

включён в пищевую цепь и передан значительному количеству животных.

Таким образом, хотя в настоящее время на территории Республики Беларусь не зарегистрировано ни одного случая ГЭ КРС, но имеется небольшая вероятность того, что данное заболевание имеет место на её территории.

УДК 619:578.894:636.22/8

П.А.Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор,
С.В.Бойчук, младший научный сотрудник.
РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.
С.Н. Вышелесского НАН Беларуси», г. Минск, Бела-
русь.

МОДИФИКАЦИЯ ПОСТАНОВКИ ИММУНОБЛОТИНГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Прионные инфекции представляют собой медленно прогрессирующие заболевания крупного рогатого скота с необыкновенно длинным инкубационным периодом, преимущественным поражением нервной системы и неизбежным летальным исходом. Характерным признаком прионных инфекций является обнаружение дистрофических изменений с вакуолизацией нейронов в головном мозге, что делает мозговую ткань похожей на губку. Прионным инфекциям подвержены многие виды животных и человек [1, 2].

Особенностью возбудителей прионных инфекций животных является их очень малые размеры, имеющие молекулярную массу 28–30 килодальтон (KD) и высокую устойчивость к химическим и физическим факторам. В ткани мозга и селезенке белки PrP^{27–32} KD полимеризуясь образует специфичные фибриллы, получившие название скрепи-ассоциированные фибриллы. При очистке *in vitro* (в пробирочных условиях) белки PrP^{27–32} KD образуют прионовые палочки. Выявление этих структур

возможно при проведении диагностических исследований. Возбудитель представлен только белком без нуклеиновой кислоты и поэтому выдерживает кипячение, многократное замораживание и оттаивание, не гибнет в течение 30 минут при 115 °С, в течение 1 часа при 90 °С, не полностью инактивируется при 100°С, когда освобожден от стабилизирующих белков, но инактивируется автоклавированием (18 минут при 134–138 °С или при том же режиме 6 циклов по 3 минуты). Возбудители выдерживают несколько месяцев воздействие 12%-ного формалина и рН от 2 до 10,5. В 20%-ном растворе формалина инфекционность не утрачивается 18 часов при 37 °С. В замороженном состоянии агенты сохраняются годами, при комнатной температуре – несколько месяцев. Прионы резистентны к ультрафиолетовой радиации. 90%-ный водный раствор фенола, 8 М раствор мочевины и 0,01 М раствор перйодата калия существенно снижают их активность [2].

Для предупреждения развития эпизоотий прионных инфекций необходимо проводить систематические диагностические исследования по их выявлению. В настоящее время для лабораторной диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота применяется 4 основных метода исследований: гистологический, иммуногистохимический, электронномикроскопический, иммунологический (ИФА, иммуноблотинг и хемилюминисцентный методы)). Важное место отводится методу биопробы, однако его применение ограничено чрезвычайно длительным инкубационным периодом ГЭ КРС – 3 и более месяцев [3,4].

На практике наиболее широко применяется метод иммуноблотинга, что связано, прежде всего, с его высокой чувствительностью и специфичностью [5, 6]. Традиционно для диагностики прионных инфекций методом иммуноблотинга используется хемилюминисцентная модификация данного метода, включающая в себя этапы детекции хемилюминисцентного сигнала при помощи рентгеновской плёнки с её последующей проявкой. Постановка иммуноблотинга в данной модификации требует наличия специального оборудованного помещения (фотолаборатории), специального оборудования для проявки плёнки, самой плёнки и реактивов. В то же время существует вариант постановки реакции иммуноблотинга с применением хромогенных

субстратов (диаминобензидин), который проще технически и не требует дополнительных затрат.

Целью настоящего исследования являлась разработка метода диагностики прионных инфекций методом иммуноблотинга с использованием хромогенной субстратной смеси.

Материалы и методы. В качестве антигена при сравнении двух модификаций постановки реакции иммуноблотинга использовали мозг хомяков, заражённых штаммом скрепи 263К в различных разведениях – от 1:2 до 1:128, а также рекомбинантный прионный белок крупного рогатого скота из набора тест-системы Prionixs-Check производства AG Prionixs (Швейцария).

Постановку иммуноблотинга проводили в соответствии с указанием по применению тест-системы Prionixs-Check в следующей последовательности:

Гомогенизация, ферментное разрушение белков, денатурация прионов, электрофорез, блотинг, обработка моноклональными или моноспецифическими антителами, обработка конъюгатами, обработка субстратной смесью, учет результатов.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований при использовании конъюгата со щелочной фосфатазой отрицательные пробы не дают сигнала, либо наблюдается темная чёрточка протеиназы в районе 31 kDa, а положительные – дают тёмную линию в районе 27 – 30 kDa (рис.1).

При использовании конъюгата с пероксидазой после обработки субстратной смесью мембрана приобретает светло-коричневую окраску за счёт взаимодействия с субстратной смесью не специфически связавшегося с мембраной конъюгата. Маркеры молекулярной массы видны в виде белых полос на светло-коричневом фоне. Отрицательные пробы не дают специфического сигнала в виде тёмной линии, наблюдается светлая чёрточка протеиназы в районе 31 kDa, положительные пробы дают тёмную линию в районе 27 – 30 kDa (рис.2).

При сравнении интенсивности полученного сигнала при исследовании двумя модификациями метода иммуноблотинга различных разведений положительных проб мозга установлено, что при применении хемилюминесцентной модификации иммуноблотинга удавалось определить положительные пробы в разведении 1:64 – 1:128. При постановке иммуноблотинга с

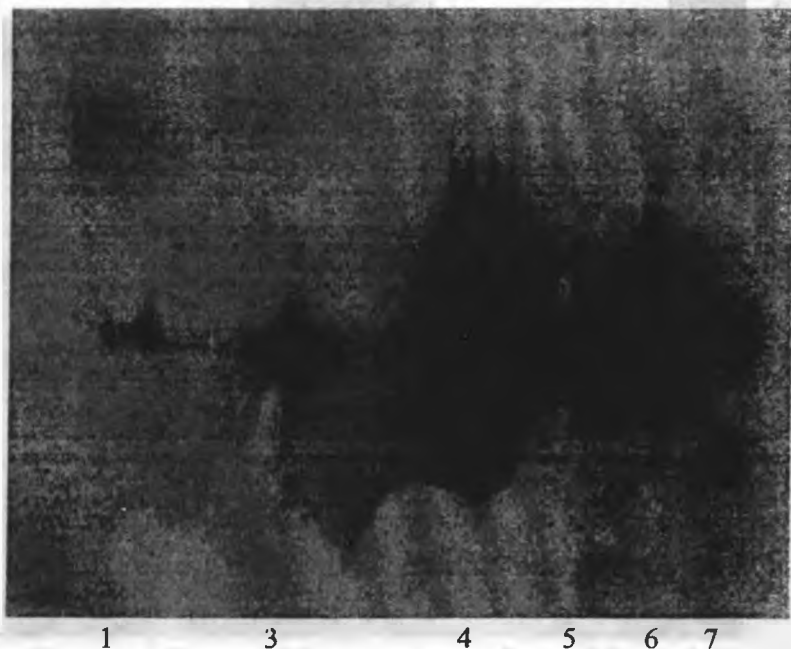


Рис. 1. Иммуноблоттинг положительной и контрольной проб головного мозга крупного рогатого скота с использованием хемилюминисцентного субстрата.

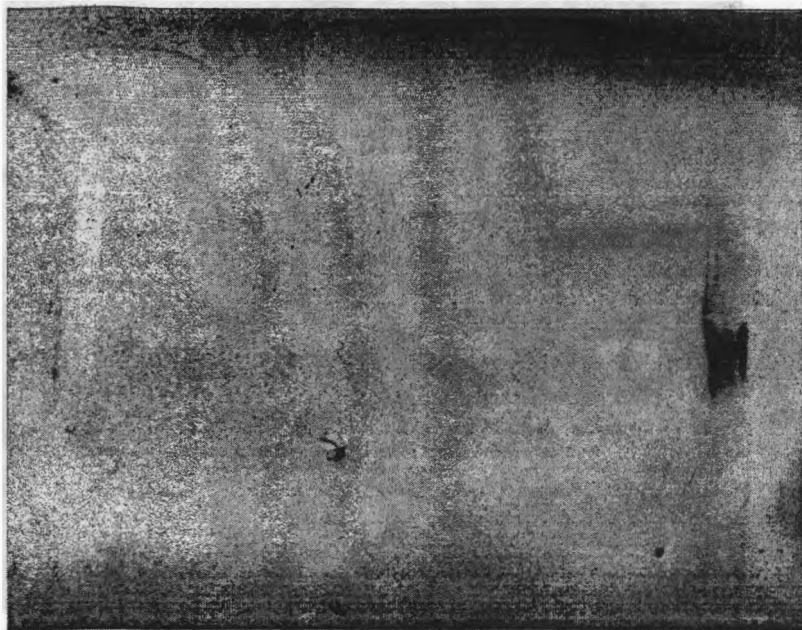
6 – положительный контроль.

1,2,3,4,5,7 – мозг зараженных возбудителем скрепи хомяков.

хромогенным субстратом чувствительность была несколько ниже – положительные пробы удавалось определить в разведении 1:16 – 1:32. Тем не менее, без разведения, все положительные и отрицательные пробы были правильно определены обеими модификациями метода иммуноблоттинга. Таким образом, для диагностики прионных инфекций могут применяться обе модификации метода иммуноблоттинга.

Выводы.

Использование хемолюминисцентного и хромогенного субстратов при постановке иммуноблоттинга, используемого для диагностики прионных инфекций, позволяет выявлять наличие прионов в исследуемом материале.



1 3 3 3 3 3 3 3 3 2

Рис. 2. Иммуноблоттинг положительной и контрольной проб головного мозга крупного рогатого скота с использованием хромогенного субстрата.

1 – положительный контроль, 2 – мозг зараженных возбудителем скрепи хомяков, 3 – отрицательные пробы.

Литература.

1. Авилов А. М., Яроменко Н. А., Караваев Ю. Д. Подострые спонгиозные энцефалопатии животных // *Ветеринария*. – 1997. – № 11 – С.35–37.

2. Гусева Е. В., Сатина Т. А., Рыбаков С. С. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. – Владимир: ОКНИИ-иМС, 1997. – 91 с.

3. Farquahar C. F., Somerville R. A., Ritchie L. A. Postmortem immunodiagnosis bovine spongiform encephalopathy. // *J. Virol. Methods*. – 1989. – Vol. 24. – P. 215 – 222.

4. Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. Mohri S., Farwuhar C. F., Somerville R. A. e. a. // Vet. Rec. – 1992. – Vol 131, № 23. – P. 537 – 539.

5. Immunodiagnosis of bovine spongiform encephalopathy. Pocchiari M., Xi Y. G., Ingrosso L. e. a. // Livestock Prod. Sci. – 1994. – Vol. 38, №1. – P. 41 – 46.

6. Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. Prusiner S. B., Fuzi M., Scott M. e. a. // J. Infect. Dis. – 1993. – Vol. 167. – P. 602 – 613.

Резюме.

В статье описана разработанная нами методика диагностики ГЭ КРС методом иммуноблотинга с использованием пероксидазного конъюгата и диаминобензидаина в качестве субстрата в сравнении с традиционным хемиллюминесцентным вариантом.

УДК 619:578.894:636.22/8

П.А.Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор,

С.В.Бойчук, младший научный сотрудник.

Н.Н.Полещук, доктор медицинских наук,

С.П.Капитулец, кандидат биологических наук,

Н.Н.Капитулец, кандидат биологических наук.

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.

С.Н. Вышелесского НАН Беларуси».

ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь»,

г.Минск, Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДИАГНОСТИКЕ ПРИОННЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Прионные инфекции – группа заболеваний, вызываемых прионами, характеризующихся преимущественным поражением нервной системы, длительным инкубационным периодом и