

УДОСКОНАЛЕННЯ РЕАКЦІЇ ДИФУЗНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МЕТАПНЕВМОВІРУСУ ПТИЦІ

Р. А. Дубін, к.вет.н., доцент*

П. В. Шарандак, д.вет.н., доцент**

Л. Г. Улько, д.вет.н., професор***

*Луганський національний аграрний університет, м. Харків

**Білоцерківський національний аграрний університет

***Сумський національний аграрний університет

У статті представлені результати досліджень, щодо удосконалення реакції дифузної преципітації для виявлення метапневмовірусу птиці. За допомогою преципітації сульфатом амонію із гіперімунної сироватки виділено специфічний глобулін. Визначено його концентрацію та діагностичні показники. Отримано дані про неефективність використання хлороформу та петролейного ефіру для очищення ембріонального антигену метапневмовірусу птиці від жовтку.

Ключові слова: метапневмовірус птиці, реакція дифузної преципітації, імуноглобуліни.

За визначенням ВОЗ до імуноглобулінів відносять білки тваринного походження, що мають активність антитіл, а також білки, що мають схожість з антитілами по хімічній структурі та антигенній специфічності. Антитіла містяться в γ -глобуліновій фракції сироватки крові, тому для їх максимального очищення слід виділяти саме цю фракцію. Імуноглобуліни мають 5 класів, з них лише три мають діагностичне значення при виявленні антигену *in vitro*: IgG, IgM та IgA, а їх вміст в сироватці відповідно 8-16 мг/мл, 0,5-1,9 мг/мл і 1,4-4,2 мг/мл. Антитіла різної специфічності можуть міститися в будь-якому класі імуноглобулінів. За допомогою 1,49-2,05 М розчину сульфату амонію ці білки можна осадити з розчину [3].

Чутливість різних методів для виявлення антитіл варіює: для імунопреципітаційного методу вона складає 30-60 мкг/мл, тоді як колориметричний біуретовий метод дозволяє визначити 120 мкг/мл [3]. Але навіть при використанні такого чутливого методу як ІФА можна отримати псевдопозитивні та псевдонегативні результати аналізу, що викликане неспецифічною реакцією компонентів тест систем та біологічними факторами дослідного матеріалу [4]. Тому слід максимально очищувати реагенти від супутніх продуктів для підвищення діагностичної цінності отриманого результату.

Для очищення антитіл найбільш загальним є метод преципітації сульфатом амонію. Отриманий цим методом продукт не досить чистий, але показує підвищену активність в реагуючих системах і його подальше очищення не потрібне [6].

Для контролю якості антитіл застосовують наступні рекомендації: 1) використовують стандартний антиген (очищена речовина у розчині, мікроорганізми); 2) за можливості завжди використовують контрольну сироватку; 3) завжди включати в систему контролю ті методи, заради яких отримано діагностичний реагент [1].

Метою наших досліджень було отримання діагностичного глобуліну, визначення його хімічних і діагностичних характеристик, а також знайти кращий метод очищення ембріонального антигену для РДП.

Мета і методи досліджень. Метою наших досліджень було отримання діагностичного глобуліну, визначення його хімічних і діагностичних характеристик, а також знайти кращий метод очищення ембріонального антигену для реакції дифузної преципітації (РДП).

Глобуліни отримували шляхом дворазового висолювання насиченим розчином сульфату амонію гіперімунної сироватки кроля, яка мала титр в РДП 1:64 (специфічний глобулін) та контрольної сироватки

(контрольний глобулін) при співвідношенні сироватки до розчину сульфату амонію 5:3). Після висолювання глобулін осаджували центрифугуванням протягом 30 хв. при 1000 g. Осад розчиняли в фосфатно-сольовому буфері з рН=7,0 [7].

Вміст білка глобулінової фракції та антигену визначали на фотоелектроколориметрі (КФК) за допомогою біуретової реакції. Для цього використовували діагностичний набір фірми Фелісіт-Діагностика для визначення загального білка.

Концентрацію визначали спочатку за допомогою калібрувальної кривої, використовуючи полумікрометод визначення за вимогами фірми-виробника набору, щоб одержати дані про приблизну концентрацію білку у розчині для подальшого дослідження. Коротко, до 2 мл біуретового реактиву додавали 40 мкл розчину білка (калібрувального або дослідного). Після інкубації при кімнатній температурі на протязі 30 хв. визначали оптичну щільність калібрувальних розчинів з концентрацією 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л, 100 г/л. Отримані значення наносили на координатну площу: ось абсцис – концентрація, а ось ординат – показники оптичної щільності. Точки з'єднували в криву на якій по показникам оптичної щільності визначали концентрацію отриманого протеїну в розчині.

Точну концентрацію визначали за допомогою математичного методу. Для цього робили розчин контрольного білку з набору в концентрації, близької до концентрації білка в дослідних розчинах, згідно з даних калібрувальної кривої. Після цього використовували модифіковану біуретову реакцію за методикою Горналла, Бардавілла і Девіда: до 0,5 мл дослідного розчину білку додавали 2,5 мл біуретового реактиву. Після витримки на протязі 30 хв. вимірювали концентрацію контрольного і дослідних розчинів на КФК при довжині оптичного шляху 0,5 см і довжині хвилі 540 нм [5]. Одержані дані підставляли в формулу (1):

$$C_x = C_s \cdot \frac{A_x}{A_s} \quad (1)$$

де C_x – концентрація дослідного протеїну в розчині, C_s – концентрація калібрувального протеїну (відома), A_s – оптична щільність калібрувального протеїну, A_x – оптична щільність дослідного протеїну [2].

Таким чином визначили концентрацію дослідного глобуліну гіперімунної сироватки кроля, глобуліну контрольної сироватки кроля та антигену – польового ізоляту PV-3 метапневмовірусу.

Для визначення чутливості використовували РДП із титруванням контрольного і дослідного глобулінів проти

антигену, а також титрування антигену з коефіцієнтом розбавлення 2 проти гіперімунної сироватки та отриманого з неї глобуліну.

Результати власних досліджень та їх обговорення. Після дворазового очищення отримали прозорий опалесцюючий розчин, об'єм якого в 1,5 рази

перевищував об'єм використаної сироватки. За результатами визначення оптичної щільності калібрувальних розчинів побудували калібрувальну криву (рис. 1), за допомогою якої визначили концентрації специфічного та контрольного глобулінів і специфічного антигену.

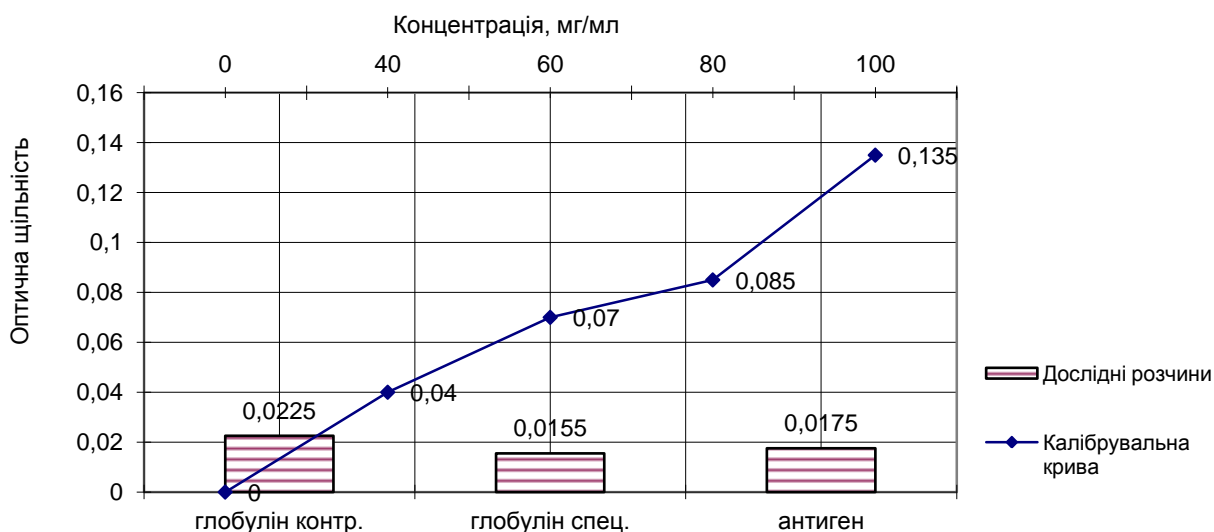


Рис. 1. Калібрувальна крива для грубого визначення концентрації білка в дослідному розчині.

За даними калібрувальної кривої концентрації дослідних розчинів приблизно однакові і лежать в межах 10-20 мг/мл.

Тому для математичного методу ми використали

калібрувальний розчин з концентрацією 4 мг/мл шляхом розбавлення калібрувального розчину з концентрацією 40 мг/мл з коефіцієнтом 10^{-1} . Отримані дані оптичної щільності і обчисленої концентрації подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Дані математичного методу обчислення концентрації протеїнів в дослідних розчинах

Показники	Дослідна речовина	Калібрувальний протеїн	Контрольний глобулін	Специфічний глобулін	Антиген пташиного метапневмовірусу
Оптична щільність		0,0525	0,184	0,12	0,29
Обчислена концентрація, мг/мл		4	14	9,1	22,1

При проведенні детекції в РДП встановлено, що титр отриманого специфічного глобуліну до використаного антигену склав 1:32 (рис. 2 а), що в 2 рази менше за титр використаної для його виготовлення сироватки. При титруванні антигену встановлено, що за допомогою специфічної сироватки можна визначити його титр 1:4 (рис.

2 б) але реакція супроводжувалася появою димчастих артефактів навколо центральної лунки, тоді як використання глобуліну дозволяє визначити титр антигену 1:64 без артефактів (рис. 2 в). Контрольний глобулін не давав позитивної реакції (рис. 2 г).

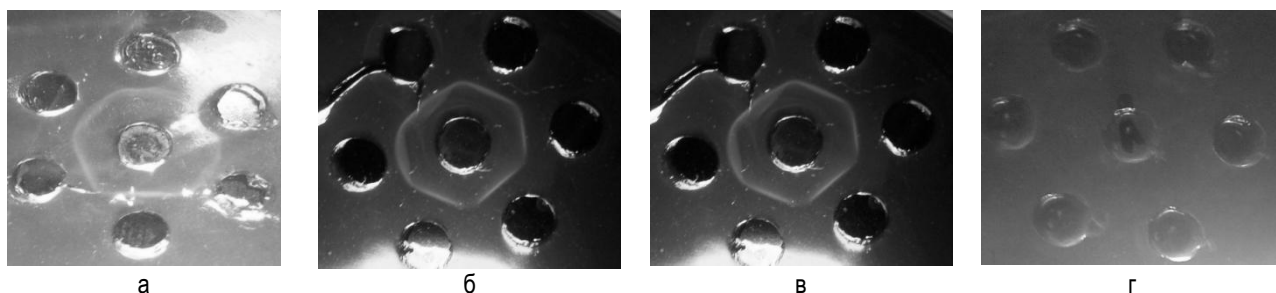


Рис. 2. Реакція дифузної преципітації:

- а) титрування отриманого глобуліну; б) титрування антигену проти специфічного глобуліну;
- в) титрування антигену проти сироватки, з якої отримали глобулін; г) титрування контрольного глобуліну.

Таким чином чутливість глобулінового препарату була вище чутливості гіперімунної сироватки в 16 разів, отриманий глобуліновий препарат здатний визначити 0,34 мг/мл антигену пташиного метапневмовірусу в дослідному розчині антигену і достатньо 0,28 мг/мл концентрації

глобуліну для позитивної детекції.

Висновки і пропозиції. Використання двічі очищеного препарату глобуліну з гіперімунної сироватки кроля дає змогу отримати діагностичний засіб у 16 разів чутливіший за попередній. За допомогою отриманого

специфічного глобуліну можна виявити антиген МПВ птиці при концентрації до 0,34 мг/мл у РДП.Ефективною концентрацією отриманого специфічного глобуліну для детекції антигену в РДП є 0,28 мг/мл.

Список використаної літератури:

1. Кэти Д. Антитела. Методы. Москва, 1991. С. 33-133.
2. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Ленинград, 1986. С. 173-174.
3. Вершигора А.А. Основы иммунологии: руководство. Киев, 1980. С. 92-200.
4. Кислых Е. Н., Максименко Е. В., Сергеева Т. А., Шагинян В. Р. Ошибки иммуноферментной диагностики. *Лабораторная диагностика*, 2005. Вып. 4 (34). С.43-49.
5. Скоупс Р. Методы очистки белков Москва. 1985. 341 с.
6. Immunoassays. A practical approach. Oxford University Press, 2000. 52 p.
7. Nowotny A. Basic exercises in immunochemistry. Springer-Verlag, 1979. P. 1-3.

References:

1. Cathy D. (1991), Antibodies: methods [Антитела. Методы]. Moscow, pp.33-133. (in Russian)
2. Bulatov M. And Kalinkin I. (1986), Practical guide for fotometric methods of analysis [Praktyčeskoe rukovodstvo po fotometryčeskym metodam analiza]. Leningrad, pp. 173-174. (in Russian)
3. Vershygora A. A. (1980), Basis of immunology: guide [Основы ymmunolohyy: rukovodstvo]. Kiev, pp. 92-200. (in Russian)
4. Kislykh E. N., Maximenok E. V., Sergeeva T. A. and Shaginyan V. R. (2005), "Mistakes of Elisa diagnostics" [Ošybky ymmunofermentnoj dyahnostyky.], *Laboratory diagnostics*. Is. 4 (34), pp. 43-49. (in Russian)
5. Scoups P. (1985), Methods of purification of proteins [Metody očystky belkov], Moscow, 341 p. (in Russian)
6. Immunoassays. A practical approach (2000), Oxford University Press, 52p.
7. Nowotny, A. (1979), Basic exercises in immunochemistry. Springer-Verlag, pp. 1-3.

Дубин Р. А., Шарандак П. В., Улько Л. Г. Усовершенствование реакции диффузной преципитации для выявления метапневмовируса птицы.

В статье представлены результаты исследований, по усовершенствованию реакции диффузной преципитации для выявления метапневмовируса птицы. С помощью преципитации сульфатом аммония в гипериммунной сыворотке выделен специфический глобулин. Определены его концентрацию и диагностические показатели. Получены данные о неэффективности использования хлороформа и петролейного эфира для очистки эмбрионального антигена метапневмовируса птицы от желтка.

Ключевые слова: метапневмовирус птицы, реакция диффузной преципитации, иммуноглобулины.

Dubin R.A., Sharandak P.V., Ulko L. G. Improvement of the diphysic precipitation reaction for detection of metapneumovirus of the bird.

The article presents the results of studies on the improvement of the diffuse precipitation reaction for the detection of metapneumovirus of a bird. With the precipitation of ammonium sulfate in hyperimmune serum, a specific globulin was isolated. Its concentration and diagnostic indices are determined. Data on the inefficiency of the use of chloroform and petroleum ether for purification of the embryonic antigen of the metapneumovirus of poultry from yolk have been obtained.

Keywords: bird metapneumovirus, diffuse precipitation reaction, immunoglobulins.