

На правах рукописи

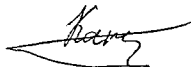
КАПУСКИНА Юлия Викторовна

**РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К БАКТЕРИЯМ РОДА *SALMONELLA*
СЕРОГРУПП В, С И D В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ И КУР**

**16.00.03. «Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология»**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание
ученой степени кандидата
ветеринарных наук



003485332

Владимир – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (г. Владимир)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
ПРУНТОВА Ольга Владиславовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Русалеев Владимир Сергеевич
(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», г. Владимир);

доктор ветеринарных наук

Пирожков Михаил Константинович
(ФГУ «Всероссийский государственный Центр
качества и стандартизации лекарственных
средств для животных и кормов», г. Москва).

Ведущая организация: ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» (ГНУ «ВНИИВВиМ,
г. Покров)

Защита диссертации состоится «15» декабря 2009 г. в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных», по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных»

Автореферат разослан «11» ноября 2009 г.

И.о. ученого секретаря совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
доктор биологических наук,
ст. научный сотрудник



А.П. Пономарев

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сальмонеллез – инфекционное заболевание многих видов сельскохозяйственных и диких животных, а также человека, вызываемое грамотрицательными бактериями рода *Salmonella* и характеризующееся различными клиническими проявлениями [С.И. Загаевский, А.Л. Жорницкий, 1997; Р.А. Barrow, 2000]. У людей данные бактерии вызывают пищевые токсикоинфекции при употреблении инфицированных продуктов животного происхождения, среди которых наиболее частым источником сальмонелл являются мясо домашней птицы (в первую очередь, мясо кур), яйца, а также свинина [В.А. Прискока, Е.Г. Павлов, 1990; R.K. Gast, J. Guard-Petter, 2002]. Род *Salmonella* насчитывает несколько тысяч серовариантов, которые по общим соматическим антигенам (О-АГ) отнесены к какой-либо из серогрупп.

В настоящее время наиболее распространенными серовариантами сальмонелл для свиней являются *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium*, относящиеся к серогруппам С и В, соответственно, для кур – *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum-pullorum* (серогруппа D) и *S. Typhimurium* (серогруппа В) [С.С. Яковлев, С.В. Ленов, Н.А. Дрогалина, 2008; I. Correge, 2006].

Сальмонеллез распространен во многих странах мира, в том числе и России, и наносит значительный экономический ущерб странам с развитым животноводством [И.М. Гараев, 1996]. По данным Департамента ветеринарии РФ, в последнее десятилетие увеличилось число неблагополучных пунктов по этому заболеванию, что связано, прежде всего, с несовершенством прижизненной диагностики сальмонеллеза.

Особенностью данного заболевания является возможное бактерионосительство без внешних проявлений болезни, которое представляет потенциальную опасность как для животных, так и для человека, поэтому выявление серопозитивных животных является важным звеном в противоэпизоотических мероприятиях при сальмонеллезе. Обнаружение антител у невакцинированных животных свидетельствует о возможной циркуляции в стаде данного возбудителя [R.M. Armstrong, 1999].

В настоящее время в большинстве развитых стран разрабатываются национальные программы, направленные на улучшение ситуации по заболеваниям,

вызываемым сальмонеллами. Основу этих программ составляет выявление инфицированных животных с помощью как традиционных серологических реакций, так и иммуноферментного анализа (ИФА). Последний превосходит традиционные серологические методы по чувствительности, специфичности и производительности, быстрой получению результатов, возможности стандартизации условий постановки анализа, что делает его наиболее эффективным и экономически выгодным для массовых серологических исследований, особенно при постановке реакции в одном разведении [J. Van, E. Gieciova, 1990].

Некоторые зарубежные коммерческие фирмы («Ceditest», «IDEXX», «BioCheck» и др.) производят иммуноферментные наборы на основе комбинированного антигена (mix-ELISA), имеющие в своем составе антигены не одного, а двух серовариантов сальмонелл, принадлежащих к различным серогруппам. Это позволяет при проведении одного анализа выявлять антитела к серовариантам, относящимся к обеим серогруппам, что актуально при сальмонеллезе кур и свиней, так как у этих животных наиболее распространенными являются сероварианты, входящие в две разные серогруппы. Следует отметить, что включение в состав набора антигена, относящегося к одной из серогрупп, позволяет выявлять антитела к большинству серовариантов, входящих в ту серогруппу, к которой он принадлежит, в результате наличия общих антигенов в их O-антигенных формулах. Однако массовое применение зарубежных наборов в нашей стране ограничено их высокой стоимостью.

Тем не менее, иммуноферментные наборы на основе комбинированного антигена являются более экономичными при проведении серологического мониторинга в сравнении с наборами, в настоящее время используемыми в России и способными выявлять антитела лишь к одному из серовариантов сальмонелл [Н. В. Сишица, Н. Н. Андросик, О. Н. Локтева, 2007].

Исходя из этого, проведение исследований по разработке отечественных иммуноферментных тест-систем на основе комбинированных антигенов для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D является актуальной задачей, имеющей научное и практическое значение.

Цель и задачи исследований. Целью исследований была разработка иммуноферментных тест-систем для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D в сыворотках крови свиней и кур при тестировании в одном разведении.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- получить специфические препараты антигенов и гипериммунные сыворотки на восприимчивых животных;
- отработать условия постановки ИФА для выявления антител к бактериям рода *Salmonella*;
- разработать иммуноферментную тест-систему на основе комбинированного антигена для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур при тестировании в одном разведении и установить критерии качественной и количественной оценки результатов;
- разработать иммуноферментную тест-систему на основе комбинированного антигена для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней при тестировании в одном разведении и установить критерии качественной и количественной оценки результатов;
- провести сравнительный анализ данных между результатами, полученными с помощью разработанных тест-систем, импортных иммуноферментных наборов и реакции агглютинации;
- с помощью разработанных тест-систем провести серологический мониторинг поголовья в отношении распространенности животных, имеющих антитела к бактериям рода *Salmonella*, в свиноводческих и птицеводческих хозяйствах Российской Федерации и проанализировать полученные данные.

Научная новизна работы. Впервые в России разработаны иммуноферментные тест-системы на основе комбинированного антигена для выявления специфических антител в сыворотках крови к наиболее значимым серовариантам бактерий рода *Salmonella* для свиней и кур. При этом получены специфические компоненты сальмонелл, установлены величины пороговых показателей, разграничивающих специфическую (положительную) и неспецифическую (отрицательную) реакции, определена величина разведения сыворотки, S/P-показатель которой будет использован для вычисления ее титра,

построены уравнения связи между показателем S/P фиксируемого разведения и величиной титра сыворотки для расчета титра антител при тестировании проб в одном разведении.

Проведена сравнительная оценка результатов исследований сывороток крови свиней и кур, с использованием разработанных иммуноферментных тест-систем, реакции агглютинации и коммерческих иммуноферментных наборов зарубежного производства.

Проведен анализ данных ИФА, полученных при серологическом исследовании свино- и птицепоголовья с использованием разработанных тест-систем.

Практическая значимость. По материалам работы подготовлены, прошли комиссионные испытания, одобрены Ученым Советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» следующие методики и методические рекомендации:

- «Методические рекомендации по получению гипериммунной сыворотки крови кур, специфичной к бактериям *Salmonella enterica subspecies enterica* серовариант Enteritidis, для использования в иммуноферментном анализе» (2008 г.);

- «Методические рекомендации по получению липополисахаридного антигена бактерий *Salmonella enterica subspecies enterica* серовариант Enteritidis для иммуноферментного анализа» (2008 г.);

- «Методика выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (2008 г.);

- «Методика выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (2008 г.).

Экспериментальные материалы по разработке иммуноферментных тест-систем к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D при тестировании сывороток крови кур и свиней в одном разведении вошли в утвержденную Россельхознадзором следующую нормативную документацию:

- «Набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (СТО 00495527-0102-2009);

- «Инструкция по применению набора для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (март 2009 г);

- «Набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (СТО 00495527-0101-2009);

- «Инструкция по применению набора для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (март 2009 г).

Разработанные иммуноферментные тест-системы применяются в ФГУ «ВНИИЗЖ» при исследовании сывороток крови свиней и кур для выявления антител к бактериям рода *Salmonella*.

Основные положения, выносимые на защиту:

- иммуноферментная тест-система на основе комбинированного антигена для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* при тестировании сывороток крови кур в одном разведении;

- иммуноферментная тест-система на основе комбинированного антигена для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* при тестировании сывороток крови свиней в одном разведении;

- сравнительный анализ данных, полученных с помощью разработанных тест-систем, импортных иммуноферментных наборов и реакции агглютинации при выявлении антител к бактериям рода *Salmonella*;

- результаты применения разработанных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* при проведении серологического исследования свино- и птицепоголовья.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику» 16-18 апреля 2008 г., г. Владимир, и на заседаниях ученого совета ФГУ «ВНИИЗЖ» в 2007-2009 гг.

Публикации научных работ. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, из них одна статья в издании по перечню ВАК.

Личный вклад. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы работы проводились совместно с сотрудниками лаборатории диагностики бактериальных инфекций и лаборатории гриппа и эпизоотологии болезней птиц, за что автор выражает им искреннюю благодарность.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах, иллюстрирована 24 таблицами и 18 рисунками. Список использованной литературы включает 184 источника, из которых 123 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена в 2007-2009 гг. в лаборатории диагностики бактериальных инфекций животных, ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир.

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали следующие референтные штаммы бактерий рода *Salmonella*, полученные из музея штаммов ФГУ «ВГНКИ»: *S. Typhimurium* № 371, *S. Enteritidis* № 7, *S. Choleraesuis* № 370, *S. Gallinarum-pullorum* № 353, *S. Anatum* № 295 и *S. Lundby* № 350.

Питательные среды. Для культивирования бактерий использовали бульон и агар на основе мясного перевара по Хоттингеру.

Животные. В качестве доноров для получения специфических сывороток использовали клинически здоровых кур породы «Хайсекс коричневый» в возрасте 30-60 дней и свиней породы «Крупная белая» в возрасте 8 недель, массой 25-30 кг.

Антигены. В качестве антигенов для реакции агглютинации (РА) и иммунизации животных использовали формализированные антигены различных серовариантов сальмонелл, полученные по методу А. Gunnarson (1977). Антиген, предназначенный для иммунизации животных, хранили при 4°C не более 14 суток, а используемый в РА консервировали раствором тиомерсала (1:10000) и хранили при 4°C. Для постановки ИФА использовали липополисахаридные антигены, полученные по методике R.P. Darveau и R.E.W. Hancock, 1983.

Сыворотки. Специфические сыворотки крови кур и свиней, используемые в качестве положительных контрольных сывороток, получали путем иммунизации доноров формализированными цельноклеточными антигенами различных серовариантов бактерий рода *Salmonella*. Оптимальные схемы иммунизации

животных подбирали экспериментально. Нормальную сыворотку крови кур и свиней получали от здоровых доноров, не имеющих антител к данному роду бактерий.

Коммерческие наборы ИФА. В работе использовали коммерческие наборы: «HerdChek swine Salmonella» (SC/ST) («IDEXX», Швейцария) – для выявления антител к *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium* в сыворотках крови свиней, а также «BioChek (S.ent/thyph.)» («BioChek», Голландия) – для выявления антител к *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* в сыворотках крови кур.

Конъюгаты. Использовали коммерческие препараты антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов против иммуноглобулинов свиньи и курицы, изготовленные ГУ «НИИЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Имуноферментный анализ. В работе применяли непрямой вариант ИФА, оптимальные условия постановки которого определяли экспериментально. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин (ОФД) и 2,2-азино-ди[3-этил]бензотиазолинсульфоновую кислоту (АБТС). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре-ридере при длине волны 492 нм для ОФД и 405 нм для АБТС.

Реакция агглютинации. Постановку реакции агглютинации и оценку результатов проводили по традиционной методике А. Gunnarson (1977).

Статистическая обработка результатов.

При анализе и обобщении результатов исследований были использованы методы, описанные И.П. Ашмариним, А.А. Воробьевым (1962) и Н. Бейли (1970). Кроме того, для обработки данных применяли компьютерную программу Statistica: Basic Statistic and Tables.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Получение специфических сывороток крови кур и свиней

На первом этапе работы необходимо было получить гипериммунные сыворотки крови кур и свиней. В целях сокращения времени, необходимого для получения гипериммунных сывороток, были проведены исследования по сравнению двух схем гипериммунизации кур и свиней: традиционной, включающей трехкратное введение антигена 1:1 с адьювантом с интервалами в 14 дней, и сокращенной, в которой интервал между введениями антигена составлял лишь семь дней. Для гипериммунизации использовали свиней в количестве восьми

голов и 20 голов кур. Были сформированы две группы кур. Обе группы иммунизировали формализированными цельноклеточными антигенами *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium*, путем трехкратного введения антигена в дозе 10 млрд. м.к./см³ в объеме 0,5 см³, смешанным в равном объеме с масляным адьювантом Montanide ISA-70, в грудную мышцу. Первую группу иммунизировали с интервалами в семь дней. Вторую группу иммунизировали с интервалами в две недели. Аналогичные схемы сравнивали и при гипериммунизации поросят. Две группы животных иммунизировали во внутреннюю поверхность бедра формализированными цельноклеточными антигенами *S. Choleraesuis* или *S. Typhimurium* путем трехкратного введения антигена в дозе 10 млрд. м.к./см³ в объеме 1,0 см³, смешанным в равном объеме с масляным адьювантом Montanide ISA-70. Отбор крови проводили каждую неделю. Через 14 дней после третьей иммунизации животных тотально обескровливали. Активность гипериммунных сывороток крови кур и свиней оценивали в непрямом твердофазном варианте ИФА.

Исследования показали, что максимальная активность сывороток крови кур первой группы наблюдалась уже на 21 день (через неделю после третьей иммунизации) и сохранялась примерно на том же уровне до конца срока наблюдения (шесть недель), в то время как максимальная активность сывороток крови кур второй группы была отмечена на 35 день, что, как и в первой группе, отмечалось через неделю после третьей иммунизации.

Таким образом, для получения сывороток крови кур с максимальным содержанием специфических антител более пригодна сокращенная схема. В сравнении с традиционной она значительно сокращает время, необходимое для получения сывороток, а также затраты, связанные с содержанием птицы.

В отличие от кур при гипериммунизации свиней были получены противоположные результаты – сыворотки с максимальным количеством антител можно получить только при использовании традиционной схемы.

На основании полученных результатов были разработаны «Методические рекомендации по получению гипериммунной сыворотки крови кур, специфичной к бактериям *Salmonella enterica* subspecies *enterica* серовариант *Enteritidis*», для

использования в иммуноферментном анализе, утвержденные директором ФГУ «ВНИИЗЖ».

2.2.2. Изучение активности и специфичности различных антигенов

S. Typhimurium, *S. Enteritidis* и *S. Choleraesuis* в ИФА

По данным литературы, в качестве антигена для ИФА используют как цельные бактериальные клетки, так и отдельные клеточные компоненты [N.P. Ferris, A.J. Donaldson, 1988; R.K. Gast, P.S. Holt, 1998]. В непрямом варианте ИФА были исследованы следующие полученные нами антигены: липополисахаридный (ЛПС-АГ), жгутиковый (Н-АГ), соматический (О-АГ), формализированный (Ф-АГ) и антиген, полученный путем кипячения (100°С-АГ).

Оценку их активности и специфичности проводили в реакции с гипериммунными сыворотками крови кур, полученными к цельным антигенам серовариантов *S. Typhimurium* № 371 (ST) и *S. Enteritidis* № 7 (SE), а также гипериммунными сыворотками крови свиней, полученными к аналогичным антигенам серовариантов *S. Typhimurium* № 371 и *S. Choleraesuis* № 370. Кроме этого в работе были использованы гипериммунные сыворотки крови кур к *S. Gallinarum-pullorum* (GP), *S. Lundby* (SL), *Enterococcus avium* (EA), *Yersinia enterocolitica* (YE), *Pasteurella multocida* (PM) и *Escherichia coli* (EC), а также гипериммунные сыворотки крови свиней к *S. Anatum*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* и вирусу классической чумы свиней. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови кур и свиней, не содержащие антитела к вышеперечисленным возбудителям.

Все препараты антигенов, кроме ЛПС-АГ, наносили на полистироловый планшет в рабочей концентрации 0,2 мкг/см³, согласно данным R.A. Nicholas, G.A. Cullen, 1991. Так как ЛПС-АГ не содержит белок, определить оптимальную концентрацию вносимого в лунку антигена по количеству белка не представляется возможным. Ее определяли для каждой партии путем постановки ИФА методом последовательных разведений. За рабочее разведение принимали последнее разведение антигена, в котором значение оптической плотности (ОП) контрольной положительной сыворотки было больше значения ОП контрольной отрицательной

сыворотки не менее, чем в пять раз, при исследовании сывороток в разведении 1:400, согласно данным Е.В. Madsen, 2006. Рабочие разведения для сенсibilизации планшет для всех исследуемых серовариантов оказались одинаковыми и составили 1:1600.

Антигены исследовали на активность и специфичность с вышеуказанными гомо- и гетерологичными сыворотками крови кур и свиней, которые титровали двукратным шагом, начиная с разведения 1:100. За титр сыворотки принимали разведение, в котором значение ОП исследуемой сыворотки в два раза превышало ОП отрицательной контрольной сыворотки. Определение активности и специфичности антигенов с сыворотками крови кур представлено на примере серовариантов *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis* в табл. 1.

В результате установлено, что титры положительных контрольных сывороток составляли с гомологичными антигенами не менее 1333 ± 462 , а титры отрицательных контрольных сывороток – не более 167 ± 58 со всеми препаратами антигенов.

ЛПС-АГ *S. Typhimurium* положительно реагировал только с гомологичной сывороткой. Это же относится к ЛПС-АГ *S. Enteritidis* (кроме сыворотки, полученной к антигену сероварианта *S. Gallinarum-pullorum*). Высокие титры антител в сыворотке крови кур, полученной к *S. Gallinarum-pullorum* ($1333 \pm 462 - 2667 \pm 924$), были отмечены в реакции со всеми препаратами антигенов *S. Enteritidis*, кроме Н-АГ, что можно объяснить наличием одинаковых рецепторов у О-АГ этих серовариантов сальмонелл. Остальные исследуемые антигены обоих серовариантов, кроме ЛПС-АГ и Н-АГ, показали перекрестные реакции с некоторыми гетерологичными сыворотками. Хотя Н-АГ и показал высокую специфичность, но отсутствие жгутиковой фазы у *S. Gallinarum-pullorum* делает невозможным выявление антител к этому сероварианту с помощью данного антигена.

Титр антител 333 ± 115 наблюдали при реакции ЛПС-АГ *S. Enteritidis* с положительной сывороткой к *S. Typhimurium*, а также ЛПС-АГ *S. Typhimurium* с положительной сывороткой к *S. Enteritidis* и *S. Gallinarum-pullorum*, что объясняется наличием некоторых общих О-антигенов у данных серовариантов возбудителя. Эти данные показывают невозможность выявления в сыворотках крови кур антител

одновременно как к *S. Typhimurium*, так к *S. Enteritidis* с помощью ЛПС-АГ только одного из вышеуказанных серовариантов, так как с гомологичным антигеном титр сыворотки выше и составляет 2667±924, а с гетерологичным лишь 333±115.

Таблица 1

**Активность и специфичность в ИФА различных антигенов
S. typhimurium № 371 и *S. enteritidis* № 7 с гомо- и гетерологичными
сыворотками крови кур**

n=3

Сероварианты	Антигены	Контроли			Гетерологичные сыворотки					
		отрицательный	положительный		GP	SL	EC	YE	EA	PM
			SE	ST						
<i>S. enteritidis</i>	ЛПС	133 ±58	2667 ±924	333 ±115	1333 ±462	167 ±58	167 ±58	133 ±58	167 ±58	133 ±58
	H-АГ	167 ±58	1333 ±462	167 ±58	167 ±58	167 ±58	167 ±58	100 ±0	167 ±58	100 ±0
	O-АГ	167 ±58	4266 ±1847	333 ±115	2667 ±924	333 ±115	266 ±115	133 ±115	1333 ±462	167 ±58
	Ф-АГ	133 ±58	2667 ±924	333 ±115	2667 ±924	167 ±58	133 ±58	1066 ±462	100 ±0	167 ±58
	100°C-АГ	133 ±58	2667 ±924	333 ±115	1333 ±462	333 ±115	1333 ±462	266 ±115	167 ±58	133 ±58
<i>S. typhimurium</i>	ЛПС	133 ±58	333 ±115	2667 ±924	333 ±115	167 ±58	100 ±0	167 ±58	133 ±115	133 ±58
	H-АГ	133 ±58	167 ±58	1333 ±462	133 ±115	167 ±58	167 ±58	133 ±58	167 ±58	133 ±58
	O-АГ	167 ±58	333 ±115	4266 ±1847	167 ±58	333 ±115	167 ±58	333 ±115	333 ±115	1333 ±462
	Ф-АГ	133 ±58	333 ±115	1333 ±462	167 ±58	333 ±115	666 ±231	133 ±58	333 ±115	133 ±58
	100°C-АГ	133 ±58	333 ±115	2667 ±924	167 ±58	167 ±58	1333 ±462	666 ±231	133 ±58	167 ±58

Примечание: титры антител сывороток выражены величиной, обратной разведению и представлены в виде M±m

ЛПС-АГ серовариантов *S. Typhimurium* № 371 и *S. Choleraesuis* № 370 при исследовании с гомо- и гетерологичными сыворотками крови свиней, как и в случае с сыворотками крови кур, оказались наиболее специфичными среди всех исследуемых образцов. Таким образом, в качестве антигена для иммуноферментного анализа был отобран липополисахаридный антиген.

2.2.3. Разработка иммуноферментных тест-систем для выявления антител к бактериям рода *Salmonella*

Оптимизация условий постановки непрямого варианта ИФА. При разработке иммуноферментных тест-систем возникают проблемы оптимизации условий постановки ИФА, для чего необходимы исследования по подбору наиболее подходящих буферных растворов с оптимальной ионной силой для сорбции антигена на планшеты, блокирующих растворов, а также определению времени адсорбции компонентов реакции и температурного режима.

В результате проведенных исследований был оптимизирован ряд параметров постановки ИФА с целью использования его для определения антител к антигенам некоторых серовариантов бактерий рода *Salmonella* в сыворотках крови свиней и кур: время адсорбции антигена – 18 ч при 4°C, буферная система для иммобилизации антигена на планшет – 0,1 М КББ pH 9,5-9,6; оптимальный блокирующий раствор – 1% раствор обезжиренного сухого молока.

Получение комбинированного липополисахаридного антигена. Наиболее распространенные в настоящее время сероварианты сальмонелл: *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis* для птиц, а также *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium* для свиней включили в иммуноферментные тест-системы на основе комбинированных антигенов для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* в сыворотках крови данных видов животных.

Антигены в различных разведениях объединяли в соотношении 1:1. Активность комбинированных антигенов и каждого из моно-антигенов, входящих в комбинированный ЛПС-АГ, проверяли в ИФА с использованием гипериммунных сывороток крови кур и свиней в разведении 1:400 к соответствующему сероварианту. В табл. 2 показаны результаты исследований по определению активности моно- и комбинированных антигенов с гипериммунными сыворотками крови свиней.

Таблица 2

Активность моно- и комбинированных антигенов с гипериммунными сыворотками крови свиней при исследовании в ИФА

n=5

Антиген	Разведение	Оптические плотности сывороток, полученных к антигенам, о.е.	
		<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Choleraesuis</i>
<i>S. Typhimurium</i>	1:1600	0,81±0,025	0,16±0,037
<i>S. Choleraesuis</i>	1:1600	0,15±0,031	0,82±0,025
<i>S. Choleraesuis/</i> <i>S. Typhimurium</i>	1:400	1,23±0,037	1,19±0,042
	1:800	0,80±0,029	0,81±0,034
	1:1600	0,68±0,038	0,70±0,026
	1:3200	0,54±0,041	0,51±0,029

Установлено, что оптимальное рабочее разведение антигенов, входящих в комбинированные ЛПС-АГ, составило 1:1600 для *S. Enteritidis/S. Typhimurium* и 1:800 для *S. Choleraesuis/S. Typhimurium*, так как в этих разведениях значения ОП гипериммунных сывороток, полученных к вышеперечисленным серовариантам бактерий, при взаимодействии с комбинированными АГ соответствовали ОП гипериммунных сывороток к аналогичным серовариантам в реакции с гомологичными моно-антигенами, взятыми в ранее определенном оптимальном рабочем разведении – 1:1600.

Выбор условий хранения комбинированных антигенов на планшете. Сохранение исходной активности каждого из иммобилизованных антигенов, входящих в комбинированный антиген, проверяли в реакциях с контрольными сыворотками, непосредственно после нанесения на планшет, а также через 1, 3, 6 и 12 месяцев хранения. Было установлено, что каждый из иммобилизованных на планшеты антигенов в составе комплексного ЛПС-АГ может сохранять свою активность на уровне 80-89% от исходного при хранении в течение 12 месяцев при температуре 4-8°C.

2.2.4. Разработка иммуноферментных тест-систем для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* при тестировании сывороток крови кур и свиней в одном разведении

Разработка тест-систем включала в себя определение рабочего разведения сывороток, выведение уравнения линейной регрессии для вычисления титра,

определение оптимального диапазона оптических плотностей контролей и установление позитивно-негативного порога.

Определение рабочего разведения сыворотки крови свиней и расчет титра антител. При тестировании сывороток крови методом одного разведения, результаты обычно представляют в виде S/P отношения величин оптической плотности исследуемой сыворотки и положительного контроля.

Для определения оптимального рабочего разведения сыворотки в ИФА методами последовательных разведений и одного разведения сыворотки исследовали 68 сывороток крови кур с разным уровнем антител как к *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, так и к *S. Gallinarum-pullorum*, а также 70 сывороток крови свиней с разным уровнем антител к *S. Typhimurium* и *S. Choleraesuis* для субстратов ОФД и АБТС. Для каждой пробы определяли титр и значение S/P в разведениях 1:100, 1:200 и 1:400. С помощью компьютерной программы «Statistica» рассчитывали значения параметров уравнения, коэффициенты корреляции, стандартную ошибку и строили уравнение линейной регрессии для каждого из вышеуказанных разведений.

Разведение 1:400, имевшее для комбинированных антигенов наибольший коэффициент корреляции: для ЛПС-АГ *S. Enteritidis/S. Typhimurium* и *S. Typhimurium/S. Choleraesuis* (0,9544 и 0,9431, соответственно, для ОФД) и (0,9475 и 0,9513, соответственно, для АБТС) при наименьших стандартных ошибках, было выбрано рабочим.

Коэффициенты уравнения, соответствующие этому разведению использовали для расчета суммарного титра антител к бактериям рода *Salmonella* при тестировании сывороток в одном разведении. Для двух субстратов были построены калибровочные прямые и выведены уравнения линейной регрессии для определения титров. На рис. 1 представлены калибровочные прямые на примере определения титра антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D при разведении сывороток крови кур 1:400 для субстратов ОФД и АБТС.

Уравнения линейной регрессии для вычисления титра антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур имели вид $LGT=3,2726+0,9894 \times LGS/P$ (для субстрата ОФД) и $LGT=3,7923+1,3991 \times LGS/P$ (для субстрата АБТС). Уравнения для вычисления титра антител к бактериям рода

Salmonella серогрупп В и С в сыворотках крови свиней имели вид $LGT=3,2635+1,1184 \times LGS/P$ (для субстрата ОФД) и $LGT=3,5316+1,6531 \times LGS/P$ (для субстрата АБТС).

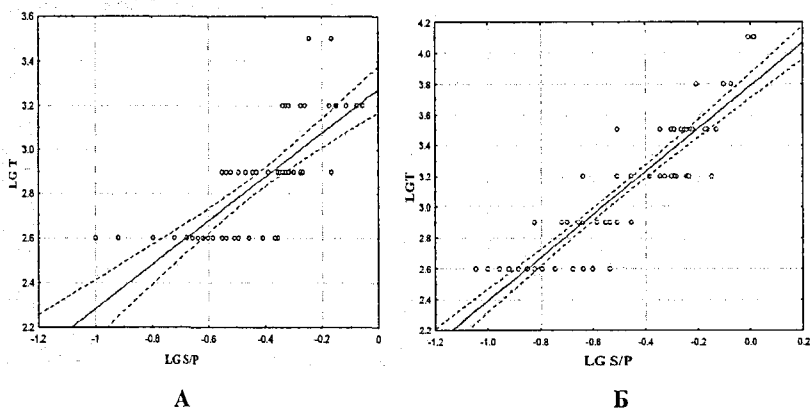


Рис. 1. Калибровочные прямые для определения титра антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D при разведении сывороток крови кур 1:400 (А – субстрат ОФД, Б – субстрат АБТС)

Определение позитивно-негативного порога. Одним из важных аспектов при разработке непрямого варианта ИФА и интерпретации его результатов является обоснование пороговых значений S/P и титра, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специфическую (положительную) реакции. Для установления этих параметров в непрямом варианте ИФА определяли значения ОП 90 проб сывороток крови кур и 85 сывороток крови свиней, не имеющих антител к антигенам *Salmonella*, в разведении 1:400, используя, как субстрат ОФД, так и АБТС. Все сыворотки были предварительно протестированы с помощью коммерческих иммуноферментных наборов фирм «BioChek» и «IDEXX», а также в РА. Для расчета позитивно-негативного порога (ПНП) находили среднее значение ОП отрицательных сывороток и стандартное отклонение. Среднее значение ОП исследованных сывороток, суммированное с утроенным значением стандартного отклонения, определяло верхнюю границу отрицательных значений ОП. Затем вычисляли S/P и по уравнению линейной регрессии находили пороговое значение титра антител (наивысшее отрицательное значение титра) и выделяли сомнительную зону, которая определяется двумя значениями титра. Таким

образом, были определены пороговые значения титра антител и S/P сывороток крови кур и свиней при использовании субстратов АБТС и ОФД (табл. 3 и 4).

Таблица 3

Пороговые значения титра и S/P сывороток крови кур, определенные с использованием субстратов АБТС и ОФД

Субстрат	Параметры	Сыворотки		
		отрицательные	сомнительные	положительные
АБТС	S/P	0-0,18	0,19-0,26	0,27 и выше
	Титр	0-1:552	1:553 -1:1103	1:1104 и выше
ОФД	S/P	0-0,16	0,17-0,25	0,25 и выше
	Титр	0-1:311	1:312-1:621	1: 622 и выше

Таблица 4

Пороговые значения титра и S/P сывороток крови свиней, определенные с использованием субстратов АБТС и ОФД

Субстрат	Параметры	Сыворотки		
		отрицательные	сомнительные	положительные
АБТС	S/P	0-0,18	0,19-0,26	0,27 и выше
	Титр	0-1:200	1:201-1:399	1:400 и выше
ОФД	S/P	0-0,19	0,17-0,25	0,29 и выше
	Титр	0-1:286	1:287-1:570	1:571 и выше

Определение допустимых значений оптических плотностей контрольных сывороток крови кур и свиней. Для получения достоверных результатов при тестировании сывороток в одном разведении необходимо учитывать, входят ли значения ОП контрольных сывороток в диапазон допустимых значений. Для установления данного диапазона определяли средние значения ОП контрольных сывороток в разведении 1:400 в 17 повторностях с учетом доверительного интервала. Полученные результаты позволили рассчитать соответствующие средние величины, стандартные отклонения и доверительный интервал значений оптической плотности контролей.

Было показано, что оптимальными значениями оптической плотности контрольных сывороток крови кур являются значения, лежащие в диапазонах: для положительного контроля – от 0,630 до 0,910 о.е. для АБТС и от 0,619 до 0,865 о.е. для ОФД; для отрицательного контроля – от 0,080 до 0,162 о.е. для АБТС и от 0,071 до 0,131 о.е. для ОФД.

Оптимальными значениями ОП контрольных сывороток крови свиней являются значения, лежащие в диапазонах: для положительного контроля – от 0,588 до 0,868 о.е. для АБТС и от 0,548 до 0,848 о.е. для ОФД; для отрицательного контроля – от 0,081 до 0,171 о.е. для АБТС и от 0,061 до 0,159 о.е. для ОФД. Если значения ОП контрольных сывороток выходят за рамки допустимых значений, то результаты реакции считают сомнительными и пробы должны быть исследованы заново.

Сравнение чувствительности и специфичности разработанных иммуноферментных тест-систем с коммерческими наборами ИФА и РА

204 сыворотки крови кур были параллельно протестированы с использованием импортного иммуноферментного набора «BioChek (S.ent/thyph.)» для выявления антител к *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, разработанной иммуноферментной тест-системы («ВНИИЗЖ») и в РА.

Кроме этого, было исследовано 148 сывороток крови свиней с использованием коммерческого набора ИФА «HerdChek swine Salmonella (SC/ST)» для выявления антител к *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium*, разработанной иммуноферментной тест-системы («ВНИИЗЖ») и в РА. Формулы для расчета относительной чувствительности и специфичности имели вид:

$A / B \times 100\%$ - чувствительность, где А – количество положительных проб в испытуемом тесте, совпадающее с количеством положительных проб в других тестах; В – количество положительных проб по данным других тестов.

$C / D \times 100\%$ - специфичность, где С - количество отрицательных проб в испытуемом тесте, совпадающее с количеством отрицательных проб в других тестах; D - количество отрицательных проб по данным других тестов.

Результаты сравнения чувствительности и специфичности на примере сывороток крови кур представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Результаты тестирования сывороток крови кур по данным
серологических тестов**

Результаты	ИФА «ВНИИЗЖ»	ИФА «BioChek»	РА
положительные	<i>A</i> 125	<i>B₁</i> 127	<i>B₂</i> 129
отрицательные	<i>C</i> 69	<i>D₁</i> 73	<i>D₂</i> 71
сомнительные	10	4	4
всего	204	204	204

Примечание: А, В₁, В₂, - количество положительных проб в тесте;

С, D₁, D₂, - количество отрицательных проб в тесте.

Полученные результаты свидетельствуют, что чувствительность разработанной тест-системы при тестировании сывороток крови кур относительно реакции агглютинации составила 96,8%, а относительно коммерческого иммуноферментного набора «BioChek» - 98,4%. Специфичность разработанной тест-системы «ВНИИЗЖ» составила 97,1% относительно РА и 94,5% относительно коммерческого набора ИФА.

Исследования сывороток крови свиней позволили установить, что чувствительность разработанной иммуноферментной тест-системы относительно РА составила 93,9%, а относительно коммерческого набора ИФА «IDEXX» - 95,0%. Специфичность разработанной тест-системы «ВНИИЗЖ» составила 96,9% относительно РА и 95,4% относительно коммерческого набора ИФА.

Результаты проведенных исследований подтвердили возможность использования разработанных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D в сыворотках крови кур и свиней, наряду с реакцией агглютинации и коммерческими наборами ИФА.

2.2.5. Проведение серологических исследований свино- и птицеполовья для выявления специфических антител к сальмонеллам с применением разработанных иммуноферментных тест-систем

С целью проведения серологических исследований с применением разработанных иммуноферментных тест-систем были протестированы сыворотки

крови кур и свиней, не подвергавшихся вакцинации, присланные в 2008-2009 гг. из птицефабрик и свиноводческих хозяйств РФ (табл. 6 и 7).

Таблица 6

**Данные исследования сывороток крови кур на наличие
антител к сальмонеллам в 2008-2009 гг.**

№	Область	Количество исследованных сывороток	Количество положительных сывороток	Положительные сыворотки от общего количества исследованных, %
1	Костромская	315	13	4,1
2	Белгородская	288	35	12,2
3	Тверская	378	19	5,0
4	Ростовская	342	18	5,3
5	Краснодарский край	207	12	5,8
6	Ярославская	396	40	10,1
7	Курская	189	13	6,8
8	Саратовская	171	11	6,4
9	Самарская	190	13	6,8
10	Липецкая	247	0	0
11	Калужская	180	0	0

Таблица 7

**Данные исследования сывороток крови свиней на наличие
антител к сальмонеллам в 2008-2009 гг.**

№	Область	Количество исследованных сывороток	Количество положительных сывороток	Положительные сыворотки от общего количества исследованных, %
1	Ленинградская	760	0	0
2	Костромская	145	3	2,0
3	Хабаровский край	94	4	4,3
4	Белгородская	250	27	10,8
5	Московская	450	0	0
6	Самарская	205	7	3,4
7	Томская	210	9	4,3

Проведенные исследования показывают, что наибольшее количество положительных сывороток было получено от животных, принадлежащих свино- и птицеводческим хозяйствам, находящимся в Белгородской области.

Отсутствие положительных результатов при серологическом исследовании за вышеуказанные годы наблюдали при тестировании сывороток из птицеводств Липецкой и Калужской, а также из свиноводческих хозяйств Московской и Ленинградской областей.

Следует отметить, что данные серологических исследований не позволяют поставить диагноз на сальмонеллез животным, от которых были получены сыворотки, интерпретированные, как положительные. Однако, это является причиной для того, чтобы материал от данных животных был исследован с помощью бактериологических методов, на основании чего будет поставлен окончательный диагноз. Таким образом, проведенные серологические исследования птицеводческих и свиноводческих хозяйств Российской Федерации с применением разработанных тест-систем показал наличие у животных специфических антител к сальмонеллам во многих областях РФ.

3. ВЫВОДЫ

1. Разработана иммуноферментная тест-система, в состав которой входят липополисахаридные антигены двух серовариантов, для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур при тестировании в одном разведении. Специфичность и чувствительность разработанной тест-системы относительно РА составила 97,1% и 96,8%, а в сравнении с коммерческим иммуноферментным набором «BioChek» - 94,5% и 98,4%, соответственно.

2. Разработана иммуноферментная тест-система, имеющая в составе липополисахаридные антигены двух серовариантов, для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней при тестировании в одном разведении. Специфичность и чувствительность разработанной тест-системы относительно РА составила 96,9% и 93,9%, а в сравнении с коммерческим иммуноферментным набором «IDEXX» - 95,4% и 95,0%, соответственно.

3. Определены схемы гипериммунизации кур и свиней, позволяющие получать сыворотки с высоким уровнем антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D. Показано, что для получения сывороток крови кур с максимальным количеством специфических антител более пригодна сокращенная схема, включающие трехкратное введение антигена с интервалами в семь дней, а для получения гипериммунных сывороток крови свиней необходима традиционная схема иммунизации, в которой интервал между введениями антигена составляет две недели.

4. Получены иммуноспецифические компоненты: антигены и гипериммунные сыворотки для разработки тест-систем, позволяющих выявлять антитела к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В, С и D в сыворотках крови кур и свиней. Установлено, что наиболее специфичным из всех исследуемых оказался липополисахаридный антиген.

5. Проведены серологические исследования птицеводческих хозяйств из 11 областей Российской Федерации в 2008-2009 гг., не проводящих вакцинацию против сальмонеллеза, с использованием разработанных иммуноферментных тест-систем. Наибольшее количество положительных сывороток крови кур было получено из птицеводческих хозяйств, расположенных в Белгородской области (12,2% от общего числа исследованных сывороток крови кур данной области). Это может указывать на наличие в данной области больных животных или сальмонеллоносителей. Отсутствие положительных результатов за вышеуказанные годы отмечали при серологическом исследовании сывороток крови кур из птицеводческих хозяйств Липецкой и Калужской областей.

6. Проведены серологические исследования свиноводческих хозяйств из семи областей РФ в 2008-2009 гг., не проводящих вакцинацию против сальмонеллеза, с применением разработанных иммуноферментных тест-систем. Наибольшее количество положительных сывороток крови свиней было получено из хозяйств, расположенных в Белгородской области (10,8% от общего числа исследованных сывороток крови свиней данной области). При исследовании сывороток крови свиней из хозяйств Ленинградской и Московской областей положительных результатов выявлено не было.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для использования предлагаются следующие методики и методические рекомендации, прошедшие комиссионные испытания, одобренные Ученым Советом и утвержденные директором ФГУ «ВНИИЗЖ»:

- «Методические рекомендации по получению гипериммунной сыворотки крови кур, специфичной к бактериям *Salmonella enterica subspecies enterica* серовариант Enteritidis, для использования в иммуноферментном анализе» (2008 г.);

- «Методические рекомендации по получению липополисахаридного антигена бактерий *Salmonella enterica subspecies enterica* серовариант Enteritidis для иммуноферментного анализа» (2008 г.);

- «Методика выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (2008 г.);

- «Методика выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (2008 г.).

Материалы научных исследований использованы при подготовке следующей нормативной документации, утвержденной Россельхознадзором:

- «Набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (СТО 00495527-0102-2009);

- «Инструкция по применению набора для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (март 2009 г.);

- «Набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (СТО 00495527-0101-2009);

- «Инструкция по применению набора для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и С в сыворотках крови свиней иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (март 2009 г.).

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Капускина, Ю.В. Получение антигенов бактерий *Salmonella enterica* subspecies *enterica* и гипериммунных сывороток к ним для иммуноферментного анализа/ Ю.В. Капускина, О.В. Прунтова. - // Вет. патология. - 2007. - № 4(23). - С. 76-81.
2. Капускина, Ю.В. Сравнительная активность антигенов *Salmonella enterica* subspecies *enterica* / Ю.В. Капускина, О.И. Ручнова. - // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 65-летию Ульяновской ГСХА 20-22 мая 2008 г. Т. 4. Вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, ВСЭ, биотехнологии. - Ульяновск, 2008. - Т. 4. - С. 38-41.
3. Капускина, Ю.В. Получение специфических компонентов бактерий *Salmonella enterica* subspecies *enterica* для иммуноферментного анализа / Ю.В. Капускина, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова. // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. Т. VI. – С. 258-266.
4. Капускина, Ю.В. Сравнение схем гипериммунизации кур антигеном *Salmonella enteritidis*/ Ю.В. Капускина, Г.М. Семенова // Паразитарные, инфекционные и неинфекционные заболевания животных: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической интернет-конференции (1-15 декабря 2008 г.). – Ставрополь, 2009. – С. 49-52.
5. Капускина, Ю.В. Разработка и применение непрямого варианта ИФА для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур при тестировании сывороток в одном разведении/ Ю.В. Капускина // БИО. - 2009. - № 4. – С. 15-16.

Отпечатано на полиграфической базе ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных (ФГУ «ВНИИЗЖ»)»
Тираж 90 экз., ноябрь 2009 г.