

**Нурабаев С.Ш.¹, Волгин Е.С.¹, Оразалиев Д.М.², Исмагамбетов Б.М.¹,
Кондибаева Ж.Б.¹, Оразымбетова Н.К.¹, Сапаргалиева Н.С.³,
Закарья К.Д.¹, Кошеметов Ж.К.¹**

¹РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК,
Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский, e-mail: sergazy-75@mail.ru

²Казахский национальный аграрный университет, Казахстан, г. Алматы

³Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ИФА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА А**

Путем концентрирования ПЭГ-6000 и очистки хлороформом штамма «Таласский» вируса ящура типа А приготовлены очищенные антигены, активность которых составила в РСК 1:32-1:64. Для получения диагностических сывороток антигены подвергались дополнительной очистке через 30% сахарозную подушку при 35000 об/мин в течение 2 часов. После очистки активность антигена составила 1:16-1:32. Используя очищенный антиген вируса ящура типа А, были получены антисыворотки на овцах, свиньях и кроликах, с активностью 1:8-1:64. Из антисывороток методом Кона выделен иммуноглобулин, активность которого в РДП составила 1:32, а концентрация белка в пределах от 41,84 мг/мл до 60,2 мг/мл.

Используя периодатный метод М.В.Уилсона, Р.К.Наканы на основе специфического свиного глобулина, приготовлен конъюгат для оптимизации условий постановки ИФА.

Приготовленные диагностические препараты использованы для оптимизации условий постановки ИФА для диагностики ящура типа А.

Оптимизированный вариант ИФА оказался чувствительным и эффективным при исследовании гетерогенных и гомогенных биоматериалов.

Ключевые слова: ящур типа А, иммуноферментный анализ, иммуноглобулин, иммунизация, антиген.

Nurabaev S.Sh.¹, Volgin E.S.¹, Orazaliev D.M.², Ismagambetov B.M.¹, Kondibaeva Zh.B.¹,
Orazymbetova N.K.¹, Sapargaliev N.S.³, Zakar'ya K.D.¹, Koshemetov Zh.K.¹

¹RSE "Research Institute for Biological Safety Problems" CS MES RK,
Kazakhstan, Zhambyl region, Korday district, Gvardeyskiy, e-mail: sergazy-75@mail.ru

²Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan, Almaty

³Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

**Optimization of the conditions of ELISA for the diagnosis
of FMD virus type A**

By concentration of PEG-6000 and purification with chloroform, strain "Talasskiy" of FMD virus type A is prepared with purified antigens, the activity of which was in CBR 1:32-1:64. For diagnostic sera antigens were subjected to additional purification after 30% sucrose cushion at 35,000 rpm for 2 hours. After purification, the antigen activity was 1:16-1:32. Using purified antigen of FMD virus type A antisera on sheep, pigs and rabbits with activity 1:8-1:64 were obtained. From antisera by Kohn isolated immunoglobulin, whose activity in the DPR was 1:32, and the protein concentration ranging from 41.84 mg/ml to 60.2 mg/ml.

Periodate using the method of M. B. Wilson, P. K. Nakane on the basis of specific porcine globulin conjugate prepared to optimize the conditions of production ELISA.

The prepared diagnostic preparations are used to optimize the conditions for the formulation of ELISA for the diagnosis of FMD type A.

The optimized version of ELISA proved to be sensitive and effective in the study of heterogeneous and homogeneous biomaterials.

Key words: FMD type A, immunoassay, immunoglobulin, immunization, antigen.

Нурабаев С.Ш.¹, Волгин Е.С.¹, Оразалиев Д.М.², Исмагамбетов Б.М.¹, Кондибаева Ж.Б.¹,
Оразымбетова Н.К.¹, Сапарғалиева Н.С.³, Закарья К.Д.¹, Кошеметов Ж.К.¹

¹ҚР БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты МЕК,
Қазақстан, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қалашығы, e-mail: sergazy-75@mail.ru

²Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Аусылдың А түрін баламалау үшін ИФТ қоюдың тиімді жағдайын жасау

Аусылдың А түрінің “Таласский” штамын ПЭГ-6000 қоюландырып және хлороформмен тазалау арқылы белсенділігі КБР 1:32-1:64 болатын таза антиген алынды. Диагностикалық қан сарысуын алу мақсатында антиген 30% сахароздық қабаттан 35000 айналым/мин 2 сағат ішінде қосымша тазалаудан өткізілді. Тазаланғаннан кейін антиген белсенділігі 1:16-1:32 құрады. Аусылдың А түрінің тазаланған антигенін пайдалана отырып қойдан, доңыздан, қояндардан сарысу алынды, белсенділігі 1:8-1:64 құрады. Қарсы сарысудан Кон әдісі арқылы иммуноглобулин бөлініп алынды, ДПР белсенділігі 1:32 құраса, ал алынған ақуыздардың қоюлылығы 41,84 мг/мл бастап 60,2 мг/мл дейін болды.

ИФТ әдісін қоюдың тиімді жағдайын жасау үшін доңыздың қан сарысуынан алынған тәнді иммуноглобулин негізінде периодаттық М.В. Wilson, Р.К. Nakane әдісімен конъюгат дайындалды.

Дайындалған диагностикалық препараттар аусылдың А түрін балау үшін ИФТ тиімді жағдайын қоюды жасап шығару кезінде пайдаланды.

Гетерогендік және гомогендік биоматериалдарды тексеру кезінде жасалынып шығарылған ИФТ варианты тиімді және сезімтал болды.

Түйін сөздер: аусылдың А түрі, иммуноферменттік талдау, иммуноглобулин, иммундеу, антиген.

Сокращения и обозначения

ИФА – иммуноферментный анализ; МЭБ – Международное эпизоотическое бюро; ФАО – Продовольственная и сельскохозяйственная организация; РСК – реакция связывания комплемента; БСА – бычий сывороточный альбумин; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РДП – реакция диффузионной преципитации; СПЭВ – перевиваемая линия культуры клеток почки свиней; ВНК-21 – перевиваемая линия культуры клеток почки хомяка; ГОА – гидроокись алюминия; ЧКРС – чума крупного рогатого скота; ПЯ – почка ягненка; ЧМЖЖ – чума мелких жвачных животных

Введение

Выбор быстрых и надежных диагностических методов выявления и идентификации вируса ящура является важным фактором программы эффективной борьбы с этим заболеванием. В настоящее время диагностика ящура выполняется в ведущих референс-лабораториях МЭБ и ФАО, таких как Всемирная ящурная референс-лаборатория в Пирбрайте, Сюррей, Великобритания и Плам-Айлендский центр болезней животных,

Гринпорт, Нью-Йорк, США, путем комбинированного использования серологических методов и методов выделения вируса. Эти методики требуют наличия специальной лаборатории и наличия приспособлений для отбора проб и транспортировки [1-4]. Также для диагностики ящура не потерял своей актуальности метод твердофазного ИФА, разработанный в 70-х годах прошлого века [5-11].

Основное преимущество твердофазного ИФА состоит в методической простоте проведения многостадийных и многокомпонентных иммунохимических реакций, а широкое применение ИФА объясняется его высокой чувствительностью и специфичностью [12-17].

При испытании метода ИФА для титрования ящурных антигенов было установлено, что этот метод эффективен как при обнаружении антигенов в вирусосодержащей культуральной суспензии, так и в патологических материалах животных. Чувствительность непрямого «сэндвич»-метода ИФА оказалась в 50-100 раз выше, чем метод РСК, а специфичность метода позволила применить его для дифференциации подтипов вируса ящура [18-21].

Поэтому, оптимизация условий постановки чувствительных вариантов ИФА на основе ак-

туальных для Республики Казахстан штаммов вируса ящура, позволяющих в короткие сроки обнаружить заболевание животных, остается актуальной задачей ветеринарной науки. Также ИФА по чувствительности является незаменимым инструментом для установления иммунологического статуса восприимчивых к ящуру животных.

Материалы и методы исследований

Вирусы. В работе использовали вирус ящура, тип А₂₂, штамм «Галасский» с титром инфекционности не менее 7,5 lg ЛД₅₀/см³.

Контрольно-испытываемые пробы. Лапинизированные вирусосодержащие суспензии вируса ящура типов А и О. Культуральные вирусосодержащие материалы вируса ящура типа А. Органо-тканевые вирусосодержащие суспензии типов А, О, С и Азия-1. 10-20%-ные нормальные органо-тканевые суспензии.

Растворы и их приготовление

При проведении исследований применяли следующие растворы:

Раствор для ИФА: к 1 дм³ физиологического раствора добавляли 1 см³ твина-80. Раствор применяли для разбавления компонентов и промывания плашек при постановке ИФА.

Наполнитель для ИФА: к раствору для ИФА добавляли БСА до концентрации 1%.

Раствор субстрата для ИФА: в 10 см³ 0,01 М раствора уксуснокислого натрия, рН 4,3-4,4, растворяли 2,2 мг АБТС и 0,1 см³ 1%-ной перекиси водорода.

Получение культурального антигена для серологических реакций

На первом этапе работы вирусосодержащую суспензию замораживали при минус 40°С, оттаивали и осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин. Суспензию инактивировали теплом при 58-60°С в течение 3-5 ч.

Концентрирование антигена проводили с использованием ПЭГ-6000 в концентрации 10%.

Для осаждения вирусного белка в инактивированную суспензию добавляли выбранные концентрации ПЭГ-6000 и оставляли при 4°С на 16 – 18 ч. Перед внесением ПЭГ в суспензию добавляли NaCl до конечной концентрации 0,2 М. Осадок собирали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин, ресуспендировали в физиологическом раствором (до 1/20 исходного объема).

Для очистки антигена использовали хлороформ в 10% конечной концентрации. Смесь су-

спензии с хлороформом перемешивали на гомогенизаторе в течение 5-7 мин при 8-11 тыс. об/мин. Для более полной очистки смесь суспензии с хлороформом обрабатывали ультразвуком интенсивностью 100 Вт/см³ в течение 30 сек. Затем смесь центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин.

Активность антигена в РСК составила 1:32 – 1:64.

Для получения антигена, предназначенного для гипериммунизации животных вирусосодержащую суспензию дополнительно очищали методом ультрацентрифугирования через 30% сахарозную подушку при 35000 об/мин в течение 2 ч. Осадок ресуспендировали в ЗФР до 1/200 исходного объема.

Активность полученного антигена в РСК составила 1:16 – 1:32.

Получение вирусспецифических сывороток

В нашем опыте антисыворотки к вирусу ящура типа А получали на кроликах, свиньях и овцах. Гипериммунизации животных антигенами вируса ящура между собой отличались подбором схем иммунизации, объемом и концентрацией вводимого очищенного антигена вируса ящура, сроками между введениями материалов и использованием различных адьювантов.

На свиньях и кроликах антисыворотки получали по двум схемам, а на овцах по одной схеме. В результате активность полученных от свиней антисывороток к вирусу ящура типа А в РСК составила 1:8 – 1:32, от кроликов – 1:32 – 1:64, овечьих – 1:32.

Получение вирусспецифических иммуноглобулинов

Иммуноглобулиновые фракции из антисывороток свиней, кроликов и овец к вирусу ящура типа А выделяли ступенчатым осаждением альбумина и иммунных глобулинов, различными концентрациями этилового спирта по методу Кона [22-24].

У полученных иммуноглобулинов определяли концентрацию белка ультрафиолетовым методом на спектрофотометре при длинах волн D₂₈₀ и D₂₆₀. В результате концентрация и активность иммуноглобулинов в РДП расположились в следующем порядке: из сывороток овец 42,64 мг/мл, 1:32, кролика – 41,84 мг/мл, 1:32 и свиньи – 60,2 мг/мл, 1:32.

Получение вирусспецифических иммунопероксидазных конъюгатов

Концентрация белка в иммуноглобулинах из свиных сывороток была выше, чем в овечьих и

кроличьих, поэтому их использовали для получения вирусспецифических конъюгатов.

Для получения конъюгатов использовали периодатный метод *M.B.Wilson, P.K.Nakane* [25].

Результаты исследований

С целью оптимизации условий постановки прямого «сэндвич»-варианта ИФА нами были проведены исследования по определению оптимальной концентрации специфического иммуноглобулина и рабочей дозы иммунопероксидазного конъюгата, а также влияние различных условий постановки ИФА на его чувствительность.

Определение оптимальной дозы для сенсibilизации специфических иммуноглобулинов осуществляли методом их шахматного титрования со специфическим ящурным антигеном типа А и буфером для ИФА в «сэндвич»-варианте ИФА. В качестве твердой фазы использовали полистироловые плоскодонные планшеты с 96 лунками. Для этого 96 луночную полистироловую плашку делили на две части и сенсibilизировали каждую половину иммуноглобулином в двукратном разведении начиная с 1:25. Затем к одной половине плашки добавляли буфер для ИФА, а к другой – специфический антиген в двукратных разведениях, начиная с 1:10. Для сенсibilизации планшетов были испытаны все варианты полученных иммуноглобулинов.

Для проверки определения рабочего титра вирусспецифических иммунопероксидазных конъюгатов ставили ИФА с использованием двукратных разведений конъюгатов, начиная с 1:25.

Результаты исследований по выбору оптимальной концентрации свиного иммуноглобулина для сенсibilизации планшетов с различными разведениями конъюгата представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка, предельным титром в ИФА для полученного свиного иммуноглобулина, является разведение 1:200. В дальнейшей работе для сенсibilизации лунок планшетов использовали двукратный оптимальный титр иммуноглобулина 1:100.

Вирусспецифический конъюгат также имеет активность в ИФА 1:200, таким образом, рабочее разведение конъюгата – 1:50 (1/4).

Результаты исследований по выбору оптимальной концентрации овечьего иммуноглобулина для сенсibilизации планшетов с различными разведениями конъюгата представлены на рисунке 2.

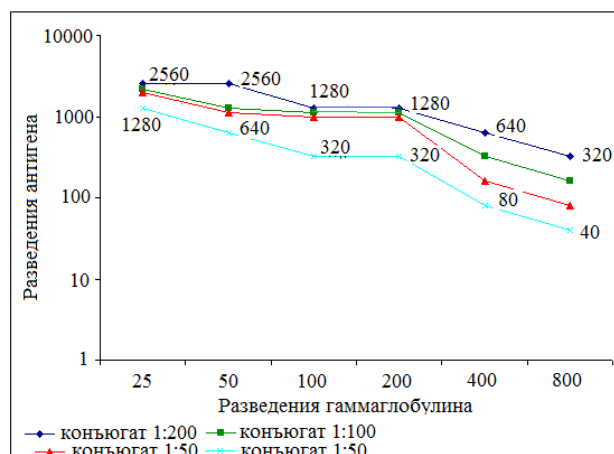


Рисунок 1 – Выбор оптимальных разведений свиного иммуноглобулина и конъюгата

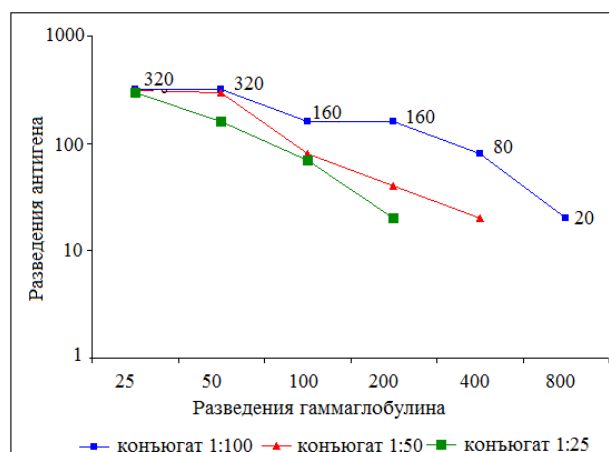


Рисунок 2 – Выбор оптимальных разведений овечьего иммуноглобулина и конъюгата

Как видно из рисунка активность овечьего иммуноглобулина гораздо ниже, чем свиного. В дальнейшей работе использовали рабочее разведение иммуноглобулина для сенсibilизации планшетов 1:50.

Рабочим разведением вирусспецифического конъюгата для постановки ИФА с использованием овечьего иммуноглобулина является 1:25.

Кроличий иммуноглобулин давал неспецифическое фоновое окрашивание до разведения 1:200, что объясняется, по-видимому, тем, что при получении сыворотки нами использовался недостаточно очищенный от балластных белков антиген вируса ящура типа А.

Перед внесением антигенов мы использовали инкубацию планшетов с 1% БСА в течение 1 часа при 37°C для устранения неспецифического

фонового связывания антигена с иммуноглобулином, но видимого улучшения результатов это нам не дало.

Результаты исследований представлены на рисунке 3.

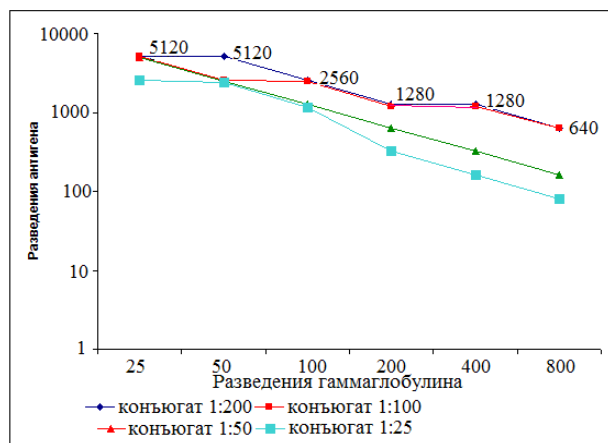


Рисунок 3 – Выбор оптимальных разведений кроличьего иммуноглобулина и конъюгата

Как видно из рисунка и, принимая во внимание неспецифичность, рабочим разведением в ИФА кроличьего иммуноглобулина является 1:200, вирусспецифического конъюгата 1:50.

Данные параметры совпадают с разведениями, используемыми при постановке ИФА со свиным иммуноглобулином, который не проявил в реакции неспецифических свойств, поэтому в дальнейшем использование кроличьего иммуноглобулина посчитали нецелесообразными.

Для того чтобы получить стабильные результаты в ИФА, необходимо было предварительно отработать оптимальные условия постановки этого метода, то есть выбрать оптимальные буферные растворы для разбавления компонентов реакции, время и температурный режим их взаимодействия с твердой фазой. Отработку оптимальных условий постановки «сэндвич»-варианта ИФА проводили поэтапно. На первом этапе отработывали оптимальные условия сенсibilизации твердой фазы специфическими иммуноглобулинами, взятыми в рабочей концентрации. Для этого сенсibilизированные плашки выдерживали в двух температурно-временных режимах:

1. Сенсibilизация плашек при 3 – 4°C.
2. Сенсibilизация плашек при 37 – 38°C.

Холодовой режим сенсibilизации проводили в течение 16-18 часов, при использовании теплового метода исследовали временные режимы сенсibilизации в течение 1, 2 и 3 – 4 часов.

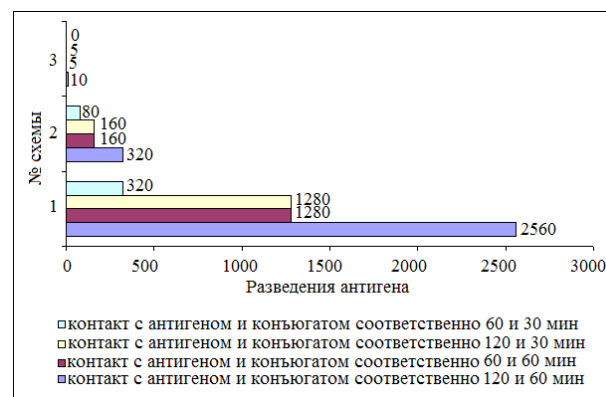
Также испытывали время контакта антигена и конъюгата с сенсibilизированными иммуноглобулинами. Специфический антиген, взятый в разведении 1:100 оставляли на контакте при температуре 37 – 38°C в течение 60 и 120 минут, а конъюгата в разведении 1:50 – в течение 30 и 60 минут. Результаты представлены на рисунках 4 и 5.

Оба метода (холодовой и тепловой) режима сенсibilизации оказались пригодными для обнаружения специфического антигена вируса ящура типа А. При этом оптимальное время тепловой сенсibilизации свиного иммуноглобулина составляет 3 ч.

Время контакта с антигеном и конъюгатом также влияло на качество реакции. Оптимальное время контакта с антигеном – 60 мин, контакт с конъюгатом – 30 мин.

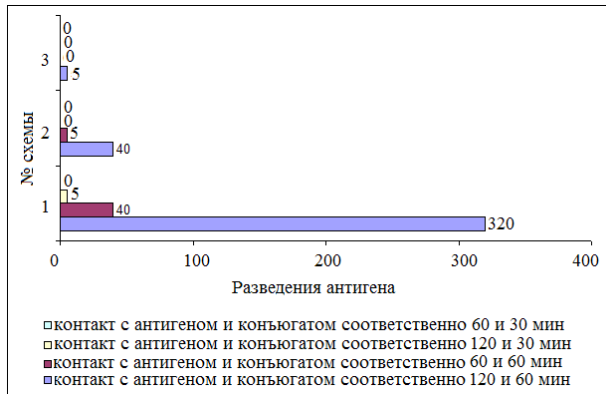
Как видно из рисунка 5 оптимальный температурно-временной режим сенсibilизации совпадает с таким же при использовании свиного иммуноглобулина и составляет при 3 – 4°C в течение 16 – 18 ч, а при 37 – 38°C в течение 3 ч.

Оптимальное время контакта с антигеном – 60 мин, контакт с конъюгатом – 30 мин.



1. Сенсibilизация при 3 – 4°C в течение 16 – 18 ч;
2. Сенсibilизация при 37 – 38°C в течение 3 ч;
3. Сенсibilизация при 37 – 38°C в течение 2 ч;
4. Сенсibilизация при 37 – 38°C в течение 1 ч.

Рисунок 4 – Результаты опытов постановки ИФА для обнаружения антигена вируса ящура типа А с использованием иммуноглобулина свиньи при различных температурно-временных режимах



Сенсибилизация при 3 – 4°С в течение 16 – 18 ч;
 Сенсибилизация при 37 – 38°С в течение 3 ч;
 3. Сенсибилизация при 37 – 38°С в течение 2 ч;
 4. Сенсибилизация при 37 – 38°С в течение 1 ч.

Рисунок 5 – Результаты опытов постановки ИФА для обнаружения антигена вируса ящура типа А с использованием овечьего иммуноглобулина при различных температурно-временных режимах

Из результатов, представленных в данном разделе можно заключить, что все полученные иммуноглобулины пригодны для постановки ИФА, однако предельный титр свиного иммуноглобулина в опытах был выше, чем овечьего, что объясняется меньшей активностью последнего. Также была определена активность специфического конъюгата при использовании в ИФА различных иммуноглобулинов.

В результате обработки оптимальных условий постановки ИФА с использованием свиного и овечьего иммуноглобулинов установлены параметры реакции, позволяющие определить разведения ящурного антигена до 1:2560 и 1:320 соответственно.

Исследованиями по отработке оптимальных условий постановки твердофазного ИФА («сэндвич»-вариант) показано, что наибольшей чувствительности метод достигает при следующих параметрах постановки реакции:

1. Сенсибилизация лунок полистироловых планшетов вирусспецифическим иммуноглобулином, взятым в рабочей концентрации, в течение 16-18 ч при температуре плюс 3 – 4°С или в течение 3 – 4 ч при температуре плюс 37 – 38°С.

2. Время контакта испытуемых и контрольных антигенов с иммуноглобулинами в течение 120 мин при температуре плюс 37 – 38°С.

3. Взаимодействие вирусспецифического конъюгата с антигенами в течение 60 мин при температуре 37-38°С, а затем с субстратом в течение 30-60 мин при комнатной температуре.

4. Учет результатов реакции на фотометре марки «Мультискан» при длине волны 405 нм.

5. Результат считать положительным, если оптическая плотность испытуемого антигена в 2 и более раз превышает оптическую плотность контрольного (нормального) антигена.

В следующей серии опытов определяли активность и специфичность в ИФА полученных иммуноглобулинов и конъюгата. Для проверки активности свиного иммуноглобулина использовали стандартные лапинизированный и культуральный антигены, ящурную ГОА-вакцину, культуральные суспензии СПЭВ, ВНК-21, а также 10% и 20% лапинизированную суспензию вируса ящура. Стандартные антигены добавляли в двукратных разведениях, начиная с 1:5, вакцину, культуральные суспензии СПЭВ, ВНК-21 и лапинизированную суспензию вируса ящура добавляли в двукратных разведениях, начиная с 1:2. Схемы постановки реакции представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Постановка ИФА для обнаружения антигена вируса ящура с использованием свиного иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 | 1:5120 |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Культуральный ящурный антиген | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Лапинизированный ящурный антиген | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «-» – отрицательный результат.

Как видно из данных таблиц 1 и 2, используя полученные свиной иммуноглобулин и конъюгат в ИФА можно обнаружить антиген вируса ящура до следующих разведений: концентрированный культуральный стандартный антиген до разведения 1:640, концентрированный лап-

низированный антиген – 1:2560, в ГОА-вакцине и 10% лапинизированной суспензии годовой давности – 1:2, в неконцентрированной 20% лапинизированной суспензии – 1:128. Фонового связывания с буфером для ИФА и нормальными культурами клеток не происходило.

Таблица 2 – Постановка ИФА для обнаружения антигена вируса ящура с использованием свиного иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | 1:2048 |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ГОА-вакцина | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10% ящурная суспензия типа А, сер №1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20% ящурная суспензия типа А, сер №2 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Культура клеток ВНК-21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Культура клеток СПЭВ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «-» – отрицательный результат.

Для проверки специфичности свиного иммуноглобулина в ИФА использовали буфер для ИФА, чистые культуры клеток ВНК-21, ПЯ, нормальный лапинизированный антиген, стандартный лапинизированный антиген типа О, стандартный культуральный антиген типа О, стандартный антиген типа С, стандартный анти-

ген типа Азия-1, специфический антиген чумы КРС, специфический антиген чумы мелких жвачных животных. Культуры клеток добавляли в двукратных разведениях, начиная с 1:2, антигены добавляли в двукратных разведениях, начиная с 1:10. Схемы постановки реакции представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Постановка ИФА для проверки специфичности свиного иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--|
| | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Культура клеток ПЯ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Культура клеток ВНК-21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |

Примечание – «-» – отрицательный результат.

Из данных таблиц 3 и 4 видно, что полученный свиной иммуноглобулин дает неспецифическое фоновое окрашивание, связываясь с лапинизированным ящурным антигеном типа О и ящурным антигеном типа С до разведения 1:10. С нормальными культурами клеток, ящурным

антигеном типа Азия-1, антигеном ЧКРС и антигеном ЧМЖЖ неспецифического связывания не происходит.

Для проверки активности и специфичности овечьего иммуноглобулина в ИФА использовали буфер для ИФА, чистые культуры клеток

ВНК-21, ПЯ, нормальный лапинизированный антиген, стандартный лапинизированный антиген типа О, стандартный культуральный антиген типа О, стандартный антиген типа С, стандартный антиген типа Азия-1, биоматериал №1 и биоматериал №2. Биоматериалы, использованные для постановки реакции типизированы в РДП и РСК как тип О. Овечий иммуноглобулин брали в разведении 1:50. После сенсibilизации

плашку промывали 3 раза и добавляли в каждую лунку по 0,2 мл 1% БСА, инкубировали при 37°C в течение часа, после БСА плашку не отмывали. Культуры клеток и биоматериал добавляли в двукратных разведениях начиная с цельного вида, нормальные и специфические антигены добавляли в двукратных разведениях начиная с 1:10. Схемы постановки реакции представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 4 – Постановка ИФА для проверки специфичности свиного иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | |
|---|----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 | 1:5120 |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа А лапинизированный | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Антиген ящурный типа А культуральный | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Антиген ящурный типа О лапинизированный | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа О культуральный | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген С | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген Азия-1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ЧКРС | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ЧМЖЖ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «-» – отрицательный результат.

Таблица 5 – Постановка ИФА для проверки специфичности бараньего иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| | цельный | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Культура клеток ПЯ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Культура клеток ВНК-21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген нормальный | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Биоматериал №1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Биоматериал №2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «-» – отрицательный результат.

Как видно из данных таблиц 5 и 6 овечий иммуноглобулин не дает неспецифического фонового связывания с нормальным антигеном в разведении 1:10 и со специфически-

ми антигенами типов О и С, но связывается в цельном виде с пробами биоматериала, типизированными в серологических реакциях как тип О. Связи с этим в дальнейших работах

по постановке метода ИФА для обнаружения антигена вируса ящура типа А, биоматериалы и культуры клеток необходимо использовать в двукратных разведениях начиная с 1:2. Ак-

тивность овечьего иммуноглобулина со стандартными антигенами типа А составила 1:320 с лапинизированным антигеном и 1:40 с культуральным антигеном.

Таблица 6 – Постановка ИФА для проверки специфичности бараньего иммуноглобулина

n=3

| Антигены | Разведения антигенов | | | | | | | | | |
|---|----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 | 1:5120 |
| Буфер для ИФА | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа А лапинизированный | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа А культуральный | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа О лапинизированный | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ящурный типа О культуральный | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген С | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген Азия-1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ЧКРС | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Антиген ЧМЖЖ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «-» – отрицательный результат.

Выводы

Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в 2001-2016 годах характеризовалась определенной напряженностью. По некоторым данным в сопредельных с Республикой Казахстан странах (Китай, Монголия, Россия) были зарегистрированы вспышки вируса ящура. По филогенетическим анализам изоляты вируса ящура были схожи [26].

Своевременная диагностика ящура, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление диагностических препаратов с использованием новых штаммов и их оперативное применение в очаге эпизоотий позволяет своевременно типировать и ликвидировать ящурные очаги.

В связи с этим по результатам нашего опыта по оптимизации метода ИФА для диагностики ящура типа А на основе актуального штамма «Таласский» были получены активные и специфические очищенные антигены, антисыворотки на разных видах животных, выделены иммуноглобулины из полученных сывороток, на основе иммуноглобулинов приготовлены конъюгаты.

Приготовленные диагностические препараты использованы для оптимизации условий постановки ИФА для диагностики вируса ящура типа А.

Оптимизированный вариант ИФА пригоден для обнаружения антигенов вируса ящура типа и высоко специфичен с антигенами других типов ящура в двукратном разведении.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Финансирование предоставлено Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках бюджетной программно-целевого финансирования «Ветеринарная безопасность территории Республики Казахстан: эпизоотологический мониторинг, испытание, внедрение и коммерциализация средств специфической профилактики и диагностики особо опасных инфекционных заболеваний» (ИРН BR06249226), по проекту: «Испытание, внедрение и коммерциализация тест-систем для серологической диагностики особо опасных инфекционных болезней животных» на 2018-2020 годы.

Литература

- 1 Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., Zhang Z., Belsham G.J., Alexandersen S. Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay // *J. Virol. Meth.* – 2002. – Vol. 105. – PP. 67-80.
- 2 Foot And Mouth Disease Virus/Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines – Paris: OIE.- 1996.- PP. 47 – 57.
- 3 Kitching R. P. Barnett P. V. Donaldson A. I. Mackay D. K. J. Foot and mouth disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees Paris: OIE.- 2001.- PP. 77-92.
- 4 Nagendrakumar S.B., Reddy G.S., Chandran D., Thiagarajan D., Rangarajan P.N., Srinivasan V.A. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus type C of Indian origin // *J. Clinical Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. N. 2. – PP. 966-969.
- 5 Have P., Lei J. C., Schjerving-Thiesen K. “An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease: characterization and comparison with complement fixation” // *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum.* – Vol. 25. – No. 2. – PP. 280–296. – 1984.
- 6 Ferris N. P., Dawson M. “Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases” // *Veterinary Microbiology.* – Vol. 16. – No. 3. – PP. 201–209. – 1988.
- 7 Abu Elzein E. M. E., Crowther J. R. “Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research” // *Journal of Hygiene.* – Vol. 80. – No. 3. – PP. 391–399. – 1978.
- 8 Crowther J. R., Abu Elzein E. M. E. “Application of the enzyme linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease viruses” // *Journal of Hygiene.* – Vol. 83. – No. 3. – PP. 513–519. – 1979.
- 9 Ouldrige E. J., Barnett P., Rweyemamu M. M. “The relative efficiency of two ELISA techniques for the tritration of FMD antigen” // *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science.* – Vol. 22. – PP. 142–151. – 1982.
- 10 Abu Elzein E. M. E., J. R. Crowther. “The specific detection of foot-and-mouth disease virus whole particle antigen (140S) by enzyme labelled immunosorbent assay” // *Journal of Hygiene.* – Vol. 83. – No. 1. – PP. 127–134. – 1979.
- 11 Rai A., Lahiri D. K. “A micro-enzyme-labelled immunosorbent assay (MICROELISA) for the detection of foot-and-mouth disease virus antigen and antibody” // *Acta Virologica.* – Vol. 25. – No. 1. – PP. 49–52. – 1981.
- 12 Hamblin C., Armstrong R. M., Hedger R. S. “A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and-mouth disease virus in epithelial tissues” // *Veterinary Microbiology.* – Vol. 9. – No. 5. – PP. 435–443. – 1984.
- 13 Ouldrige E. J., Barnett P. V., Hingley J., Rweyemamu M. M. “The differentiation of foot and mouth disease virus strains using an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay saturation model” // *Journal of Biological Standardization.* – Vol. 12. – No. 4. – PP. 367–377. – 1984.
- 14 Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M. “Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis” // *Research in Veterinary Science.* – vol. 43. – No. 2. – PP. 225–232. – 1987.
- 15 Pattnaik B., Venkataramanan R. “Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of FMDV antigen” // *Indian Journal of Animal Sciences.* – Vol. 59. – PP. 317–322. – 1989.
- 16 Pattnaik B., Venkataramanan R. “A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for subtype analysis of foot-and-mouth disease virus isolate” // *Indian Journal of Animal Sciences.* – Vol. 59. – PP. 1363–1368. – 1989.
- 17 Сюрин В.Н., Белоусова Р.В, Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных // М., "Агропромиздат"- 1991г. – С. 434 – 463.
- 18 Paiba G. A., Anderson J., Paton D. J. “Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE)” // *Journal of Virological Methods.* – Vol. 115. – No. 2. – PP. 145–158. – 2004.
- 19 Bhattacharya S., Pattnaik B., Venkataramanan R. “Development and application of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for type identification of foot-and-mouth-disease (FMD) virus in direct field materials” // *Indian Journal of Animal Sciences.* -Vol. 66. – No. 12. – PP. 1201–1209. – 1996.
- 20 Grubman M. J., Baxt B. “Foot-and-mouth disease” // *Clinical Microbiology Reviews.* – Vol. 17. – No. 2. – PP. 465–493. – 2004.
- 21 Мищенко В.А. Иммуноферментный метод в диагностике ящура // *Вопр. вирусол.* – 1991. – №4. – С. 341 -342.
- 22 Cohn E., Strong L., Hughes W. Fractionation of proteins from plasma // *J. Amer. Chem. Soc.*- 1946. – V.68. – 459 p.
- 23 Oncley J., Melin M., Richert D. The separation of the antibodies // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949. – V.71. – PP. 541-550.
- 24 Kistler P., Nitschman H. Production of proteins from plasma // *Vox. Sang.*, 1962. – V.7. – P. 414– 424.
- 25 Мищенко В.А., Шажко Ж.А., Базаров М.А., Конюшкина Т.Б., Смирнов А.Б., Атаев Э.А. Сравнительная оценка методов конъюгации антител к вирусу ящура с пероксидазой хрена // *Акт. пробл. вет. вирусологии. Тез. докл. науч. конф. ВНИИИ,* – Владимир, 1987.- 2.- С. 49 – 50.
- 26 Щербаков А.В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура) // *Ветеринария сегодня.* 2015.- (3).- С. 30-36.

References

- 1 Abu Elzein E. M. E., Crowther J. R. "Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research" // *Journal of Hygiene*. – Vol. 80. – No. 3. – PP. 391–399. – 1978.
- 2 Abu Elzein E. M. E., J. R. Crowther. "The specific detection of foot-and-mouth disease virus whole particle antigen (140S) by enzyme labelled immunosorbent assay" // *Journal of Hygiene*. – Vol. 83. – No. 1. – PP. 127–134. – 1979.
- 3 Bhattacharya S., Pattnaik B., Venkataramanan R. "Development and application of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for type identification of foot-and-mouth-disease (FMD) virus in direct field materials" // *Indian Journal of Animal Sciences*. -Vol. 66. – No. 12. – PP. 1201–1209. – 1996.
- 4 Crowther J. R., Abu Elzein E. M. E. "Application of the enzyme linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease viruses" // *Journal of Hygiene*. – Vol. 83. – No. 3. – PP. 513–519. – 1979.
- 5 Cohn E., Strong L., Hughes W. Fractionation of proteins from plasma // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1946. – V.68. – 459 p.
- 6 Foot And Mouth Disease Virus/Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines – Paris: OIE.- 1996.- P. 47 – 57.
- 7 Ferris N. P., Dawson M. "Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases" // *Veterinary Microbiology*. – Vol. 16. – No. 3. – PP. 201–209. – 1988.
- 8 Grubman M. J., Baxt B. "Foot-and-mouth disease" // *Clinical Microbiology Reviews*. – Vol. 17. – No. 2. – PP. 465–493. – 2004.
- 9 Have P., Lei J. C., Schjerning-Thiesen K. "An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease: characterization and comparison with complement fixation" // *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*. – Vol. 25. – No. 2. – PP. 280–296. – 1984.
- 10 Hamblin C., Armstrong R. M., Hedger R. S. "A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and-mouth disease virus in epithelial tissues" // *Veterinary Microbiology*. – Vol. 9. – No. 5. – PP. 435–443. – 1984.
- 11 Kitching R. P. Barnett P. V. Donaldson A. I. Mackay D. K. J. Foot and mouth disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees Paris: OIE.- 2001.- PP. 77-92.
- 12 Kistler P., Nitschman H. Production of proteins from plasma // *Vox. Sang.*, 1962. – V.7. – P. 414– 424.
- 13 Mishchenko V. V. enzyme immunoassay in the diagnosis of FMD // *Vopr. virusol.* – 1991. – №4. – P. 341 -342.
- 14 Mishchenko V. A., Sajko J. A., Bazarov M. A., Konushkina T. B., Smirnov A. B., Ataev E. A. Comparative estimation of methods of conjugation of antibodies to FMD virus with horseradish peroxidase // *Act. Probl. vet. virologies. Texas. Doc. scientific. Conf. VNEI, Vladimir, 1987.- 2.- P. 49 – 50.*
- 15 Nagendrakumar S.B., Reddy G.S., Chandran D., Thiagarajan D., Rangarajan P.N., Srinivasan V.A. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus type C of Indian origin // *J. Clinical Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. N. 2. – P. 966-969.
- 16 Ouldrige E. J., Barnett P., Rweyemamu M. M. "The relative efficiency of two ELISA techniques for the titration of FMD antigen" // *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. – Vol. 22. – PP. 142–151. – 1982.
- 17 Ouldrige E. J., Barnett P. V., Hingley J., Rweyemamu M. M. "The differentiation of foot and mouth disease virus strains using an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay saturation model" // *Journal of Biological Standardization*. – Vol. 12. – No. 4. – PP. 367–377. – 1984.
- 18 Oncley J., Melin M., Richert D. The separation of the antibodies // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949. – V.71. – P. 541-550.
- 19 Pattnaik B., Venkataramanan R. "Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of FMDV antigen" // *Indian Journal of Animal Sciences*. – Vol. 59. – PP. 317–322. – 1989.
- 20 Pattnaik B., Venkataramanan R. "A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for subtype analysis of foot-and-mouth disease virus isolate" // *Indian Journal of Animal Sciences*. – Vol. 59. – PP. 1363–1368. – 1989.
- 21 Syurin V. N., Belousova R., Fomina N. In. Diagnostics of viral animal diseases // M., "Agropromizdat"- 1991. – PP. 434 – 463.
- 22 Paiba G. A., Anderson J., Paton D. J. "Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE)" // *Journal of Virological Methods*. – Vol. 115. – No. 2. – PP. 145–158. – 2004.
- 23 Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., Zhang Z., Belsham G.J., Alexandersen S. Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay // *J. Virol. Meth.* – 2002. – Vol. 105. – PP. 67-80.
- 24 Rai A., Lahiri D. K. "A micro-enzyme-labelled immunosorbent assay (MICROELISA) for the detection of foot-and-mouth disease virus antigen and antibody" // *Acta Virologica*. – Vol. 25. – No. 1. – PP. 49–52. – 1981.
- 25 Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M. "Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis" // *Research in Veterinary Science*. – Vol. 43. – No. 2. – PP. 225–232. – 1987.
- 26 Shcherbakov A.V. Molecular epizootology of FMD in Russia (phylogenetic analysis of Russian FMD virus isolates) // *Veterinary medicine today*. 2015.- (3).- P. 30-36.