

И.Ю. Богатова, аспирантка

Витебская государственная академия ветеринарной медицины

УДК 619:616.98:578.828.11Л:636.22/28

Диагностический препарат при лейкозе крупного рогатого скота на основе флуоресцирующих Fab₂-фрагментов антител

Описан метод получения Fab₂-фрагментов антител, их мечение ФИТЦ и использование в диагностике лейкоза крупного рогатого скота с помощью метода иммунофлуоресценции.

Флуоресцирующие Fab₂-фрагменты IgG позволяют увеличить разрешающую способность иммунофлуоресцентного анализа. Предлагаемый метод определения инфицированных лимфоцитов при лейкозе крупного рогатого скота является относительно простым, высокоспецифичным и дает возможность выявлять самую раннюю стадию болезни

The method of receiving Fab₂-fragments of antibodies, their marking by FITC and using in diagnostics of Bovine Leukosis with the help of the method of immunofluorescence is described.

Fluorescent Fab₂-fragments of IgG permit to increase the allowing ability of immunofluorescent analysis. The proposed method of determination of infected lymphocytes during Bovine leukosis is simple, high-specific and gives the possibility to diagnose the early stage of a disease

Метод флуоресцирующих антител (МФА) сыграл значительную роль в развитии современных представлений о внутриклеточном паразитизме вирусов: изучены особенности первичной стадии их взаимодействия с клеткой, место и время появления специфических вирусных антигенов и т.д. По этому вопросу опубликовано более 500 новых работ [1]. МФА при лейкозе крупного рогатого скота был проведен в 1961-1969 гг. еще до того, как был обнаружен вирус [2]. Недостатком этого метода является субъективность при оценке реакции, особенно при дифференцировке слабopоложительных реакций от отрицательных. Оказалось, что дело все в том, что для этой реакции авторы использовали цельные иммунные сыворотки. А как известно, лимфоциты, в которых репродуцируется вирус лейкоза, на своей поверхности имеют рецепторы к Fc-фрагменту антител и флуоресцирующее антитело может присоединяться к лимфоциту через этот рецептор [3]. Все это и приводит к неправильной интерпретации результатов. Новые перспективы в этом направлении открывают возможности использования Fab₂-фрагментов антител. В доступной нам литературе это направление не отражено. Имеются лишь отдельные сообщения в медицинской литературе [4], где показаны определенные преимущества этого метода. Все это и послужило нам для поиска новых путей совершенствования диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Целью настоящих исследований явилось определение возможности использования Fab₂-фрагментов антител в иммунофлуоресцентном методе для индикации антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота на лимфоцитах крови животных, больных лейкозом.

Материал и методы. В работе использовали IgG против вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), полученный по методу [5]. Очищенный препарат IgG диализовали против 0,1М ацетатного буфера с pH-4,3. Затем к нему добавляли кристаллический пепсин в соотношении глобулин-пепсин 50:1 и доводили pH до 4,3 1М раствором уксусной кислоты. Смесь оставляли на водяной бане при 37°C на 14 часов, затем охлаждали во льду. Осадок, который может образоваться во время реакции, удаляли центрифугированием и доводили pH до 8,0 с помощью 1М раствора NaOH (при этом значении pH пепсин инактивируется). После такой обработки молекула IgG расщепляется на Fab₂-фрагмент и Fc-фрагмент. Fc-фрагмент (цитофильный) удаляли из раствора с помощью стафилококкового реагента производства НИИ им. Л.Пастера (г. Санкт-Петербург), который обладает способностью связывать Fc-фрагмент с помощью протеина А. Стафилококковый реагент готовили, придерживаясь рекомендаций изготовителя.

В предварительных опытах определили оптимальное соотношение стафилококкового реагента и фрагментированного иммуноглобулина. Оказалось, что оно равно 8-10 : 1 (табл.).

Для выделения Fab₂-фрагментов использовали осадок стафилококка после последнего центрифугирования. К нему добавляли фрагментированный IgG в соотноше-

нии 8:1. Взвесь тщательно встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 2-3 часа. За это время происходит связывание Fc-фрагментов IgG со стафилококком. Если даже ферментализ прошел не полностью и остались целые молекулы IgG, они свяжутся со стафилококком и будут удалены из раствора. В дальнейшем смесь центрифугировали, осадок оставляли, а надосадочная жидкость - это и есть Fab₂-фрагменты антител.

Затем проводили метку этих фрагментов флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Для этого в растворе белка определяли его концентрацию и охлаждали во льду, доводили pH до 9,0 с помощью 0,1М Na₂CO₃. Необходимую навеску ФИТЦ (10 мкг на 1 мг белка) готовили непосредственно перед опытом, растворяли ее в минимальном количестве 0,1М раствора Na₂CO₃ и добавляли к раствору белка, осторожно перемешивая. Все это ставили на ледяную баню. В реакционной смеси поддерживали pH ближе к 9,0, при необходимости добавляя 0,05М раствор карбоната натрия. Если pH смеси не изменилось в течение 15 мин., сосуд закрывали пробкой и оставляли во льду при легком помешивании на 18 часов в защищенном от света месте. После окончания реакции смесь центрифугировали, чтобы удалить образующийся иногда осадок. Затем проводили диализ против физраствора для удаления несвязавшегося красителя, определяли рабочий титр флуоресцирующей сыворотки и использовали для обнаружения антигенов ВЛКРС на лимфоцитах периферической крови.

С этой целью использовали по 50 проб крови от РИД-положительных, РИД-негативных и гематологически больных животных. Кровь получали с использованием трилона-Б, готовили мазки, фиксировали охлажденным ацетоном в течение 10 мин. Затем на мазки наносили по 2-3 капли флуоресцирующих Fab₂-фрагментов, покрывали покровным стеклом и помещали в условия влажной камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой) при t-37°C на 30 мин. Мазки тщательно промывали физиологическим раствором, высушивали на воздухе и просматривали под люминесцентным микроскопом.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что в мазках крови от гематологически больных и РИД-положительных животных на лимфоцитах отчетливо определяются гранулы вирусного антигена (рис. 1.2.). При этом их расположение на поверхности лимфоцитов самое разное. В одних случаях они определяются на всей поверхности лимфоцита,

Таблица. Выделение и очистка Fab₂-фрагментов IgG при различных количественных соотношениях стафилококк : глобулин

Объемные соотношения стафилококк : глобулин	Выход Fab ₂ -фрагментов IgG	
	До элюции Fc-фрагментов (мг/мл)	После элюции Fc-фрагментов (мг/мл)
1:1	17,4	16,8 ± 0,04
2:1	17,4	14,5 ± 0,06
4:1	17,4	9,7 ± 0,09
8:1	17,4	6,3 ± 0,1
10:1	17,4	6,3 ± 0,1

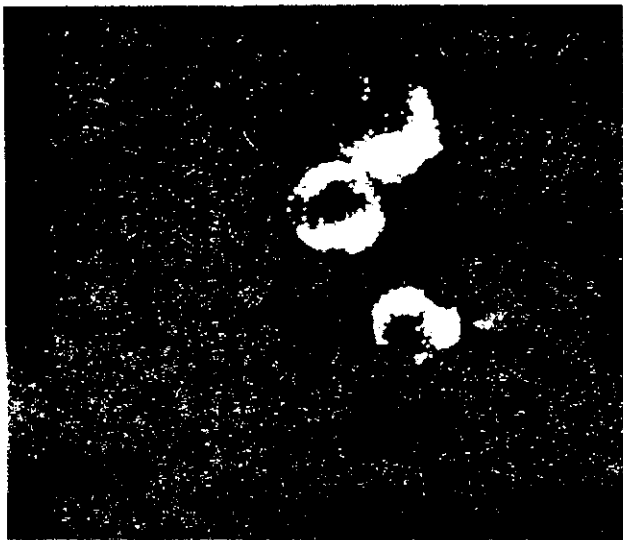


Рис. 1. Антиген ВЛКРС на лимфоцитах периферической крови. Метод флуоресцирующих антител X 900.

в других - в одном каком-то месте. Интенсивность флуоресценции в положительных препаратах довольно высокая (+++ или ++++). Лимфоциты, не содержащие антигены ВЛКРС, практически не светятся, т.е. отсутствует наведенная неспецифическая иммунофлуоресценция.

В препаратах крови от гематологически положительных животных (50 проб) отмечена 100%-ная совпадаемость результатов. При этом процент инфицированности лимфоцитов колеблется в широких пределах (50-80%). В мазках крови от РИД-положительных (50 проб) животных получен аналогичный результат совпадаемости (100%), но процент инфицированности лимфоцитов ниже (30-50%). В группе РИД-негативных животных (50 проб) определяется 10 ± 5 проб инфицированных животных. Однако процент инфицированности лимфоцитов еще ниже (5-10%).

Исследования показали, что метод иммунофлуоресценции, сочетающий высокую чувствительность люминесцентного анализа с высокой специфичностью серологического, находит все более широкое применение в практике вирусологических лабораторий. Однако интерпретация получаемых при этом результатов нередко бывает затруднена, ввиду того что флуоресцирующие антитела обладают способностью вызывать неспецифическое свечение, особенно при работе с лимфоцитами.

Неоднократно предлагались различные методы подавления неспецифического свечения, среди которых наиболее эффективным является прием контрастирования. Но и этому приему присущи недостатки. Оказалось, что неспецифическое свечение обусловлено наличием рецепторов на лимфоцитах к Fc-фрагменту IgG. Если убрать цитофильные концы IgG, то получаем диагностический препарат, не обладающий неспецифическим свечением. Это позволит не прибегать к дополнительным методам устранения неспецифического свечения и повысить специфичность выявления определяемого антигена. Прове-

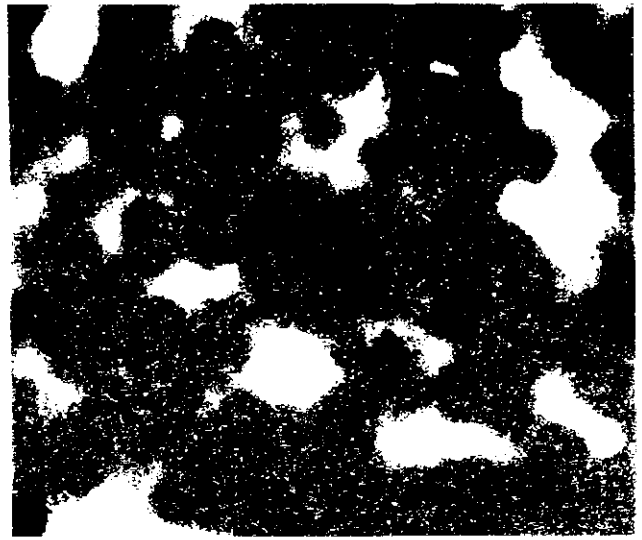


Рис. 2. Отсутствие антигена на лимфоцитах периферической крови. Метод флуоресцирующих антител X 900.

денными исследованиями экспериментально обоснована перспективность применения Fab₂-фрагментов антител для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Выводы:

1. Описана методика получения Fab₂-фрагментов антител к ВЛКРС.
2. Установлено, что флуоресцирующие Fab₂-фрагменты антител позволяют существенно увеличить разрешающую способность иммунофлуоресцентного анализа, поскольку они практически не вызывают неспецифическую флуоресценцию.
3. Предлагаемый метод определения инфицированных лимфоцитов при лейкозе крупного рогатого скота является относительно простым, высокоспецифичным и дает возможность выявлять самую раннюю стадию болезни.

Литература

1. Носков Ф.С. Метод флуоресцирующих антител/ Под ред. Т.В.Перадзе, П.Халонена. -Москва: Медицина, 1985. - С.250-280.
2. Нахмансон В.М. Лейкоз крупного рогатого скота-Москва: Россельхозиздат, 1986. - 221с., ил.
3. Иммунология: В 3 т. Пер. с англ./ Под ред. У.Пола-Москва: Мир, 1987-1988- Т.1- 476 с.
4. Fab-фрагменты иммуноглобулинов / П.С.Барбан, В.М.Минаева, А.Н.Паптюхина, М.Г.Старцева // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. — 1976. — № 6. — С.51-57.
5. Богатова И.Ю. Очистка IgG с помощью стафилококкового реагента, содержащего протсин A// Ветеринарные и зооинженерные проблемы в животноводстве и научно - методическое обеспечение учебного процесса: Материалы II международной научно-практической конференции, г. Витебск, 25-23 сентября 1997 г./Мин-во с.-х. и прод. РБ; Вит. гос. акад. вет. мед. - Минск, 1997. - С.173-174.