

На правах рукописи



ЯРУЛЛИН АЙНУР ИЛЬНУРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРВОВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1 0 ДЕК 2009

Казань – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань)

Научный руководитель: **Заслуженный деятель науки РФ и РТ,
доктор ветеринарных наук, профессор
Гаффаров Харис Зарипович**

Официальные оппоненты: **доктор ветеринарных наук, профессор
Фаизов Тагир Хадиевич**

**доктор биологических наук, профессор
Ильинская Ольга Николаевна.**

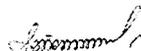
Ведущее учреждение: **Всероссийский научно-исследовательский и
технологический институт биологической
промышленности**

Защита состоится «22» декабря 2009 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (420075, г.Казань, Научный городок-2, ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань)

Автореферат разослан «21» ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат ветеринарных наук



В.И.Степанов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. В структуре заболеваемости сельскохозяйственных животных наибольшее экономическое значение имеют респираторные, желудочно-кишечные болезни молодняка и патология органов воспроизводства маточного поголовья крупного рогатого скота (КРС), связанные с бесплодием, ранней эмбриональной смертностью и абортными, доминирующими возбудителями которых являются вирусы, относящиеся к различным таксономическим группам (Гаффаров Х.З., 1983; Иванов А.В., 2008).

Среди них по тяжести проявления клинической картины на первый план выходят герпесвирусная инфекция (ИРТ), вирусная диарея – болезнь слизистых (ВД-БС) крупного рогатого скота, парвовирусная и реовирусная инфекции, вызывающие не только поражения органов дыхания и пищеварения у телят, но и нарушения функций репродуктивных органов коров и быков. Доказано, что сперма быков, инфицированных этими вирусами, служит источником заражения коров и телок (Крюков Н.Н. с соавт., 1988; Глотов А.Г. с соавт., 2006; Broderson B.W. et al., 1998; Mandy Elschner, 1994; David Sandals et al., 1995; Fulton R.W. et al., 2005).

Заслуживает внимание тот факт, что отечественные и зарубежные авторы придают большое значение в этиопатогенезе указанных выше форм патологий парвовирусу КРС, антигенно отличающийся от парвовирусов других видов животных и человека, вызывающий не только поражения органов пищеварения и дыхания у телят, но и нарушения воспроизводительной функции у коров (Сюрин В.Н., Фомина Н.В., 1979; David Sandals et al., 1995).

Парвовирусная инфекция КРС характеризуется широким географическим распространением среди естественно восприимчивых животных. Так, например, имеются сведения о выделении парвовируса в США, Европе, Северной Америке, Японии и в ряде других стран (Vincent J., 1971; Bachmann P. A., 1971; Storz J., Bates R., 1973; Inaba et. al., 1973; Крюков Н.Н. с соавт., 1988).

В лабораторной диагностике многих вирусных болезней широкое применение находит иммуноферментный анализ (ИФА) (Юсупов Р.Х., 2004; Khismatullina N.A., 2005; Юсупова Г.Р., 2009). Который особенно важен для выявления тех болезней, возбудители которых мало изучены, плохо размножаются в культурах клеток без видимого цитопатического действия (Мникова Л.А., Авилон В.С., Гоголев М.М., 1985; Кузнецов Д.П. с соавт., 1990).

Использование ИФА может иметь важное значение и для определения напряженности и прогнозирования длительности поствакцинального иммунитета у животных, а также изучения иммунного статуса в регионах, где проводилась вакцинация (Самуйленко А.Я. с соавт., 1988, 2006; Матвеева И.Н., 2006).

Однако до настоящего времени в РФ, по нашим представлениям, недостаточно раскрыта степень распространенности парвовирусной инфекции КРС, недооценивается этиологическая роль парвовируса при патологиях респираторно-кишечного тракта молодняка и нарушениях функций репродуктивных органов взрослого поголовья скота. На сегодняшний день

ветеринарная служба не располагает средствами, предназначенными для ретроспективной диагностики данной инфекции, созданными на основе достижений биотехнологии.

Поэтому особенно велика роль лабораторных исследований с использованием современных диагностических наборов на основе антигенных тест-систем иммуноферментного анализа.

Перечисленные выше нерешенные проблемы указывают на актуальность намеченных исследований.

1.2 Цель и задачи исследований. Целью данной работы явилась разработка тест-системы ИФА, предназначенной для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител, а также определение степени распространения этой инфекции в хозяйствах Республики Татарстан (РТ) и региона Среднего Поволжья. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить биологические, физико-химические свойства штамма «Parvo 32459» - возбудителя парвовирусной инфекции крупного рогатого скота;

2. Разработать технологию изготовления компонентов тест-системы ИФА, предназначенной для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител, и стандартизировать условия ее проведения;

3. Провести оценку активности, специфичности и воспроизводимости парвовирусной иммуноферментной тест-системы путем тестирования сывороток крови различных возрастных групп крупного рогатого скота и сравнительного изучения степени корреляции результатов, полученных методами аналогичной направленности (РВН и РТГА);

4. Определить диагностическую ценность иммуноферментной тест-системы, провести анализ и интерпретацию результатов испытания непрямой твердофазной ИФА;

5. Провести серологический мониторинг в отношении парвовирусной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах РТ и региона Среднего Поволжья.

1.3 Научная новизна работы. На основе результатов сероиммунологического мониторинга впервые представлены данные о степени распространения парвовирусной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах РТ и региона Среднего Поволжья.

Впервые в РФ разработана «Тест-система ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител». Оптимизированы условия ее проведения при исследовании сывороток крови животных взятых в одном разведении. Сравнительными исследованиями установлена чувствительность, специфичность и воспроизводимость диагностического иммуноферментного набора и выявлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью методов аналогичной направленности (РВН и РТГА).

1.4 Практическая значимость работы.

Внедрение разработанной тест-системы ИФА в практику ветеринарных лабораторий РФ позволит решить проблему как серологической диагностики парвовирусной инфекции КРС, так и оценки напряженности поствакцинального иммунитета.

Материалы исследований по разработке и применению тест-системы ИФА вошли в научно-нормативные документы.

1.5 Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на: научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные проблемы ветеринарии» - ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань, 2007); международной научно-практической конференции, посвященной 135-летию Казанской государственной академии ветеринарной медицины (КГАВМ) «Современные подходы развития АПК» (Казань, 2008); международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ВНИИВВиМ «Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных» (Покров, 2008).

1.6 Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, в т.ч. 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

1.7 Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Характеристика биологических и физико-химических свойств штамма «Parvo 32459» - возбудителя парвовирусной инфекции крупного рогатого скота.

2. Технология изготовления специфических компонентов тест-системы ИФА для серологической диагностики и определения уровня поствакцинальных антител.

3. Оценка диагностической ценности иммуноферментной тест-системы, анализ и интерпретация результатов испытания набора.

4. Результаты серологического мониторинга в отношении парвовирусной инфекции КРС в хозяйствах РТ и в ряде хозяйств соседних республик и областей.

1.8 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, библиографический список использованной литературы, состоящий из 240 источников, в том числе 168 иностранных авторов и приложение. Диссертация содержит 24 таблицы и иллюстрирована 4 рисунками.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2006-2009 гг. в лаборатории вирусологии ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань № госрегистрации 01200202602) и в ряде сельскохозяйственных предприятий республики Татарстан, неблагополучных по респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям молодняка и взрослого поголовья крупного рогатого скота, проявляющие признаки поражений репродуктивных органов.

Отдельные этапы работы были выполнены с участием с.н.с., к.в.н. М.А. Ефимовой, в.н.с., к.в.н. В.Г. Гумерова, которым выражаю искреннюю признательность.

Серологическому исследованию было подвергнуто 1680 проб сывороток крови крупного рогатого скота из 43 сельскохозяйственных предприятий, находящихся на территории республики Татарстан и соседних республик Среднего Поволжья, из них 31 – в Республике Татарстан, 4 – в Республике Башкортостан, 2 – в Чувашской Республике и 6 – в Нижегородской области, неблагополучных по вирусным респираторно-кишечным заболеваниям молодняка и нарушением функции репродуктивных органов взрослого поголовья. Анализ эпизоотической ситуации проводили согласно рекомендациям, разработанным И.А. Бакуловым с соавт. (1975) и С.И. Джупина (1991).

Серологические исследования 1680 проб сывороток крови КРС и 50 проб сывороток крови кроликов осуществляли с использованием РТГА и с помощью непрямого варианта ИФА.

Вирусологическим исследованиям подвергались 15 проб паренхиматозных органов от павших животных.

В работе применяли штамм «Parvo 32459» парвовируса крупного рогатого скота, полученный из ЦВЛ МСХ Великобритании.

В экспериментах использовали: двух телят массой 40-45 кг; одного теленка шести-месячного возраста массой 150-200 кг; 15 кроликов массой 2,0-2,5 кг; 25 морских свинок, массой 0,25-0,3 кг.

Культивирование парвовируса крупного рогатого скота (шт. «Parvo 32459») и накопление вирусной массы проводили на первично-трипсиинизированной культуре клеток почек эмбриона коровы (ПЭК).

Определение гемагглютинирующей активности парвовируса крупного рогатого скота проводили в реакции гемагглютинации (РГА), которую проводили по общепринятой методике.

Чувствительность парвовируса крупного рогатого скота к действию физико-химических факторов изучали воздействуя на него: хлороформом, эфиром, 1%-ным трипсином, прогреванием при 56°C в течение 1 ч и изменением pH в диапазоне 6,0-8,0, ультразвуком при частоте 20kHz±500Гц в течение 1, 2 и 3-х часов.

Чувствительность вируса к эфиру определяли по методу Andrewes и Horstman (1949).

Чувствительность вируса к хлороформу проверяли по методу Feldman и Wang (1961).

Действие трипсина на парвовирус исследовали добавлением в поддерживающую среду трипсина до конечной концентрации 1% и выдерживали вирусную суспензию в течение 1 ч при $+37\pm 1^\circ\text{C}$.

Резистентность вируса к изменениям уровня pH определяли воздействием буферных растворов с разными показателями pH в течение 2 ч при $+37\pm 1^\circ\text{C}$.

Воздействие ультразвука на парвовирусную суспензию проводили на ультразвуковом дезинтеграторе «Bandelin GM3100» (Германия) при частоте $20\text{kHz}\pm 500\text{Гц}$ в течение 1, 2 и 3-х ч с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин для освобождения от клеточного детрита.

Патогенность штамма парвовируса «Parvo 32459» изучали на естественно восприимчивом животном – теленке, путем заражения его осветленной вирусной суспензией с активностью 1:8192 в РГА орально в объеме 50 см^3 и 5 см^3 - внутривенно.

Опыты по инаktivации вирусной суспензии проводились в сравнительном аспекте с формалином, метилглиоксалем и 1,2-аминоэтилазиридином (димер) в различных концентрациях и времени экспозиции.

За основу разрабатываемой иммуноферментной тест-системы взят стандартный вариант непрямого твердофазного ИФА.

Наиболее важными этапами нашей работы были:

- получение и иммунохимическая характеристика основных иммунологических реагентов, входящих в тест-систему;
- оптимизация условия проведения тест-системы ИФА при исследовании сывороток крови в одном разведении;
- определение диагностической ценности тест-системы ИФА по таким важным критериям, как специфичность, чувствительность и воспроизводимость;
- сравнительная оценка эффективности предложенной тест-системы и методов аналогичной направленности.

Антиген для проведения иммуноферментного анализа получали ультрацентрифугированием на «подушке» 20%-ной сахарозы.

Специфическую контрольную положительную сыворотку получали на теленке шестимесячного возраста, которому вводили возрастающую дозу очищенной культуральной суспензии парвовируса крупного рогатого скота с интервалом 14 дней.

Имуноферментный анализ (ИФА) проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах для иммунологических реакций из полистирола производства «Linbro», (США) по общепринятой методике (Егоров А.М. с соавт., 1991). Результаты реакции учитывали по показаниям оптической плотности при длине волны 490 нм (OP_{490}) на спектрофотометре «BIO-Rad Model 680» фирмы «BIO-Rad» (США).

Интерпретацию полученных результатов проводили по методу, описанному И.Н. Матвеевой (2008), путем вычисления коэффициента

связывания, отражающего содержание антител в испытуемой пробе по отношению к содержанию антител в положительном контроле.

Математически это выражается следующей формулой:

Ксв $\frac{-(ОП_{490}ИП_{ср}-ОП_{490}К_{-ср})}{(ОП_{490}К_{+ср}-ОП_{490}К_{-ср})} \times 100$

, где:

$\left. \begin{array}{l} ОП_{490} ИП_{ср}, \\ ОП_{490} К_{-ср} \\ ОП_{490} К_{+ср} \end{array} \right\}$ средние арифметические значения оптической плотности в лунках с испытуемой пробой, отрицательным и положительным контролями соответственно.

Пробу считали отрицательной, если величина Ксв менее 15%.

Если величина Ксв более 25% пробу считают положительной

Выявленные результаты исследований сывороток в этом диапазоне (от $\geq 15\%$ до $< 25\%$) следует считать сомнительными.

Комиссионные испытания были проведены в условиях лаборатории вирусологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и вирусологического отдела РВЛ при ГУВ КМ РТ.

Статистическую обработку результатов исследований проводили методом вариационной статистики с применением критериев достоверности по Стьюденту с использованием программы «Microsoft Office Excel».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение биологических и физико-химических свойств парвовируса крупного рогатого скота - шт. «Parvo 32459»

Для изучения гемагглютинирующей активности вируса использовали 1%-ные суспензии эритроцитов: коровы, барана, козы, морской свинки, петуха, кролика, белой мыши, крысы, кошки, собаки и человека О-группы. Реакцию гемагглютинации ставили в микроварианте по общепринятой методике. Результаты исследований показали, что наибольшие титры гемагглютининов парвовируса выявляются с эритроцитами морской свинки и человека О-группы при температуре $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Это определило дальнейшее их использование в опытах по выявлению уровня репродукции парвовируса КРС в культуральной жидкости инфицированных клеток и в патологических материалах, а также в серологических исследованиях в РТГА.

Чувствительность к действию физико-химических факторов

С этой целью в опытах определяли чувствительность парвовируса крупного рогатого скота на действие: хлороформа, эфира, 1%-го трипсина, прогревания в водяной при $+56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, действие рН в диапазоне от 6,0 до 8,0 и ультразвук при частоте $20\text{kHz} \pm 500\text{Гц}$ в течение 1, 2 и 3-х часов.

Помимо проявления ЦПД в опытах также оценивали действие вышеперечисленных факторов на инфекционный титр вируса и его гемагглютинирующую активность в РГА. Результаты исследований отражены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1- Действие физико-химических факторов на инфекционную и гемагглютинирующую активность парвовируса крупного рогатого скота шт. «Parvo 32459»

Действующий агент	Контроль		Опыт	
	ГА титр	Инфекционный титр (ТЦД ₅₀ /мл)	ГА титр	Инфекционный титр (ТЦД ₅₀ /мл)
Хлороформ	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{4,05}
Эфир	1:1024	10 ^{4,5}	1:1024	10 ^{4,25}
1% трипсин	1:1024	10 ^{4,4}	1:1024	10 ^{4,4}
t +56±1°C 1 час	1:1024	10 ^{4,0}	1:1024	10 ^{4,25}
Ультразвук 20kHz±500Гц	1ч	1:1024	4096	10 ^{5,2}
	2ч		8192	10 ^{6,5}
	3ч		1024	10 ^{4,05}

Таблица 2- Изучение резистентности шт. «Parvo 32459» парвовируса крупного рогатого скота к действию рН

рН	Контроль		Опыт	
	ГА титр	Инфекционный титр (ТЦД ₅₀ /мл)	ГА титр	Инфекционный титр (ТЦД ₅₀ /мл)
6,0	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{4,05}
6,2	1:1024	10 ^{4,5}	1:1024	10 ^{4,5}
6,8	1:1024	10 ^{4,5}	1:1024	10 ^{4,25}
7,0	1:1024	10 ^{4,4}	1:1024	10 ^{4,25}
7,8	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{4,25}
8,0	1:1024	10 ^{4,0}	1:1024	10 ^{4,0}

Из таблиц 1 и 2 следует, что использованные физико-химические факторы не влияют на репликацию парвовируса крупного рогатого скота и не снижают его инфекционной и гемагглютинирующей активности. Установлено, что действие ультразвуковых волн при частоте 20kHz±500Гц в течение 1, 2 и 3-х ч на парвовирус, содержащийся в культуральной суспензии, не изменяет его инфекционных свойств. Кроме того, действие ультразвуковых волн показало увеличение его гемагглютинирующей и инфекционной активности пропорционально увеличению времени экспозиции, что может быть связано с полным выходом внутриклеточного вируса, который в отличие от внеклеточного имеет более высокую гемагглютинирующую активность.

Изучение патогенности штамма парвовируса крупного рогатого скота (шт. «Parvo 32459»)

Первые клинические признаки заболевания у экспериментально зараженного теленка проявлялись на 2-3-и сут после введения вируса. Через 72 ч отмечали угнетение общего состояния, снижение пищевой возбудимости,

кратковременное повышение температуры тела до 40,7°C. Устанавливали также учащение пульса до 180 ударов и дыхания до 50 дыхательных движений в минуту.

Через 72 ч после заражения, у животного развилась диарея в виде полужидких фекалий темно-зеленого цвета с содержанием слизи, которые в дальнейшем становились водянистыми. Последующие 10 дней нарастали признаки обезвоживания, общее состояние животного ухудшалось. При патологоанатомическом вскрытии телят обнаружили признаки отека головного мозга, инъециацию сосудов коры больших полушарий. В тонком отделе кишечника поражения выражались десквамацией эпителиальных клеток ворсинок. Наблюдали геморрагический диатез стенок двенадцатиперстной и подвздошной кишки с гиперемией и изъязвлениями, а также дегидратацию. Мезентериальные лимфоузлы отечны, увеличены, на разрезе сочные. В просвете тонкого отдела кишечника скопление густой серовато-белого цвета тягучей массы.

Исследования по реизолации парвовируса крупного рогатого скота из патологического материала зараженного телят проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток ПЭК. Характерные для парвовируса цитопатические изменения культуры отмечались при заражении 10%-ной суспензией легких, участка тонкого отдела кишечника, поджелудочной железы, мезентериальных лимфоузлов. Они характеризовались округлением клеток с последующим развитием зернистости монослоя спустя 48 ч после заражения. Через 72-96 ч наблюдали разрушение монослоя и отслоение клеток от поверхности стекла.

При исследовании реизолированных цитопатогенных агентов в РГА с использованием эритроцитов морской свинки они проявили гемагглютинирующую активность в следующих титрах: в тонком отделе кишечника - 1:8, в поджелудочной железе - 1:32, в легких - 1:4, в брызжеечных лимфатических узлах - 1:16. В сыворотке крови зараженного телят на четвертые сутки выявляли антигемагглютинины к антигену парвовируса в титре 1:80, а на седьмые сутки после заражения этот показатель составил 1:320 и не снижался до конца опыта.

Таким образом, опыт показал, что штамм парвовируса «Parvo 32459» является патогенным для телят при внутривенном и пероральном методах заражения.

3.2 Разработка тест-системы ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител

3.2.1 Сравнительная оценка различных методов концентрирования и очистки антигена парвовируса крупного рогатого скота

Достоверность диагностики находится в зависимости от качества (активности и специфичности) используемых реагентов. Разработка различных по своему принципу методов очистки и концентрирования дала возможность достичь значительных успехов в области изучения свойств вирусов и их

структурных компонентов. Удаление из антигенного материала балластных примесей является важным условием повышения его специфичности. Это способствует повышению качества вакцин и диагностических препаратов.

Как известно, единой, общей схемы очистки и концентрирования различных видов вирусов не существует. На современном уровне методических возможностей биологической химии и вирусологии, разрабатываются конкретные для каждого типа или вида вирусов методики освобождения вирусосодержащего материала от сопутствующих балластных примесей. Разработка и выбор таких методов зависит, прежде всего, от природы вирусного материала, его чувствительности к различным физико-химическим воздействиям, а также от целевого назначения препарата.

Оптимальная технология культивирования и трехкратное замораживание позволяет получить парвовирус крупного рогатого скота с гемагглютинирующей активностью в пределах от 1024 до 4096 ГАЕ. Однако, для получения высокоактивного диагностического антигена парвовируса КРС необходимо было иметь вирус в высоких титрах. В связи с этим были отработаны режимы концентрирования и очистки парвовируса крупного рогатого скота. В нашей работе были апробированы три метода концентрирования: осаждение ПЭГ, ультрацентрифугирование на «подушке» 20%-ной сахарозы и концентрирование на ультрацентрифуге.

Перед концентрированием вирусной суспензии методами осаждения ПЭГ и ультрацентрифугирования ее освобождали от клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 45 минут, после чего проводили инактивацию вирусной суспензии 5%-ным раствором 1,2-аминоэтилазиридина в конечной концентрации его 0,1%.

Для концентрирования ультрацентрифугированием на «подушке» 20%-ной сахарозы, использовали клеточную массу после проявления ЦПД, которую предварительно инактивировали, а затем разрушали ультразвуком.

Сравнивая результаты экспериментов по концентрированию и очистке парвовируса КРС (шт. «Parvo 32459») можно сделать заключение, что оптимальным методом, из всех испытанных, для получения очищенного и концентрированного антигена является ультрацентрифугирование на «подушке» 20%-ной сахарозы (табл. 3).

Таблица 3 – Активность парвовируса крупного рогатого скота, концентрированного ультрацентрифугированием на «подушке» 20%-ной сахарозы (n=3; P<0,05)

№ п/п	Исследуемый материал	Активность в РГА, 1/n	Концентрация белка, мг/мл
1	Исходное вирусное сырье	2048	1,2±0,03
2	После инактивации	2048	1,0±0,02
3	После обработки ультразвуком	8192	1,1±0,02
4	После концентрирования	16384	0,9±0,03

Данный метод позволяет получать высокоочищенный и достаточно концентрированный (до 0,9 мг/мл) антиген с высоким (1:16384) уровнем гемагглютининов.

Достоверность результатов ИФА зависит от специфичности и активности не только антигена, но и контрольной положительной сыворотки. Для получения антисывороток проводят активную иммунизацию лабораторных и восприимчивых животных.

С этой целью нами проведена гипериммунизация теленка шестимесячного возраста возрастающей дозой очищенного культурального антигена парвовируса крупного рогатого скота с интервалом 14 дней. Кровь для исследований брали каждые 7 дней со дня иммунизации. Результаты исследований показали, что наиболее высокий уровень накопления специфических антител к парвовирусу КРС в сыворотке крови иммунизированного теленка наблюдается после второй иммунизации и составляет в РТГА 1:2560. При последующих иммунизациях уровень антител находился на том же уровне. В связи с этим, было принято решение проводить двухкратную иммунизацию с 14 дневным интервалом.

3.2.2 Стандартизация основных условий проведения исследований, разработанной тест-системой ИФА

С целью увеличения точности, чувствительности и уменьшения расходов реактивов, необходимо было, в первую очередь, подобрать оптимальные условия проведения реакции. Одним из основных требований в этом направлении является: определение температуры и времени инкубации специфических компонентов тест-системы в лунках полистироловых планшет; определение сенсibiliзирующей дозы антигена; подбор оптимальных условий адсорбции иммунной сыворотки и рабочего разведения контрольных сывороток и конъюгата.

Влияние концентрации антигена парвовируса крупного рогатого скота на результаты ИФА исследовали при содержании его 30, 15, 5, 3, мкг/мл. Результаты исследований показали, что максимальное значение коэффициента специфичности отмечается при адсорбции антигена парвовируса КРС в концентрации 3 мкг/мл. Использование других его концентраций приводило к снижению специфичности реакции.

Влияние температурного и временного факторов на сенсibiliзацию антигена в лунки иммунологических планшет изучали при +4 и +37°C при продолжительности контакта антигена с твердой фазой 18 и 3 ч соответственно. Результаты исследований показаны на рисунке 1.

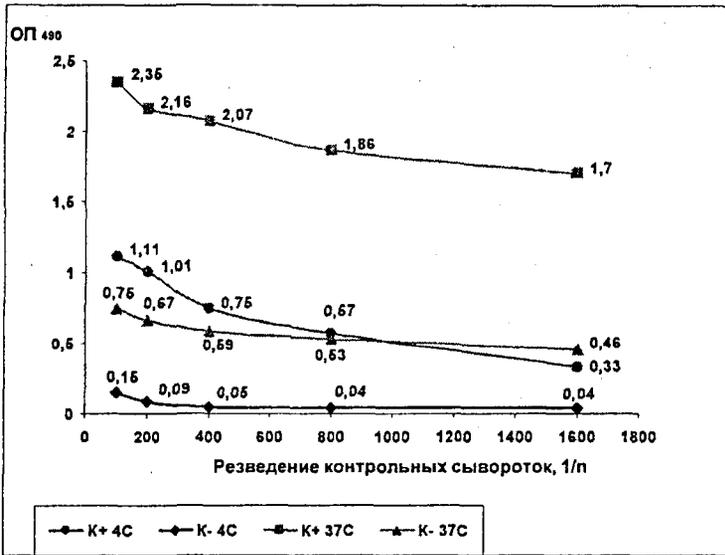


Рис. 1. Показатели ОП контрольных сывороток в лунках сенсibilизированных антигеном парвовируса в концентрации 3мкг/мл при +4 и +37°C в течение 18 и 3 ч соответственно.

При разработке иммуноферментных наборов, в которых для исследования используется одно разведение исследуемой сыворотки, важным является подбор условий сорбции иммунной сыворотки на сенсibilизированном антигеном планшете. Для этого в иммобилизованные антигеном лунки планшета вносили контрольные сыворотки в разведениях от 1:100 до 1:12800. Конъюгат использовали в рабочем разведении 1:5000, которое было определено в предварительных экспериментах методом «шахматного» титрования. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Подбор условий сорбции контрольных сывороток на иммобилизованный антигеном парвовируса планшет ($n=3$; $P<0,05$)

Продолжительность взаимодействия антиген-антитело, ч	Титры антител 1/n	Ксп
0,5	1600	2,71±0,03
1	6400	2,80±0,02
2	12800	3,53±0,07
3	3200	2,60±0,02

Оптимальной концентрацией антигена и рабочими разведениями компонентов иммуноферментной тест-системы считали их конечные значения, обеспечивающие в лунках с положительной контрольной сывороткой ОП₄₉₀ > 0,750, а в лунках с отрицательной - ≤ 0,05. Из рисунка 1 и таблицы 4 видно, что

данным условиям отвечают следующие параметры реакции: концентрация антигена - 3 мкг/мл, разведения контролей - 1:400 и рабочее разведение конъюгата - 1:5000. Оптимальным временем для адсорбции антигена была 18-ти часовая его инкубация при $+4\pm 1^\circ\text{C}$, для сывороток это время составило 2 ч при $+37\pm 1^\circ\text{C}$.

Для учета и интерпретации результатов, полученных набором ИФА, было необходимо определить позитивно-негативный порог тест-системы. С этой целью были проведены исследования по определению закономерностей распределения значений ОП_{490} и коэффициента связывания (Ксв.) вирусотрицательных и положительных сывороток, т.е. порогового значения («cut off») или позитивно-негативный порог - ПНП), разграничивающего положительную и отрицательную реакции.

В первом эксперименте было использовано 56 сывороток крови коров, не содержащих вируснейтрализующих антител к антигену парвовируса и 48 сывороток крови животных, иммунизированных ассоциированной вакциной против парво-, реовирусной, герпесвирусной типа I инфекций и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной, с различным уровнем специфических антител в РВН. Отрицательные и положительные сыворотки исследовали в четырех разведениях 1:100, 1:200, 1:400; 1:800 каждая сыворотка крови, взятая в определенном разведении, проверялась в трех параллельных лунках.

Перед учетом реакции по формуле, приведенной ниже, высчитывали среднее значение ОП_{490} для каждой испытуемой пробы. Относительное содержание вирус-специфических антител в положительных пробах определяли по: а) титру антител, т.е. по конечному разведению испытуемой пробы, превышающему ОП_{490} отрицательного контроля в 2,1 раза и б) коэффициенту связывания (Ксв.) отражающему содержание антител в испытуемой пробе по отношению к содержанию антител в положительном контроле.

Математически это выражается следующей формулой:

$$\text{Ксв} = \frac{(\text{ОП}_{490}\text{ИП}_{\text{сп}} - \text{ОП}_{490}\text{К}^-_{\text{сп}})}{(\text{ОП}_{490}\text{К}^+_{\text{сп}} - \text{ОП}_{490}\text{К}^-_{\text{сп}})} \times 100$$

где: ОП_{490} $\text{ИП}_{\text{сп}}$, ОП_{490} К^- и $\text{ОП}_{490}\text{К}^+$ - средние арифметические значения оптической плотности в лунках с испытуемой пробой, отрицательным и положительным контролями соответственно.

Проведенные исследования показали, что для получения достоверных результатов в разработанной тест-системе, испытуемые пробы сывороток крови КРС необходимо исследовать в разведении аналогичном контролям, т.е. 1:400.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что при значении ОП_{490} положительного и отрицательного контролей 0,58-0,869 и 0,05-0,068 соответственно, величина ОП_{490} всех заведомо отрицательных проб была в пределах 0,04-0,071, при этом значения Ксв. составляли от -2 до 15. В заведомо положительных сыворотках крови значение ОП_{490} превышало 0,53, а значения Ксв. были от 25 до 66.

При изучении зависимости значения Ксв. от титра вирусспецифических антител в положительных пробах была установлена положительная корреляция между двумя показателями ($r = 0,69$, $P < 0,05$).

Далее были проведены расширенные исследования по определению закономерности распределения значений Ксв отрицательных ($n=105$) и положительных ($n=123$) по данным РВН сывороток. Постановку ИФА и учет полученных результатов проводили аналогично предыдущему эксперименту.

Анализ результатов проведенных экспериментов позволил заключить следующее. В большинстве случаев (93,3%) значение Ксв. отрицательных проб не превышало 15. Из них Ксв. < 0 был в 52,4% сывороток, в 44,8% случаев данный показатель был в пределах от 0 до 15. Только в 3 пробах (2,8%) значение Ксв. находилось в пределах 15-32. В большинстве вирусспецифических сыворотках крови (95,1%) величина Ксв. составляла более 25. При этом в 73,2% проб Ксв. был более 60, в 13,0% случаев он колебался от 40 до 60 и в 8,1% - был в пределах 25 - 40. В 7 пробах (5,7%) значение Ксв. было ниже 25.

Таким образом, был сделан общий вывод о том, что анализируемые сыворотки, имеющие Ксв. менее 15, с большой вероятностью (0,98) не содержат вирусспецифических антител. В вирусспецифических сыворотках в большинстве случаев (98%) значение $ОП_{490}$ превышало аналогичный показатель отрицательного контроля в 2,1 раза, а Ксв. был более 25. Исходя из этого, величина ПНП или «cut off» для Ксв., являющаяся критерием дифференциации положительных и отрицательных проб и при котором минимально количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов, находится в диапазоне $<15 \geq 25$. В дальнейшем все пробы, значение Ксв. для которых было меньше ПНП, считали отрицательными, а пробы со значением Ксв. равным или превышающим этот показатель - положительными.

В последние годы в диагностике вирусных болезней, наряду с использованием молекулярно-генетических и иммунохимических тест-систем для индикации и идентификации возбудителей, необходим поиск альтернативных тестов той же чувствительности и специфичности. Таковыми являются современные серологические реакции, направленные на обнаружение специфических антител.

В идеальном случае тест должен быть одновременно и чувствительным и специфичным. В лабораторной практике решение этих задач является достаточно сложным.

С этой целью для подтверждения достоверности диагностически значимых показателей нами проведен ряд статистических исследований по определению рабочего разведения сыворотки, которое обеспечивало бы максимальную чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Результаты исследований показаны в таблице 5.

Таблица 5 - Рабочее разведение исследуемых сывороток обеспечивающее максимальную чувствительность и специфичность тест-системы ИФА

Разведение сыворотки 1/n	Чувствительность, %	Специфичность, %
100	97,4	83,2
200	97,8	86,0
400	96,07	93,8
800	87,3	94,2
1600	79,2	100
3200	75,3	100

Из таблицы следует, что максимальные значения чувствительности (96,07%) и специфичности (93,8%) теста достигаются при условии использования в реакции сывороток в разведении 1:400, это определило дальнейшее использование сывороток в этом разведении

3.3 Комиссионные испытания «Тест-системы ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител»

Комиссионное испытание специфичности и чувствительности тест-системы ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител проводилось в условиях лаборатории вирусологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

С этой целью на основе результатов тестирования в РТГА сывороток крови крупного рогатого скота, полученных из ООО «Игенче», ООО «Сосна», ООО «Маяк» Балтасинского и ООО «Сюкеево» Камско-Устьинского районов РТ были отобраны положительные и отрицательные 42 пробы, представляющие собой пул сывороток крови, содержащих и не содержащих антител к парвовирусу крупного рогатого скота, соответственно.

В группе положительно реагирующих в РТГА сывороток максимальный титр антител составил 1:640, а в группе сывороток показавшие отрицательные результаты, специфические антитела отсутствовали или находились на уровне фоновых значений.

Исследованием 42 полевых сывороток крови в РТГА выявлено 14 проб (33,3%) положительно реагирующих животных со средним титром $171,43 \pm 44,25$, а в ИФА - 22 пробы (52,4%) со средним титром $2236,36 \pm 685,0$. При этом положительно реагировали в ИФА на 19% больше животных, чем в РТГА.

Гетерологичные по отношению к парвовирусу моноспецифические гипериммунные сыворотки, полученные к вирусам ИРТ и ПГ-3 с активностью в РИГА 1:512 и РТГА - 1:640, соответственно не вступали в реакцию с парвовирусным антигеном как в ИФА, так и РТГА.

Следовательно, полученные результаты указывают на специфичность и чувствительность разработанной тест-системы ИФА.

На основании проведенных испытаний комиссия приняла решение признать, что испытуемый диагностический набор по своим характеристикам соответствует своему назначению, сопоставим с методом аналогичной направленности и может быть рекомендован для проведения широких производственных испытаний.

Следующим этапом работы явилось проведение производственных испытаний путем исследования 443 проб сывороток крови крупного рогатого скота, полученных из 3-х хозяйств Балтасинского, одного хозяйства Камско-Устьинского, 2-х хозяйств Атинского и одного – из Арского районов РТ используя испытуемую тест-систему ИФА в сравнении с методом аналогичной направленности (РТГА). Результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Процентное выражение положительных проб сывороток крови крупного рогатого скота к парвовирусу в хозяйствах Республики Татарстан

Название хозяйства	Кол-во проб	Парвовирус КРС	
		РТГА	ИФА
Балтасинский район РТ			
ООО «Сосна»	48	18,7	41,7
ООО «Маяк»	50	44	56
ООО «Игенче»	24	20,8	29,2
Атинский район РТ			
СХПК им. Ленина	88	70,4	85,2
ООО «Шахтер»	90	37,7	54,4
Арский район РТ			
Ак-Барс Агро	88	29,5	62,5
Камско-Устьинский район РТ			
ООО «Сюкеево»	55	29,1	38,2
Всего проб		443	

Из результатов проведенных производственных испытаний по оценке эффективности разработанной тест-системы ИФА следует, что она отвечает всем требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам, и может быть рекомендована для внедрения в ветеринарную практику, что позволит планомерно и масштабно проводить диагностические исследования и осуществлять оценку эффективности вакцинопрофилактики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота.

3.4 Оценка эпизоотической ситуации по парвовирусной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Татарстан и в ряде регионов Среднего Поволжья

Осуществляя серомониторинг в отношении парвовирусной инфекции крупного рогатого скота с использованием разработанной тест-системы ИФА в 2006-2009 годах было исследовано 1117 проб полевых сывороток крови

животных, полученных из 35 хозяйств РТ, Республики Башкортостан (РБ), Чувашской Республики (ЧР) и Нижегородской области. Сыворотки были тестированы одновременно в РТГА и ИФА. Результаты исследований отражены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты серологического мониторинга в отношении парвовирусной инфекции хозяйств РТ и региона Среднего Поволжья

Регион	Кол-во хозяйств	Кол-во проб	Из них серопозитивных			
			РТГА		ИФА	
			Кол-во	%	Кол-во	%
Республика Татарстан	24	901	229	25,4	392	43,5
Чувашская республика	2	87	21	24	34	39
Республика Башкортостан	4	80	8	10	17	21,3
Нижегородская область	5	49	16	32,6	23	47
Итого	35	1117	403	36,1	595	53,2

Из данных таблицы 7 следует, что из 1117 проб сывороток крови крупного рогатого скота специфические антитела к парвовирусу крупного рогатого скота выявляются в РТГА у 403 (36,1%), а в ИФА у 595 (53,2%) животных. Следовательно, установлена серопозитивность значительного количества животных к антигену парвовируса крупного рогатого скота как в РТГА, так и в ИФА. Полученные результаты указывают на факт циркуляции этого возбудителя среди обследованного поголовья крупного рогатого скота.

4 ВЫВОДЫ

1. На основании анализа результатов исследований в РТГА сывороток крови КРС в отношении парвовирусной инфекции в ряде хозяйств РТ, РБ и Нижегородской области показано, что наибольший процент (41,5%) серопозитивных животных, из числа тестированных ($n=207$), приходится на импортированное поголовье, а среди местного скота ($n=209$) этот показатель сравнительно ниже (13,4%).

2. Учитывая характерные особенности биологических свойств, штамм «Parvo 32459» парвовируса КРС определен в качестве производственного при разработке иммуноферментной тест-системы. Подобраны оптимальные модели культур клеток - первично-трипсинизированная культура клеток ЛЭК и перевиваемая культура клеток линии ЛЭК, обеспечивающие репродукцию вируса с сохранением гемагглютинирующей активности, соответственно в титрах 1:2048 и 1:256.

3. Показано, что для изготовления диагностического антигена целесообразно парвовирус КРС штамм «Parvo 32459» инактивировать 1,2 аминоэтилазидином в конечной концентрации 0,1% в течение 24 ч при

3. Показано, что для изготовления диагностического антигена целесообразно парвовирус КРС штамм «Parvo 32459» инактивировать 1,2 аминокэтилазидином в конечной концентрации 0,1% в течение 24 ч при $+37\pm 1^\circ\text{C}$, при этом наступает полная инактивация парвовируса и сохраняется его гемагглютинирующая активность.

4. Изыскана оптимальная схема гипериммунизации крупного рогатого скота, позволяющая получать специфическую (контрольную положительную) сыворотку, путем двукратного введения очищенной и концентрированной суспензии парвовируса с интервалом 14 дней.

5. Впервые в РФ разработана тест-система на основе непрямого ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител; оптимизированы условия проведения ИФА при исследовании сывороток крови КРС, взятых в одном разведении. Коэффициент корреляции, полученный предложенной тест-системой ИФА в сравнении с методами аналогичной направленности (РВН и РТГА), составил 0,9. По результатам испытания диагностической характеристики тест-системы ИФА показана ее сопоставимость по чувствительности (96,03%) и специфичности (93,82%) с РВН и РТГА.

6. На основании корреляции показателей уровня специфических антител и коэффициента связывания конъюгата сывороточными антителами определен критерий дифференциации положительных и отрицательных результатов, полученных тест-системой ИФА, который находится в диапазоне $<15\text{-}\geq 25\%$.

7. Результаты испытания тест-системы ИФА в производственных условиях путем исследования 443 сывороток крови КРС, полученных из 7 хозяйств 4-х районов РТ свидетельствует о том, что она по своим характеристикам соответствует своему назначению, сопоставима с методами аналогичной направленности, признана чувствительной, специфичной и воспроизводимой. При этом серопозитивность установлена у 57,56% из числа исследованных животных.

8. Проведенный серологический мониторинг в 2006-2009 гг. путем исследования разработанной тест-системой ИФА 1117 проб сывороток крови, полученных из 35-ти скотоводческих хозяйств региона Среднего Поволжья, позволяет достоверно утверждать, что специфические антитела к парвовирусу выявляются у 43,5% в РТ, в ЧР - 39%, РБ - 21,3% и Нижегородской области - 83,6% из числа тестированных. Эти данные указывают на факты циркуляции в регионе парвовируса среди значительного количества поголовья скота.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы исследований по разработке и применению тест-системы ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител вошли в следующие нормативные документы:

- Методические рекомендации по диагностике парвовирусной инфекции крупного рогатого скота, утвержденные директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»;

- Инструкция по применению «Тест-системы ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител», утвержденная директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и согласованная с начальником Главного управления ветеринарии КМ РТ.

- Проект технических условий на тест систему ИФА для серологической диагностики парвовирусной инфекции крупного рогатого скота и определения уровня поствакцинальных антител.

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Яруллин, А.И.** Иммунобиологические свойства парвовируса крупного рогатого скота и методы серологической диагностики данного заболевания / **А.И. Яруллин, М.А. Ефимова** // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные проблемы ветеринарии». - Казань; 2007. - С. 145-146.

2. **Яруллин, А.И.** Этиопатогенез и клинико-эпизоотологические аспекты некоторых вирусных инфекций у импортного поголовья крупного рогатого скота / **Х.З. Гаффаров, В.Г. Гумеров, М.А. Ефимова, А.И. Яруллин, Р.Р. Ахметсафин** // Ветеринарный врач. - 2007.- №5. - С. 11-15.

3. **Яруллин, А.И.** Выявление и количественное определение антител к парвовирусу крупного рогатого скота в сыворотке крови тест-системой ИФА / **М.А. Ефимова, А.И. Яруллин, Х.З. Гаффаров, Р.Я. Гильмутдинов, Н.А. Хисматуллина** // Труды международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ВНИИВВиМ «Проблемы профилактики и борьбы с особоопасными инфекционными болезнями животных». - Покров; 2008. - С. 132-134.

4. **Яруллин, А.И.** Изготовление компонентов диагностического набора для выявления антител методом ИФА к парвовирусной инфекции крупного рогатого скота / **А.И. Яруллин** // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 135-летию академии «Современные подходы развития АПК» Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - Казань; 2008.- Т. 192. - С. 180-184.

Подписано в печать 20.11.2009. Заказ № 1158
Гарнитура «Times New Roman». Печать офсетная.
Бумага офсетная. Объем 1,0 п.л.
Формат 60х84 1/16. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии «GulaPrint» (г. Казань)
Адрес: 420073, г. Казань, А.Кутуя, д. 88, оф. 13. (843) 295-14-48