезней в лабораторных условиях и научных учреждений всё ещё часто используются серологические тесты, такие как РДП, РТГА, РСК, РНГА, МФА, ИФА. Среди них метод ИФА, который благодаря своей простоте и высокой чувствительности [3], зарекомендовал себя как эффективный и современный метод лабораторной диагностики вирусных инфекций сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птиц [4].

В связи с этим, *целью данной работы* являлась разработка отечественного метода ИФА, с использованием диагностических препаратов (сыворотка, иммуноглобулин и конъюгат), приготовленных на основе штамма «Кентау-7» вируса чумы мелких жвачных животных (ЧМЖЖ), выделенного на территории Республики Казахстан из очага эпизоотии.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали штамм «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ, выделенного от мелкого рогатого скота во время вспышки эпизоотии в июне 2003 года на территории Республики Казахстан.

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Постановку реакции проводили согласно наставлению.

Культуры клеток. Для культивирования штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ и получения вируссодержащих суспензий с целью приготовления специфического антигена была использована первично-трипсинизированная культура клеток почки ягненка (ПЯ), выращенная в 1,5 литровых матрасах стационарным методом. Заражение культуры клеток, а также выращивание вируса проводили по отработанным нами условиям.

Животные. В качестве доноров специфических антител применяли взрослых коз и овец в возрасте 9-12 мес.

Антиген. Для иммунизации животных использовали антиген, выделенный из концентрированного и очищенного штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ. В качестве стимулятора иммуногенеза использовали сапонин и гидроокись алюминия (ГОА).

Вирусспецифический иммуноглобулин против антигена вируса ЧМЖЖ выделяли спиртовым осаждением по методу Кона и с помощью сернокислого аммония [5, 6, 7].

Вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат получали по методу *Wilson* и *Nakane* [8]. 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. Приготовленные фракции вирусспецифического конъюгата подвергали сублимационному высушиванию с добавлением защитной среды, состоящей из сахарозы, агара и желатина.

Результаты и обсуждение

При оптимизации условий постановки лабораторных тест-систем важную роль играет качество (специфичность и активность) диагностических препаратов, используемых в эксперименте. В связи с этим, необходимо было приготовление антигена вируса ЧМЖЖ для иммунизации животных, с целью получения специфических антисывороток. В результате проведённых исследований был отработан оптимальный метод приготовления антигена из штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ с помощью термолизиса. Антисыворотки против данного антигена вируса получали на козах и овцах путём трёхкратного введения очищенного препарата антигена вируса в возрастающей дозе (80-900 мкг). Материал вводили внутримышечно в область предлопаточных лимфатических узлов с интервалом между введениями в 7-сут в комплексе с сапонином (0,05%) - 1 введение и ГОА (1%) - 2 и 3 введение. Оценку активности и специфичности полученных сывороток проводили в РДП. Активность специфических сывороток представлена в таблице №1.

Таблица 1 - Активность и специфичность специфических сывороток против вируса ЧМЖЖ в РДП

Исследуемые сыворотки	Контрольные антигены			
	АгС вируса ЧМЖЖ, сер. №17	АгС вируса ЧМЖЖ, сер. №18	АгС вируса ЧМЖЖ, сер. №3	АгН на культуре клеток ПЯ, сер. №1
Специфическая сыворотка крови коз против вируса ЧМЖЖ	1:32	1:32	1:16	-
Специфическая сыворотка крови овец против вируса ЧМЖЖ	1:16	1:32	1:16	-
Примечания 1 «АгС» – антиген специфический 2 «АгН» – антиген нормальный 3 «-» – отрицательный результат.				

Специфические сыворотки крови овец и коз, полученные против вируса ЧМЖЖ в РДП показали довольно высокие результаты, 1:16-1:32 (таблица 1). Одновременно сыворотки показали отрицательные результаты с антигеном нормальным, что указывает на их специфичность.

Для выделения иммуноглобулинов из специфических сывороток крови овец и коз в опыте были испытаны спиртовой метод Кона и метод осаждения сернокислым аммонием. Выделенные иммуноглобулины проверяли на активность и специфичность в РДП, результаты исследований представлены в таблице №2.

Таблица 2 - Оценка активности и специфичности иммуноглобулинов, выделенных спиртовым методом Кона и сернокислым аммонием

Наименование сывороток используемых для опыта	Метод выделения иммуноглобулинов	Активность выделенных иммуноглобулинов в РДП	
		АгС	АгН
Специфическая сыворотка коз	Спиртовый метод по Кону	1:32	-
	Осаждение сернокислым аммониям	1:16	-

Специфическая сыворотка овцы	Спиртовый метод по Кону	1:32	-
	Осаждение сернокислым аммониям	1:16	-
Примечания 1 «АгС» – антиген специфический 2 «АгН» – антиген нормальный 3 «-» – отрицательный результат.			

В результате установлено, что наиболее активные иммуноглобулины выделены по методу Кона, активность которых составила в РДП – 1:32 (таблица 2).

На основе выделенного иммуноглобулина был приготовлен вирусспецифический иммунопероксидазный конъюгат. Активность приготовленного вирусспецифического конъюгата в ИФА составила – 1:800 и соответственно рабочий титр – 1:100.

С применением приготовленных диагностических препаратов (иммуноглобулин, конъюгат, антигены нормальные и специфические) были проведены исследования по отработке ИФА для обнаружения специфического антигена вируса ЧМЖЖ в различных вируссодержащих препаратах, в ходе которых были испытаны различные температурно-временные условия контакта диагностических препаратов между собой (которые длились от 1 до 3 ч при 37°С и от 16 до 24 ч при 4°С), испытаны сенсибилизирующие дозы иммуноглобулинов и конъюгатов, а также подобраны солевые растворы для разведения диагностических препаратов при постановке ИФА (где испытывались фосфатно-солевой (ФСБ) и фосфатно-буферный растворы (ФБР) с pH 7,2-7,4, а также карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) с pH-9,6 различных молярностей). Данными исследованиями было показано, что наибольшей чувствительности ИФА достигает при следующих параметрах постановки реакции:

1. Сенсибилизация лунок полистироловых планшетов вирусспецифическим иммуноглобулином, взятым в рабочей концентрации, в течение 16 ч при температуре 4°С или 3,5 ч при 37ºС с дальнейшей обработкой лунок 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 60 мин при температуре 37°С.

2. Время контакта испытуемых и контрольных антигенов с гамма-глобулинами в течение 16 ч при температуре 4°С или 3ч при 37ºС.

3. Взаимодействие вирусспецифических конъюгатов с антигенами в течение 60 мин при температуре 37°С, а затем с субстратом в течение 30-60 мин при комнатной температуре.

4. Учет результатов реакции проводить на спектрофотометре при длине волны 405 нм (для АБТС).

5. Результат считать положительным, если оптическая плотность испытуемого антигена в 2 и более раз превышает оптическую плотность контрольного (нормального) антигена. Оптическая плотность положительных проб должна быть не ниже 0,15.

Следующий этап работы была проверка специфичности и чувствительности ИФА для обнаружения антигена вируса ЧМЖЖ. Специфичность и чувствительность ИФА исследовали, используя антиген специфический вируса ЧМЖЖ; гетерологичные антигены (вирусов оспы овец, катаральной лихорадки овец и контагиозной эктимы овец), нормальные (контрольные) антигены и биоматериалы от павших от вируса ЧМЖЖ животных и от здоровых животных. Постановку реакции осуществляли, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Чувствительность и специфичность ИФА при идентификации антигена вируса ЧМЖЖ

Испытуемые пробы	Результаты в ИФА
20% суспензия легких взятых от павшего козлёнка	1:64
20% суспензия печени взятой от павшего козлёнка	1:16
20% суспензия селезенки взятой от павшего козлёнка	1:8

20% суспензия брыжеечного лимфатического узла взятого от павшего козлёнка	1:32
20% суспензия кишечника взятого от павшего козлёнка	1:32
20% суспензия почки взятой от павшего козлёнка	1:8
20% суспензия предлопадочного лимфатического узла взятого от павшего козлёнка	1:32
Кровь взятая от павшего козлёнка	1:16
Вируссодержащая суспензия ЧМЖЖ №1	1:160
Вируссодержащая суспензия ЧМЖЖ №2	1:320
Вируссодержащая суспензия ЧМЖЖ №3	1:160
Антиген специфический вируса оспа овец	-
Антиген специфический вируса КЛО	-
Антиген специфический вируса КЭО	-
Антиген специфический вируса ЧМЖЖ серия 1	1:2560
Антиген специфический вируса ЧМЖЖ серия 2	1:5120
Антигены нормальные (культуральные, органо-тканевые)	-
Примечание: 1 «-» - отрицательный результат 2 «КЛО» - катаральная лихорадка овец 3 «КЭО» - контагиозная эктима овец 4 «ЧМЖЖ» - чума мелких жвачных животных.	

Разработанный нами сэндвич-метод ИФА обладает высокой специфичностью и чувствительностью (таблица 3), так как во всех испытанных гомогенных пробах выявлен специфический антиген данного вируса с активностью от 1:160 до 1:5120. В то же время все нормальные антигены и антигены вирусов гетерологичных возбудителей показали отрицательные результаты в ИФА. 20% суспензии, приготовленные из органов (легкие, кишечник, печень, селезёнка, брыжеечный и предлопаточные лимфатические узлы), взятых от павших животных от данной инфекций также показали положительные результаты в ИФА с активностью 1:8-64, что еще раз подтверждает специфичность и чувствительность разработанной тест-системы.

Выводы

1. Для оптимизаций условий постановки ИФА для диагностики ЧМЖЖ были приготовлены специфические и активные диагностические препараты (антиген, сыворотка, иммуноглобулин и конъюгат) на основе штамма «Кентау-7».

2. На основе диагностических препаратов были оптимизированы условия постановки ИФА для диагностики ЧМЖЖ.

3. Разработанный метод ИФА обладает высокой специфичностью и чувствительностью, применение данного метода в очаге эпизоотии для постановки диагноза даст возможность более оперативно осуществлять противоэпизоотические мероприятия, направленные на блокирование распространения инфекции.

Литература

1. Gibbs E.P., Taylor W.P., Lawman M.J.P., Bryant J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus. // *Intervirology II. pp. 268—274.*

2. Murthy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et. al. (1995). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. // *Arch. Virol. -Suppl. 10.*

5. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №12. - С. 9-15.

6. Труды Федерального центра охраны здоровья животных // ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»). - Т. 5. - Владимир: Изд. ООО «Транзит-ИКС». - 2007. – 456 с.
5. Фримель Г. Иммунологические методы. М: «Медицина». - 1987. - 472 с.
6. Пономарева. Н.А., Нечаева А.С. «Гамма-глобулин» - Москва. – 1985 г.
7. Ахмедов А.М. Белки сыворотки крови при инфекционных болезнях животных // М: «Колос». - 1968. - С. 31-36.
8. 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.

С.Ш. Нурабаев, Ж.К. Кошеметов, В.М. Матвеева, Р.З. Нургазиев,
А.С. Нурпейсова, М.И. Богданова, Г.Д. Сугирбаева

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАРДЫҢ ОБАСЫ ВИРУСЫН БАЛАУ ҮШІН ИММУНОФЕРМЕНТІН ТАЛДАУ ӘДІСІН ЖАСАП ШЫҒАРУ

Жүргізілген зерттеудердің нәтижесінде ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы (ҰККМО) вирусын балау үшін ИФТ әдісі жасап шығарылды. Жасап шығарылған ИФТ әдісі жоғары тәнділік пен сезімталдылық көрсетеді.
Кілт сөздер: иммуноглобулин, антидене, конъюгат, антиген, қан сарысуы.

Nurabayev S.Sh, Koshemetov Zh.K, Matveyeva V.M, Nurgaziev R.Z,
Nurpeisova A.S, Bogdanova M.I, Sugirbaeva G.D

DEVELOPMENT-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY DIAGNOSTIC PLAGUE OF SMALL RUMINANTS

The studies were developed ELISA for the diagnosis of plague of small ruminants. A test system has a high specificity and sensitivity
Keywords: immunoglobulin, antibodies, conjugate, antigen, serum.

ӘОЖ 619:616.981.48:49-097:636

Д.А. Сарыбаева, К.Б. Бияшев, Б.К. Бияшев, А.Р. Сансызбай, А.А. Жакупова

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

АУЫРҒАН, ӨЛГЕН ЖӘНЕ ДЕНІ САУ ЖАҢА ТУҒАН БҰЗАУЛАРДАН БӨЛІНГЕН ЭШЕРИХИЯ ӨСІНДІСІН ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Андатпа. Шаруашылықтан әкелінген өлген, клиникалық сау және ауру төлдердің ішегінен бөлініп алынған E.coli өсіндісінің морфологиялық, культуральді-биохимиялық, антигендік қасиеттері жалпыға ортақ микробиология әдістері бойынша зерттелініп, идентификацияланды.

Түйін сөздер: эшерихиоз, адгезивті антигендер, өсінді, идентификация, серологиялық топтар

Кіріспе

Эшерихиоз – басқа инфекциялық ауруларға қарағанда негізінен ертерек жаста пайда болады, қоздырушысы шартты-зардапты энтеротоксигенді ішек таяқшасы болып табылады, ол адгезивтілік қасиетке ие, жоғары температураға төзімсіз, энтеротоксин.