

Г. Б. ТУСТИКБАЕВА, А. П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, И. А. ЗАЙЦЕВА,
Э. С. ОМИРТАЕВА, П. Г. АЛЕКСЮК, В. Э. БЕРЕЗИН

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА МЕМБРАННОМ СОРБЕНТЕ (ИФА-ТИС) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» Комитет науки МОН РК, г. Алматы

Разработка простых, надежных в употреблении и высокочувствительных методов и тест-систем для диагностики вируса болезни Ньюкасла является весьма актуальной задачей современной вирусологии, имеющей не только теоретическое, но и большое практическое значение. Был разработан высокочувствительный способ выявления антител к белкам ВБН методом ИФА-ТИС. Показано, что чувствительность метода ИФА-ТИС значительно превышает чувствительность традиционных способов выявления антител к вирусу ВБН с помощью РГА, РТГА и РНГА.

Введение. Болезнь Ньюкасла – высококонтагиозная вирусная инфекция птиц, которая характеризуется поражением всех внутренних органов и систем организма и вызывающая крупные эпизоотии среди домашних и диких птиц [1-3]. ВБН способен вызывать массовую гибель птиц в птицеводческих хозяйствах, нанося значительный экономический ущерб. Своевременная и эффективная диагностика ВБН, а также контроль за напряженностью иммунитета после вакцинации служат хорошим барьером на пути распространения вируса и помогает предотвратить значительные экономические потери [4, 5].

Материалы и методы

В работе был использован вирус болезни Ньюкасла, штамм А/ПМВ-1/La Sota/46. Вирус выращивали в течение 48 часов в аллантоисной полости куриных эмбрионов при 37 °C. Концентрация и очистка вируса осуществлялась дифференциальным центрифугированием с использованием градиента плотности сахарозы при 29 тыс./об.мин. Полученный осадок вируса суспендировали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), определяли гемагглютинирующую активность и концентрацию белка. Концентрацию белка определяли по методу Bradford с использованием красителя Кумасси [6].

Реакцию точечного иммунного связывания на мембранным сорбенте (ИФА-ТИС) ставили, как описано ранее [7-9]. Аликвоты антигена в рабочем разведении сорбировали на нитроцеллюлозную мембрану. Полученный иммуносорбент для исключения неспецифической сорбции антител обрабатывали 10 %-ной нормальной лошадиной сывороткой в сочетании с 0,5 % Твин-20 в течение 60 минут при 37 °C.

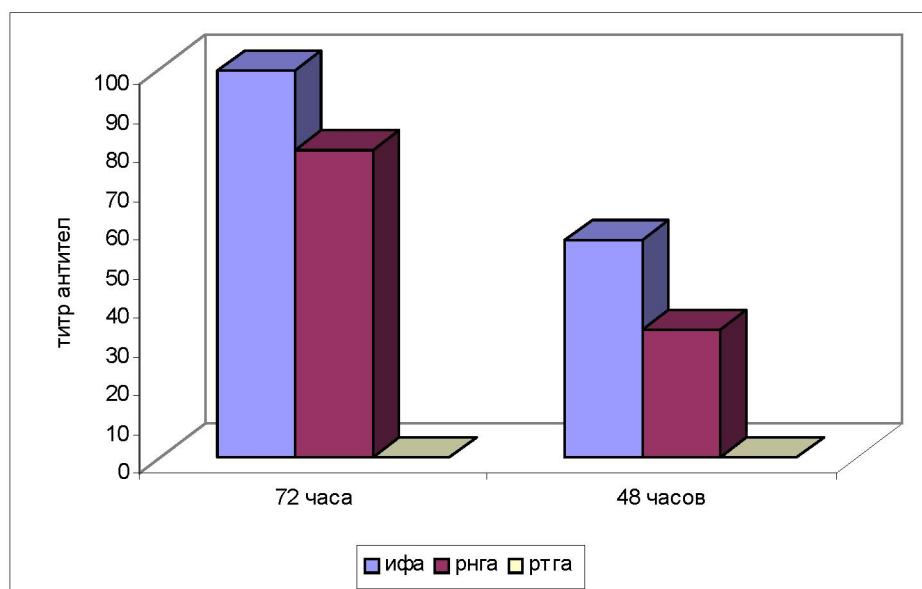
Исследуемые сыворотки в последовательных двукратных разведениях наносили на сорбент и после инкубации иммуносорбента с сывороткой в течение 1 часа при 37 °C несвязавшиеся иммуноглобулины отмывали от иммуносорбента буферным раствором (0,05 M Трис HCl, 0,9 % NaCl, 0,05% Твин 20). Связанные с иммуносорбентом вирусспецифические антитела выявляли в иммуноферментной реакции, используя антивидовой коньюгат с пероксидазой хрена в рабочем разведении. В качестве цветного индикатора применяли комплексообразующий субстрат бензидин [10]. РТГА и РНГА осуществляли стандартными методами [11].

Результаты исследования

Для изучения чувствительности различных методов определения антител к ВБН было проведено экспериментальное заражение цыплят вирусом А/ПМВ-1/Ла Сота /46. Двухнедельных цыплят, не имеющих антител к ВБН, заражали интраназально в дозе 1000 ЭИД₅₀/цыпленок в объеме 0,2 мл. Антитела определяли в течение первых 4 дней после заражения.

Сопоставление чувствительности методов РТГА, РНГА и ИФА-ТИС осуществлялось по двум параметрам: 1) сроки обнаружения антител и возможность ранней диагностики ВБН, 2) титры антител в иммунных сыворотках при определении различными методами. В качестве контроля использовали сыворотки неиммунных цыплят из контрольной незараженной группы.

Изучение динамики появления антител к ВБН в сыворотках цыплят после заражения вирусом продемонстрировало более высокую чувствительность метода ИФА-ТИС по сравнению с РТГА и РНГА. В РТГА значимый уровень антител к ВБН выявлялся только через 72 ч после экспериментального заражения, тогда как в РНГА и ИФА-ТИС подъем уровня специфических антител регистрировали уже через 24 часа после заражения. Через 48 ч после заражения антитела к ВБН обнаруживали у 33% инфицированных цыплят, если использовали метод РНГА и у 56% цыплят, если для диагностики применяли метод ИФА-ТИС. Через 72 ч после инфицирования метод ИФА-ТИС позволял выявить антитела к ВБН у всех инфицированных цыплят (100%), тогда как в РНГА антитела обнаруживали у 79% цыплят (рис.). Сопоставление титров антител к вирусу болезни Ньюкасла (табл.) показало, что метод РНГА чувствительнее РТГА в 2-8 раз, а ИФА-ТИС обладает чувствительностью, превосходящей РТГА более чем в 100 раз.



Примечание. По оси ординат дан % выявления антител у инфицированных птиц; по оси абсцисс – время после экспериментального заражения в часах.

Динамика обнаружения антител к ВБН различными методами
после экспериментального заражения цыплят А/ПМВ-1/Ла Сота/46

Титры антител в сыворотках цыплят после экспериментального заражения ВБН, штамм А/ПМВ-1/Ла Сота /46

№ сыворотки	Титр антител, определяемый различными методами		
	РТГА	РНГА	ИФА-ТИС
1	4*	32	320
2	8	64	1280
3	4	32	640
4	8	64	640
5	4	64	1280
6	8	64	320
7	4	32	640

* Даны обратные величины титров антител.

Показано, что чувствительность метода ИФА-ТИС превосходит чувствительность традиционных методов диагностики антител к ВБН в РТГА и РНГА, что дает возможность осуществлять более эффективное и раннее выявление антител у зараженных или вакцинированных птиц. Стабильность основных компонентов тест-системы ИФА-ТИС при +4 °C составляет не менее 8 мес., что позволяет сохранять тест-систему в активном состоянии длительное время и использовать ее для рутинной диагностики.

Таким образом, было установлено, что чувствительность метода ИФА-ТИС существенно превосходит чувствительность традиционных методов диагностики антител к ВБН в РТГА и РНГА. Это позволяет выявлять диагностические значимые уровни антител в более ранние сроки и с большей эффективностью. Данное обстоятельство делает метод ИФА-ТИС более удобным для определения иммунного статуса в популяциях домашних птиц и для контроля эффективности вакцинопрофилактики ВБН в птицеводческих хозяйствах. Определение антител к ВБН с помощью ИФА-ТИС также может служить эффективным методом диагностики инфицированности ВБН у диких мигрирующих птиц, что важно с точки зрения контроля распространения вируса в популяциях диких птиц.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Alexander D.J. The Epidemiology and Control of Avian Influenza and Newcastle disease // J. Comp. Pathol. – 1995. – Vol. 112. – P. 105-106.
- 2 WHO Manual for Animal influenza Diagnosis and Surveillance // Geneva. – 2002. – P. 105.
- 3 Саятов М.Х. , Бутакова И.Ш., Кыдырманов А.И., Даулбаева К.Д., Асанова С.Е. Итоги изучения парамиксовируса птиц серотипа 1 в Казахстане // Известия МОН РК, НАН РК. – Сер. биол. и мед. – 2003. – № 2. – С. 71-81.
- 4 Дзантиев Б.Б., Осипов А.П. Классификация и характеристика иммуноферментного анализа // Биотехнол. – М, 1987. – Т. 3. – С. 56-116.
- 5 Коровин Р.Н., Зеленский В.П., Грошева Г.А. Лабораторная диагностика болезней птиц. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 117.
- 6 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1. – P. 248-254.
- 7 Богоявленский А.П., Боряк И.А., Зайцева И.А., Третьяков Ю.К., Толмачева В.П., Березин В.Э. Разработка гетерологичной тест-системы ИФА на мембранным сорбенте // Известия МОН РК, НАН РК. – Сер. биол. и мед. – 1994. – № 5. – С. 37-40.
- 8 Толмачева В.П., Худякова С.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э. Использование метода точечного иммуноферментного анализа на мембранным сорбенте для определения антител к вирусу болезни Ньюкасла // Известия МОН РК, НАН РК. – Сер. биол. и мед. – 1996. – № 5. – С. 74-77.
- 9 Березин В.Э., Таран О.И., Зайдес В.М. Применение метода точечного иммунного связывания (ТИС) для иммунодиагностики вирусных антигенов и антител к вирусным белкам // Метод., исследов. в молекул., общей и медицин., вирусол. – М., 1987. – С. 143-151.
- 10 Коровин Р.Н. Значение реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) и непрямой гемагглютинации (РНГА) в ретроспективной диагностике ньюкаслской болезни и оценке поствакцинального иммунитета: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Тарту, 1967. – 23 с.
- 11 Асанова С.Е., Богомолова Т.С., Асанов Н.Г., Саятов М.Х. Способ приготовления антигенных эритроцитарных диагностикумов для выявления специфических антител к вирусу болезни Ньюкасла // Известия МОН РК, НАН РК. – Сер. биол. и мед. – 2002. – № 4. – С. 48-55.

*Г. Б. Тұстіқбаева, А. П. Богоявленский, И. А. Зайцева,
Э. С. Өміртаева, П. Г. Алексюк, В. Э. Березин*

НЫЮКАСЛ АУРУ ВИРУСЫНЫҢ АНТИДЕНЕЛЕРІН ДИАГНОСТИКА ЖАСАУДА МЕМБРАНА СОРБЕНТИНДЕГІ ИММУНОФЕРМЕНТТІ ДИАГНОСТИКА ӘДІСІНІң СЕЗІМТАЛДЫҒЫН ЖОҒАРЫЛАТУ

Ньюкасл ауыруы вирусын диагностикалауда теориялық және практикалық маньзы зор сенімді, қолданылуда қаралайым және жоғары сезімтал әдістер мен тестжүйелерді құрау қазіргі вирусологияның көкейесті максаты бол табылады. ИФТ- НИС әдісі арқылы НАВ акуызына антиденелерді түзу үшін жоғары сезімтал әдісі өндөлінді. НАВ антиденелерін анықтауда ИФТ-НИС әдісінің сезімталдығы ГАР, ГАТР, ТГАР белгілі әдістердің сезімталдығына карағанда біршама жоғары болғаны көрсетілді.

*G. B. Tustikbaeva, A. P. Bogoyavlenskiy, I. A. Zaitzeva,
E. S. Omirtaeva, P. G. Aleksyuk, V.E. Berezin*

**INCREASE OF SENSITIVITY OF A METHOD ELISA
ON MEMBRAN SORBENT AT DEFINITION OF ANTIBODY
OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS**

The development of reliable, simple in the use and big of sensitive methods and test-systems for diagnostics of Newcastle disease virus is rather urgent task modern virology having not only theoretical meaning, but also large practical meaning. In the result of implementation of the work was developed highly sensitive method for detection antibodies to protein by ELISA-PIS. It was shown that sensitivity of ELISA-PIS method significantly gone beyond of conventional NDV antibodies detection test of hemagglutination reaction, hemagglutination inhibition and passive hemagglutination test.