

КАНЬШИНА Анжелика Владимировна

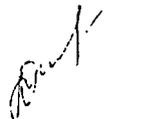
**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ
РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА
СВИНЕЙ**

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук



Владимир-2004

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Научный руководитель - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник **АНДРЕЕВ Владимир Георгиевич**

Официальные оппоненты:- доктор ветеринарных наук, профессор **РАХМАНОВ Анатолий Михайлович** (ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных, г.Владимир);
- доктор биологических наук, профессор **ЦЫБАНОВ Содном Жамьянович** (ВНИИВВиМ, г. Покров)

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ВНИТИБП, г. Щелково)

Защита диссертации состоится *20* *апреля* 2004 года в *10* часов на заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, п. Юрьеvec.

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

Автореферат разослан *17* марта 2004 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук -

Семенова Г.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) - вирусное заболевание, которое характеризуется главным образом серьезными расстройствами функции репродуктивной системы у свиноматок и поражением органов дыхания у поросят (Dea S.,1999).

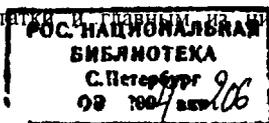
В качестве этиологического агента заболевания идентифицирован вирус, который классифицирован как представитель семейства Arteriviridae (Cavanagh D.,1997). Проведение молекулярно-биологических исследований вируса PPCC показало, что он представлен двумя генетически различными группами: североамериканской и западноевропейской (Katz J.V., 1995).

Репродуктивно-респираторный синдром свиней впервые был установлен в США в 1987 году (Keffaber K.K.,1989), а затем в Европе в 1990 году (Wensvoort G.,1991). С тех пор данное заболевание регистрировалось в большинстве стран мира (Benfield D.A.,1992; Blaha T.,2000; С.А. Кукушкин,2003). По приблизительным оценкам, в США и Европе инфицировано свиноголовье 50% ферм. Свиноводческим хозяйствам это заболевание приносит большой ущерб, потери продукции достигают 20% (Christianson W.T.,1994).

В связи с этим остаются актуальными проблемы своевременной диагностики заболевания PPCC. Быстрая постановка диагноза в случае возникновения болезни обеспечивает проведение в сжатые сроки соответствующих мероприятий по ликвидации и предотвращению дальнейшего распространения инфекции.

Диагноз на заболевание PPCC ставят на основании комплекса показателей с использованием эпизоотологических, клинических, патологоанатомических и лабораторных методов. Диагностическое значение этих методов различно и зависит от характера течения болезни. При этом клинический диагноз необходимо подтвердить лабораторными методами, так как заболевание имеет широкий спектр проявлений и обычно осложняется различными вторичными инфекциями.

Существующие методы лабораторной диагностики, такие как непрямая реакция иммунофлуоресценции (НРИФ), реакция нейтрализации (РН), иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) (Albina E.,1992; Cho H.J.,1997; Dea S.,2000), используются в практике, однако у каждого из этих методов есть свои недостатки. В главном из них является



необходимость использования нативного вирусного антигена. Получение вируса РРСС связано с определенными трудностями из-за малого его накопления в культуральных системах и в силу своих биологических особенностей он разрушается при очистке. В связи с этим представляется актуальным и целесообразным использовать в реакциях в качестве стандартного антигена рекомбинантный белок, к преимуществам которого относится безвредность, стабильность, известный химический состав, отсутствие посторонних белков и нуклеиновых кислот.

Для использования в ИФА самым подходящим рекомбинантным белком является нуклеокапсидный протеин (гNC), так как, во-первых, наибольшее количество вырабатываемых антител в организме при заражении вирусом РРСС образуется на нуклеокапсидный белок (Dea S., 2000). Во-вторых, нуклеокапсидный белок имеет общие эпитопы для антител, полученных на штаммы вируса РРСС как европейской, так и американской геногрупп (Morrison R.B., 1992; Dea S., 1999). И, в-третьих, исследования ряда авторов показали перспективность использования иммуноферментных тест-систем на основе этого рекомбинантного белка для диагностики РРСС (Denac H., 1997; Dea S., 2000). С учетом всего этого, разработка метода диагностики заболевания с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка вируса РРСС является актуальной задачей для практической ветеринарии.

Цели и задачи исследования. Основная цель наших исследований заключалась в разработке непрямого варианта иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка (гNC) для выявления антител к вирусу РРСС.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать тест-систему для оценки активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) на основе прямого сэндвич-варианта ИФА;
- оптимизировать условия постановки прямого блокирующего варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней;
- разработать тест-систему на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней с использованием

рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) методом последовательных разведений и оптимизировать условия постановки реакции для выявления антител методом одного разведения;

- определить коэффициент корреляции, чувствительность и специфичность разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) по сравнению с результатами ИФА наборов фирмы IDEXX (США) и фирмы HIPRA (Испания);

- применить разработанную тест-систему на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) для исследования сывороток крови на наличие антител к вирусу РРСС после заражения или иммунизации животных разными вакцинами.

Научная новизна исследований. Впервые в России разработана тест-система на основе непрямого варианта ИФА с применением рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) для обнаружения антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней.

Предложена тест-система на основе прямого сэндвич-варианта ИФА для оценки активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) и выявления антигена вируса РРСС.

Оптимизирован блокирующий вариант ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней.

Показана корреляция между результатами выявления антител с помощью тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с применением рекомбинантного белка rNC и коммерческих наборов ИФА фирмы IDEXX (США) и фирмы HIPRA (Испания).

Проведен анализ данных, полученных при иммунологическом мониторинге свинопоголовья на наличие антител к вирусу РРСС с использованием разработанной тест-системы ИФА на основе рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC).

Практическая значимость исследований. На основании проведенных исследований разработаны иммуноферментные тест-системы для обнаружения антигена или антител к вирусу РРСС.

Полученные результаты использованы при подготовке следующих методик, которые комиссионно испытаны, одобрены ученым советом и утверждены директором института:

«Методика выявления и титрования антигена вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в прямом сэндвич варианте ИФА» (утверждена 5.11.2000г.);

«Методика выявления антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней в прямом блокирующем варианте иммуноферментного анализа» (утверждена 5.11.2000г.);

«Методика выявления антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней в непрямом варианте иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигена рекомбинантного нуклеокапсидного протеина (rNC)» (утверждена 5.11.2000г.);

«Методические рекомендации по выделению вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) с использованием альвеолярных макрофагов свиней» (утверждены 5.11.2000г.);

«Методика выявления антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней по одному разведению в непрямом варианте иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного протеина (rNC)» (утверждена 5.12.2001г.).

Публикации научных исследований. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на научной конференции «Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику» (Владимир, 2000г.), на заседаниях ученого совета ВНИИЗЖ в 1997-2002гг.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 123 страницах, иллюстрирована 19 таблицами и 13 рисунками. Список используемой литературы включает 139 источников, из которых 121 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту:

Тест-система на основе прямого сэндвич-варианта ИФА для оценки активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) и выявления антигенов вируса PPCC.

Тест-система на основе непрямого варианта ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней методом одного разведения.

Результаты сравнения тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) с наборами ИФА фирмы IDEXX (США) и фирмы HIPRA (Испания).

Результаты использования разработанных тест-систем для определения антител к вирусу РРСС в сыворотках крови зараженных или вакцинированных свиней и для ретроспективной диагностики РРСС.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Вирус и вирусосодержащие материалы. В работе использовали вирус РРСС штаммов «БД», «NVSL», «Lelystad», №2156, а также изолят «Надеево», выделенный и идентифицированный методом ПЦР во ВНИИЗЖ в сентябре 1998г.

Вирус РРСС, штамм «БД», выращивали в культуре клеток MARC-145 и в первичной культуре свиных альвеолярных макрофагов (СAM), полученных от 6-8-недельных поросят, остальные штаммы культивировали только в культуре клеток MARC-145. Вирусосодержащие материалы вируса РРСС штаммов «Lelystad» и «NVSL» получали из лаборатории болезни свиней ВНИИЗЖ, вирус РРСС, штамм №2156, получен в рамках совместной работы с Институтом зоофилактики (г. Брешия, Италия).

Вирус РРСС, штаммов «БД», «NVSL», «Lelystad», №2156 титровали в культуре клеток MARC-145. Титр вируса РРСС штамма «БД» составил 6.0-6.5 lg $\text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$, штамма «NVSL» - 3.0-5.0 lg $\text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$, штамма «Lelystad» - 4.5-5.5 lg $\text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$, штамма №2156 - 3.5-5.0 lg $\text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

В работе использовали вирусосодержащие материалы после проведения 1-3 пассажей в культуре клеток СAM, зараженных 20% суспензией гомогената органов и тканей, отобранных от подозреваемых в заболевании РРСС и больных животных.

Все пробы вирусосодержащих материалов предварительно были тестированы с помощью полимеразной цепной реакции.

Культуры клеток. В работе были использованы 5-тидневная монослойная культура перевиваемых клеток линии MARC-145, выращенная в среде ИГЛА с добавлением 5% фетальной сыворотки, 0.03% гентамицина и 0.01% амфотерицина, а также первичная культура клеток альвеолярных макрофагов свиней, полученная согласно «Методическим рекомендациям по выделению вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) с использованием альвеолярных макрофагов свиней» (С.А. Кукушкин и соавт., 2000).

Рекомбинантный антиген вируса PPCC. В работе использовали полученный во ВНИИЗЖ методом экспрессии в клетках *E. coli* рекомбинантный нуклеокапсидный NC-белок вируса PPCC штамма №2156 с молекулярной массой 13кДа (В.Г. Андреев, С.В. Безбородова, 2002), который индуцировал образование вирусспецифических антител и специфически взаимодействовал с поли- и моноклональными антителами против вируса PPCC. Позднее были получены аналогичные рекомбинантные нуклеокапсидные белки вируса PPCC российского изолята «Надеево-98» и североамериканского референтного штамма «NVSL».

Аффинную очистку белка осуществляли по стандартной никель-хелатной технологии. Концентрация белка в исходном препарате, определенная по методу Брэдфорда, составляла 50-100 мкг/мл. Активность антигена определяли в прямом сэндвич-варианте ИФА.

Аналогично методом экспрессии в клетках *E. coli* были получены рекомбинантные оболочечные протеины GP4, GP5 вируса PPCC штамма №2156 с молекулярной массой 25кДа и 31-35кДа, соответственно.

Сыворотки. *Контрольные сыворотки.* Положительная и отрицательная референтные контрольные сыворотки получены в рамках совместной работы с Институтом зоопрофилактики (г. Брешия, Италия).

Исследуемые сыворотки получали от свиней разных возрастных групп из свиноводческих хозяйств России и Белоруссии. Эти сыворотки предварительно проверяли на наличие антител к вирусу PPCC с помощью ИФА коммерческих наборов HerdChek PRRS фирмы IDEXX (США) и фирмы HIPRA (Испания).

Моноклональные антитела (Мат). Моноклональные антитела 4D8 и 4D5 предоставлены доктором P.Cordioli в рамках совместной работы с Институтом зоопрофилактики (г. Брешия, Италия).

В качестве улавливающих антител использовали Mat 4D8, которые в реакции иммуноблотинга показали специфическую активность с нуклеокапсидным белком вируса PRCС молекулярной массой 15 кДа (Cordioli P., 1996).

В качестве детекторных антител использовали Mat 4D5, меченые пероксидазой хрена, которые также показали специфическую активность в реакции иммуноблотинга с нуклеокапсидным протеином вируса PRCС молекулярной массой 15 кДа (Cordioli P., 1996).

В прямом сэндвич-варианте ИФА моноклональные антитела 4D8, 4D5 показали специфическую активность с вирусом PRCС штаммов "БД", "NVSL", "Lelystad", №2156.

Пероксидазный конъюгат. В исследованиях использовали коммерческий пероксидазный конъюгат против иммуноглобулина IgG свиней, выпускаемый НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи (г.Москва), а также аналогичный конъюгат, выпускаемый фирмой Sigma (США).

Серологические и иммунологические методы исследования

Имуноферментный анализ. В работе использовали прямой сэндвич-вариант, прямой блокирующий вариант и непрямой вариант ИФА (**И-ИФА**).

Коммерческие диагностические наборы: в работе использовали наборы HerdChek PRRS IDEXX (США) (**IDEXX-ИФА**) и CIVTESTsm suis NIPRA (Испания) (**NIPRA-ИФА**) согласно наставлениям по применению.

Статистический анализ материалов. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу Стьюдента. Определение среднего арифметического (\bar{x}) при количестве опытов (n), среднего квадратичного отклонения (σ) средней арифметической, оценку достоверности (?) показателей проводили согласно руководству И.В.Полякова (1975).

Для обработки данных иммуноферментного анализа использовали компьютерную программу **Statistica** на языке Power Basic, которая регрессионным анализом (приближение функций по методу наименьших квадратов) позволяет рассчитывать значения параметров уравнения А, В, значение коэффициента корреляции R, стандартную ошибку и построить линию регрессии.

Позитивно-негативный порог (ПНП) определяли по методу Snyder D.B. (1982) с небольшими модификациями путем расчета средних значений оптической

плотности отрицательных сывороток для каждого разведения с прибавлением трех значений стандартного отклонения. Позитивно-негативный порог, полученный в виде прямой, представлял границу, отражающую верхние 0.5% отрицательных величин.

Титром антигена или сыворотки крови считали последнее разведение, в котором оптическая плотность в два раза превышала среднее значение оптической плотности отрицательного контроля на данном планшете.

Относительную чувствительность и специфичность исследований высчитывали по методу, предложенному Nayhow C.S. (1993).

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Определение активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) на основе прямого сэндвич-варианта ИФА

Разработка данной тест-системы на основе прямого сэндвич-варианта ИФА включала в себя подбор рабочего разведения детекторных и улавливающих моноклональных антител, изучение специфичности и чувствительности этого метода.

Рабочее разведение детекторных и улавливающих моноклональных антител определяли методом шахматного титрования в реакции ИФА. За рабочее разведение моноклональных антител принимали максимальное их разведение, в котором величина оптической плотности равнялась 1.5 единицы, что соответствовало разведению моноклональных антител 4D8 - 1:200, а моноклональных антител 4D5 - 1:100-1:150.

Для определения специфичности и чувствительности системы методом последовательных разведений в ИФА тестировали пробы гомологичных и гетерологичных вирусосодержащих материалов, нормальные культуры клеток и рекомбинантные белки (GP4, GP5, гNC-белок).

В результате проведенных исследований было сделано заключение, что разработанная тест-система чувствительна и специфична.

Этот метод применяли для определения оптимального режима хранения рекомбинантного белка гNC. Стабильность антигена проверяли при хранении его в

температурных режимах: $4-8^{\circ}\text{C}$, $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$, $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ без добавления и с добавлением глицерина в соотношении 1:1. Активность антигена сохранялась при -20°C с добавлением глицерина к препарату белка в соотношении 1:1 в течение 12 месяцев (срок наблюдения). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изменения активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) в зависимости от режима хранения

n=3

Срок хранения (недели)	Конечный титр белка гNC в ИФА при режиме хранения					
	без глицерина			в глицерине (1:1)		
	$4-8^{\circ}\text{C}$	-20°C	-70°C	$4-8^{\circ}\text{C}$	-20°C	-70°C
1	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640
2	<1:5	1:20	1:80	1:40	1:640	1:80
3	-	<1:5	1:40	<1:5	1:640	1:40
4	-	-	1:10	-	1:640	1:40
10	-	-	<1:5	-	1:640	1:20
26	-	-	-	-	1:320	<1:5
52	-	-	-	-	1:160	-

Постоянство концентрации иммобилизованного антигена является необходимым условием для получения воспроизводимых результатов ИФА. В связи с этим исследовали возможность длительного хранения сенсibilизированного рекомбинантного белка на полистироловых планшетах для последующего использования в диагностике. Высушенные при комнатной температуре сенсibilизированные антигеном планшеты хранили до применения при -20°C и $4-8^{\circ}\text{C}$ в герметически закрытых полиэтиленовых пакетах в присутствии осушителя (силикагеля) и периодически испытывали на сохранение исходной активности рекомбинантного белка.

Установили, что результаты реакции не зависели от режима хранения планшет на протяжении 12 месяцев (срок наблюдения), однако, хранение сенсibilизированного белка на плате при 4°C предпочтительнее, чем при -20°C .

2.2.2. Оптимизация условий постановки прямого блокирующего варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней

Одной из самых широко используемых реакций для серодиагностики РРСС является блокирующий вариант ИФА, который имеет высокую специфичность и чувствительность за счет использования моноклональных антител. Отсутствие проблем неспецифического связывания и простота постановки реакции привели нас к решению об использовании данного варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРСС.

Оптимизация условий постановки прямого блокирующего варианта ИФА включала в себя выбор оптимального разведения сывороток и определение позитивно-негативного порога для учета результатов реакции. Результаты блокирующего варианта ИФА сравнивали с результатами, полученными с помощью ИФА набора фирмы ГОЕХХ, и определяли чувствительность и специфичность разработанного варианта.

Для определения позитивно-негативного порога значений S/N тестировали в 3^x повторностях 27 проб сывороток крови от невакцинированных против РРСС клинически здоровых животных, отрицательные по данным ИФА с применением набора фирмы IDEXX. В результате исследования ни одна из заведомо отрицательных проб не показала значений S/N ниже 0.5. Кроме того, вычисленное значение S/N для разграничения результатов реакции с помощью статистических характеристик средних оптических плотностей неспецифической реакции составило также значение, равное 0.5. Поэтому сыворотки со значением S/N выше 0.5 считали отрицательными, ниже 0.5 - положительными.

Для определения оптимального разведения сывороток крови вычисляли отношение S/N для разведений 1:2-1:32. Всего тестировали 71 сыворотку крови от вакцинированных или инфицированных вирусом РРСС свиней, предварительно проверенных с помощью ИФА набора фирмы ГОЕХХ. В результате исследований было выбрано в качестве рабочего разведение 1:2, так как слабоположительные сыворотки уже в разведении 1:4 показывали отрицательный результат.

Для определения чувствительности и специфичности оптимизированного прямого блокирующего варианта ИФА по отношению к набору ИФА фирмы

ШЕХХ, тестировали 71 сыворотку крови от вакцинированных против РРСС или подозреваемых в этом заболевании свиней. В результате проведенных исследований получили, что чувствительность блокирующего варианта ИФА составила 95.3%, специфичность - 96.4%.

2.2.3. Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней

Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА включала в себя определение условий адсорбции рекомбинантного антигена rNC на планшет, т.е. установление оптимальной концентрации белка, времени сенсibilизации и состава сенсibilизирующего буфера, условия отмывания несвязавшихся компонентов, подбора блокирующего буфера, определение режима и времени инкубации сывороток.

Выбор оптимальных условий адсорбции, блокирования и рабочей концентрации антигена. Исследовали влияние различных буферных систем, температуры и времени адсорбции на специфическую активность антигена. Анализ сорбционной способности рекомбинантного белка проводили в непрямом варианте иммуноферментного анализа методом последовательных разведений с использованием контрольных положительной и отрицательной сывороток.

Было установлено, что использование 0.05 М карбонатно-бикарбонатного буфера (рН 9.6-9.7) и режима адсорбции в течение 16-18 часов при температуре 4-8°C является наиболее оптимальным для сенсibilизации лунок планшета рекомбинантным антигеном. Блокирование остаточных свободных центров связывания на планшете с адсорбированным антигеном целесообразнее проводить 10% раствором сухого обезжиренного молока («Marvel», Италия), приготовленном на фосфатном буфере (рН 7.6).

Для выбора оптимальной (рабочей) концентрации сорбируемого антигена методом последовательных разведений ИФА определяли оптическую плотность референтной положительной сыворотки в разведении 1:40 с различными концентрациями иммобилизованного антигена. Результаты показали, что концентрация белка 2.0-5.0мкг/мл является оптимальной для сенсibilизации

планшет. При этом иммобилизованный на планшет антиген практически не изменял своих свойств при температуре 4-8°C в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

Выбор продолжительности инкубации сывороток. Для определения оптимальной продолжительности инкубации сывороток крови методом последовательных разведений ИФА исследовали оптическую плотность контрольных положительной и отрицательной сывороток через 15,30,60,90 минут их взаимодействия с антигеном при температуре 37°C. Результаты исследования показали, что 60 минут при температуре 37°C является оптимальным временем инкубации.

2.2.4. Оптимизация условий постановки непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (rNC) для определения антител к вирусу РРСС в одном разведении сыворотки крови

Для оптимизации условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа необходимо было выбрать оптимальное разведение сыворотки крови для тестирования проб в одном разведении, определить допустимые величины оптических плотностей контрольных сывороток и позитивно-негативный порог для разграничения результатов реакции.

Выбор величины разведения сыворотки крови при тестировании проб в одном разведении. При тестировании сывороток крови методом одного разведения результаты, как правило, представляют в виде отношения величин оптической плотности исследуемой сыворотки (S) и положительного контроля (P) - S/P.

Для определения оптимального разведения сыворотки крови предварительно методом последовательных разведений тестировали сыворотки крови свиней с различным уровнем антител к вирусу РРСС (122 пробы). Для разведений 1:20; 1:40; 1:80 вычисляли значения S/P по формуле:

$$S/P = (OP - NC_x) / (PC_x - NC_x), \text{ где}$$

ОП - оптическая плотность исследуемой сыворотки;

NC - оптическая плотность отрицательного контроля;

PC - оптическая плотность положительного контроля.

Полученные результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica, которая позволила рассчитать значения параметров уравнения, коэффициент корреляции, стандартную ошибку и построить линейную регрессию для каждого из выбранных разведений. Наиболее высокий коэффициент корреляции ($R=0.85021$) с наименьшей стандартной ошибкой 0.03508 был получен для разведения 1:40, поэтому данное разведение было выбрано в качестве рабочего.

Определение позитивно-негативного порога (ПНП). Для обоснования пороговых показателей, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специфическую (положительную) реакции в непрямом варианте иммуноферментного анализа, определяли значения оптической плотности 62 образцов сывороток, не имеющих антител к вирусу РРСС и предварительно тестированных с помощью коммерческого набора фирмы IDEXX.

Позитивно-негативный порог определяли, рассчитывая среднее значение оптической плотности отрицательных сывороток крови для выбранного разведения 1:40, с учетом трех значений стандартного отклонения (σ).

Было установлено, что среднее значение оптической плотности, суммированное с утроенным значением стандартного отклонения, составило для разведения 1:40 - 0.153 оптических единиц (о.е.). Была выделена зона сомнительных результатов, которую определяли как величину средней оптической плотности отрицательных сывороток, прибавляя два стандартных отклонения, что составило 0.134 о.е. Для каждого из установленных значений (0.153 о.е. и 0.134 о.е.) вычисляли S/P - отношения, которые приняли в качестве критериев для разграничения специфической и неспецифической реакций. Было установлено, что сыворотки следует считать отрицательными, если $S/P < 0.2$, или положительными, если $S/P > 0.3$. Результаты тестирования считались сомнительными, если полученные для сывороток значения S/P попадали в промежуточный интервал ($0.2 > S/P < 0.3$).

Определение допустимых величин оптической плотности (ОП) контрольных сывороток. Для определения допустимых величин оптической плотности контрольных сывороток исследовали 18 повторностей положительной и отрицательной референтных сывороток в разведении 1:40. Полученные выборки значений оптической плотности позволили рассчитать соответствующие средние

значений оптической плотности позволили рассчитать соответствующие средние величины, стандартные отклонения и 95% доверительный интервал величин оптической плотности контролен.

Было показано, что допустимыми значениями оптической плотности контрольных сывороток являются значения, лежащие в диапазоне: для положительного контроля - от 0.224 до 0.484 оптических единиц, для отрицательного контроля - от 0.05 до 0.110 оптических единиц.

2.2.5. Сравнение результатов тестирования сывороток крови в Н-ИФА с результатами, полученными с применением IDEXX-ИФА и HIPRA-ИФА

Для установления корреляции между разработанной тест-системой на основе непрямого варианта ИФА (Н-ИФА), ИФА с использованием набора IDEXX (IDEXX-ИФА) и ИФА с использованием набора HIPRA (HIPRA-ИФА) исследовали 127 проб сывороток крови свиней с различным уровнем антител из свиноводческих хозяйств России и Белоруссии. Полученные результаты обработали с помощью компьютерной программы, которая позволила рассчитать коэффициент корреляции между реакциями.

Статистический регрессионный анализ результатов Н-ИФА и IDEXX-ИФА показал наличие парной корреляции между двумя методами, коэффициент корреляции составил 0.89; между результатами Н-ИФА и HIPRA-ИФА коэффициент корреляции составил 0.61. Коэффициент корреляции между результатами IDEXX-ИФА и HIPRA-ИФА был равен 0.65.

Следовательно, разработанный не прямой вариант ИФА имеет сильную корреляционную связь с ШЕХХ-ИФА и слабую с HIPRA-ИФА, поэтому дальнейшие сравнительные исследования проводили относительно коммерческого набора **IDEXX-ИФА**.

Определение чувствительности и специфичности разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА по отношению к ШЕХХ-ИФА

Для сравнительной оценки результатов двух тест-систем тестировали 189 проб сыворотки крови от различных групп животных, подозреваемых в заболевании РПСС или вакцинированных.

В результате получили, что чувствительность разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА составила 97.7%, специфичность - 93.1%.

2.2.6. Применение тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка для исследования сывороток крови от инфицированных или вакцинированных животных

С целью исследования способности разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного белка обнаруживать антитела к вирусу РРСС тестировали сыворотки крови от экспериментально зараженных или вакцинированных против РРСС животных.

С этой целью разработанный не прямой вариант ИФА и IDEXX-ИФА применили для выявления антител к вирусу РРСС изолята «Надеево», изучения напряженности поствакцинального иммунитета после введения животным сухой культуральной вирусвакцины и эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС из штамма «БД», колострального иммунитета у поросят, полученных от вакцинированных свиноматок, а также для подтверждения возможной контактной передачи этого вируса. Для иммунизации животных применяли вакцины, выпускаемые ВНИИЗЖ. Опыты проводили совместно с сотрудниками лаборатории болезней свиней нашего института (зав. проф. Т.З.Байбиков).

Результаты проведенных опытов подтвердили возможность передачи вируса РРСС здоровым животным при совместном содержании с инфицированными. Антитела к вирусу РРСС в сыворотке крови свиней, зараженных изолятом «Надеево», с помощью предлагаемой тест-системы выявляли на 14 день и позже. Сроки выявления антител к вирусу РРСС штамма «БД», относящегося к американской геногруппе, в разработанной тест-системе зависели от антигена, применяемого для постановки реакции. При использовании в качестве антигена рекомбинантного белка европейского генотипа антитела к вирусу РРСС штамма «БД» выявляли не ранее 21 дня и позже, тогда как при использовании рекомбинантного белка американского генотипа антитела к вирусу РРСС этого штамма обнаруживали уже на 14 день и позже.

С целью изучения колострального иммунитета и сравнения полученных результатов с IDEXX-ИФА применили разработанную тест-систему для выявления

антител к вирусу РРСС в сыворотках крови поросят, полученных от свиноматок, вакцинированных эмульсионной инактивированной вакциной и зараженных на 42 день после иммунизации (ДПИ) вирусом РРСС штамма «Lelystad» (таблица 2).

Таблица 2

Результаты исследования сывороток крови поросят от свиноматок, иммунизированных инактивированной вакциной против РРСС штамма «БД» и зараженных на 42 ДПИ вирусом РРСС штамма «Lelystad»

№ свиноматки	Метод выявления антител	Возраст поросят (дни), S/P						
		0	7	21	28	35	42	49
3	Н-ИФА	0.05(-)	0.87(+)	0.34(+)	0.15(-)	(-)	(-)	(-)
	ИДЕХХ-ИФА	0.05(-)	1.85(+)	0.65(+)	0.24(-)	(-)	(-)	(-)
4	Н-ИФА	0.08(-)	0.64(+)	0.5(+)	0.68(+)	0.65(+)	0.8(+)	0.66(+)
	ИДЕХХ-ИФА	0.37(-)	1.28(+)	1.0(+)	1.2(+)	1.35(+)	1.0(+)	0.9(+)

Примечание:

результат в Н-ИФА S/P: <0.2-отрицательный (-), >0.3-положительный (+), 0.2-0.3-сомнительный (\pm);

результат в ШЕХХ-ИФА S/P: <0.4- отрицательный (-), >0.4- положительный (+).

Из представленных в таблице 2 данных следует, что у поросят от свиноматки №4 антитела к вирусу РРСС в сыворотке крови выявляли до 49 дня после рождения (срок наблюдения), тогда как у поросят, полученных от свиноматки №3 этой же группы, положительный результат регистрировали лишь до 21 дня и отрицательный в остальные сроки. Результаты, полученные в реакциях Н-ИФА и ШЕХХ-ИФА, были аналогичными и подтверждают ранее опубликованные данные о сохранении колострального иммунитета у поросят до 30-60 дней (Houben S.,1995; И.Л. Курман, 1999; Б.Г. Орлянкин, 2000).

2.2.7. Применение разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) для ретроспективной диагностики РРСС

Разработанный непрямо́й вариант ИФА на основе рекомбинантного белка гNC использовали для исследования сывороток крови, полученных из хозяйств.

С помощью разработанного варианта ИФА и IDEXX-ИФА было исследовано 205 сывороток крови свиней из 23 хозяйств. Хозяйства разделили на 3 группы. Первую группу составили благополучные по РПСС хозяйства, в которых не проводят вакцинацию поголовья свиней против РПСС (91 проба). Во вторую группу входят благополучные по РПСС хозяйства, в которых осуществляют профилактическую вакцинацию свиней против данного заболевания (53 пробы); в третью группу - неблагополучные по РПСС хозяйства (61 проба). Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3
Сравнительные результаты тестирования полевых сывороток с помощью

ИФА и IDEXX-ИФА

Группы животных	Кол-во проб	ИФА			IDEXX-ИФА		Чув-ть относит IDEXX-ИФА, %	Спец-ть относит IDEXX-ИФА, %
		положит	сомнит	отрицат	положит	отрицат		
Клинически здоровые, не вакцинированные против РПСС	91	3	4	84	-	91	-	92.3
Клинически здоровые, вакцинированные против РПСС	53	28	5	20	29	24	96.6	83.3
Подозреваемые в заболевании РПСС	61	51	4	6	54	7	94.4	85.7
Всего	205	82	13	110	83	122	98.8	90.1

При анализе данных таблицы 3 видно, что результаты, полученные с помощью разработанного непрямого варианта ИФА, практически не отличаются от результатов, полученных с помощью IDEXX-ИФА. Это подтверждает высокую чувствительность и специфичность разработанной тест-системы относительно IDEXX-ИФА.

Таким образом, разработанный вариант ИФА пригоден для выявления антител к вирусу РПСС в сыворотке крови животных из благополучных и неблагополучных по РПСС хозяйств.

Для получения информации о состоянии иммунитета у животных, подозреваемых в заболевании РРСС, с помощью разработанной тест-системы и IDEXX-ИФА, проанализировали уровень антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней из 10 хозяйств России и Белоруссии, неблагополучных по данному заболеванию. Пробы сывороток крови и патологического материала поступали во ВНИИЗЖ (ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных») из хозяйств, в которых наблюдались клинические признаки заболевания у животных. Всего с использованием разработанной тест-системы и IDEXX-ИФА исследовали 254 пробы сывороток крови (рисунок 1).

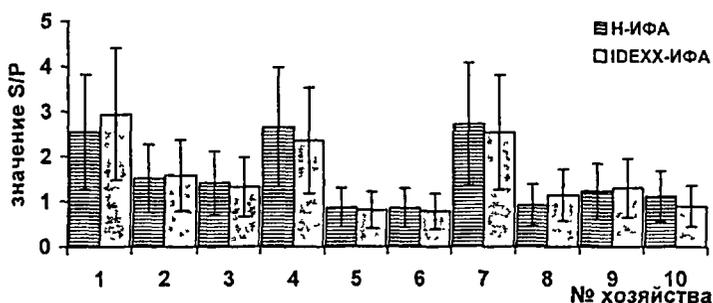


Рис.1. Уровни антител в сыворотках крови свиней из хозяйств, неблагополучных по РРСС

1-7 - хозяйства, проводившие вакцинацию против РРСС;

8-10 - хозяйства, не проводившие вакцинацию против РРСС.

На рисунке 1 видно, что с помощью Н-ИФА и ШЕХХ-ИФА по каждому из хозяйств получили сходные результаты. Однако по разным хозяйствам наблюдали различный уровень антител в сыворотках крови свиней. Уровни антител к вирусу РРСС в сыворотках крови вакцинированных свиней из неблагополучных по РРСС хозяйств более отличаются между собой (S/P варьирует от значений меньше 1.0 до 2.0 и более в обеих реакциях), тогда как в сыворотках крови не вакцинированных свиней, значения S/P близки между собой.

При рассмотрении данных, показанных на рисунке 1, следует заключить, что по уровню иммунного ответа у животных, вакцинированных против РРСС в неблагополучных по РРСС хозяйствах, без дополнительных исследований нельзя

сделать вывод, на какой же вирус образовались эти антитела: вакцинный или полевой.

Разработанную тест-систему мы применили для определения уровня антител к вирусу РРСС в сыворотках крови у животных разных возрастных групп из двух хозяйств, которые проводили профилактическую вакцинацию поголовья, но одно из них благополучное по РРСС, а другое - неблагополучное.

При изучении уровня антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против РРСС, из хозяйств, благополучного и неблагополучного по РРСС, исследовали 76 проб. Сыворотки крови тестировали в Н-ИФА и IDEXX-ИФА.

На рисунке 2 показаны уровни антител в сыворотках крови животных разных возрастных групп из неблагополучного по РРСС хозяйства, на рисунке 3 - благополучного по заболеванию РРСС. Оба хозяйства использовали жидкую эмульсионную инактивированную вакцину ВНИИЗЖ против РРСС и ПВИС согласно инструкции по ее применению.

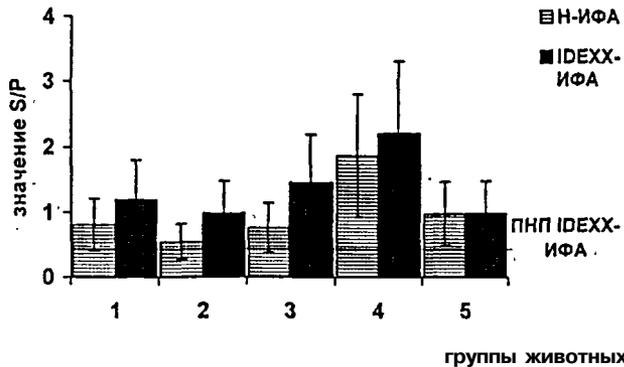


Рис. 2. Уровни антител у вакцинированных свиней разных возрастных групп в неблагополучном по РРСС хозяйстве

- 1- поросята 14- дневного возраста;
- 2- поросята 35- дневного возраста (группа доращивания);
- 3- поросята 52- дневного возраста;
- 4- ремонтные свиньи;
- 5- супоростные свиноматки.

На рисунке 2 видно, что в сыворотках крови всех возрастных групп свиней из неблагополучного по РРСС хозяйства выявляли антитела к вирусу РРСС как с

помощью Н-ИФА, так и IDEXX-ИФА. Наибольший уровень антител установлен в группе ремонтных свиней (S/P значение составляло 1.87 ± 0.97 и 2.2 ± 1.1 , соответственно в Н-ИФА и в IDEXX-ИФА). В группе дорастивания уровень антител к вирусу РРСС был наименьшим относительно других групп, величина S/P равнялась 0.55 ± 0.45 и 0.99 ± 0.5 .

В благополучном по заболеванию хозяйстве (рисунок 3) наблюдали отсутствие или низкий уровень антител у поросят 14-55 дневного возраста. У 14-тидневных поросят значение S/P равнялось 0.28 ± 0.08 в Н-ИФА и 0.31 ± 0.07 в IDEXX-ИФА. У поросят 35-тидневного возраста величина S/P соответствовала 0.22 ± 0.05 и 0.2 ± 0.05 , а у поросят 55-тидневного возраста - 0.18 ± 0.03 и 0.36 ± 0.06 . Более высокие уровни антител к вирусу РРСС выявляли в сыворотках крови супоросных свиноматок и ремонтных свиней (S/P отношение 0.45 ± 0.5 и 0.52 ± 0.48 , 0.75 ± 0.55 и 1.06 ± 0.34 , соответственно).

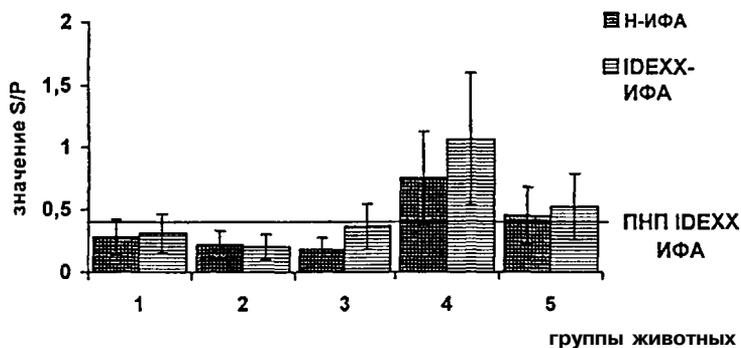


Рис. 3. Уровни антител у вакцинированных свиней разных возрастных групп в благополучном по РРСС хозяйстве

- 1- поросята 14-дневного возраста;
- 2- поросята 35- дневного возраста;
- 3- поросята 55- дневного возраста;
- 4- ремонтные свиней;
- 5- супоросные свиноматки.

Результаты, полученные с помощью разработанной тест-системы и IDEXX-ИФА, совпадали.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение, что разработанная тест-система на основе непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного белка может быть применена для определения уровня антител к вирусу РРСС после вакцинации свиней, колострального иммунитета и для ретроспективной диагностики заболевания.

3. ВЫВОДЫ

1. Разработана тест-система для оценки активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) и выявления антигена вируса РРСС в различных вирусосодержащих пробах на основе прямого сэндвич-варианта ИФА.
2. Оптимизированы условия постановки прямого блокирующего варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней, обеспечивающие специфичность на уровне 96.4% и чувствительность на уровне 95.3% в сравнении с IDEXX-ИФА.
3. Разработана иммуноферментная тест-система для определения титра антител к вирусу РРСС в сыворотках крови переболевших и вакцинированных свиней методом последовательных разведений на основе непрямого варианта ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC).
4. Оптимизированы условия постановки непрямого варианта ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гNC) для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней методом одного разведения (1:40). Корреляция между результатами разработанного непрямого варианта ИФА и IDEXX-ИФА составила 0.89, чувствительность и специфичность по отношению к IDEXX-ИФА равнялись 97.7% и 93.1%, соответственно.
5. Установлено, что сенсibilизированный на планшет рекомбинантный нуклеокапсидный белок при температуре 4-8°C сохраняет активность в течение 12 месяцев (срок наблюдения). Разработанная тест-система на основе непрямого варианта ИФА при использовании одного планшета позволяет в течение рабочего дня исследовать на наличие антител к вирусу РРСС 10 проб сывороток крови методом последовательных разведений или 92 пробы методом одного разведения.

6. Показано, что разработанная тест-система на основе рекомбинантного нуклеокапсидного белка позволяет выявлять антитела к вирусу РРСС в сыворотках крови от зараженных животных через 14 дней и позже.
7. Установлено, что разработанная тест-система на основе непрямого варианта ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного нуклеокапсидного белка (гНС) позволяет выявлять антитела к вирусу РРСС в сыворотках крови вакцинированных животных не ранее 21 дня.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются:

«Тест-система на основе прямого сэндвич-варианта ИФА для оценки активности рекомбинантного нуклеокапсидного белка и выявления антигена вируса РРСС с помощью моноклональных антител»;

«Прямой блокирующий вариант ИФА для выявления антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней с использованием моноклональных антител»;

«Тест-система на основе непрямого варианта ИФА с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка гНС для определения уровня антител к вирусу РРСС в сыворотках крови вакцинированных и переболевших свиней».

Полученные результаты использованы при подготовке 5 методик, которые комиссионно испытаны, одобрены ученым советом и утверждены директором института.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Каньшина А.В., Андреев В.Г., Андреева О.Г., Мудрак Н.С. Оптимизация условий постановки прямого блокирующего варианта ИФА для выявления антител к вирусу РРС в сыворотке крови свиней // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику: Материалы конференции молодых ученых.- Владимир.-2000.-С. 131 -135.
2. Ковалишин В.Ф., Каньшина А.В., Бьядовская О.П., Пыльнов В.В. Диагностика инфекционных болезней свиней // РацВетинформ.-2001.- №2 (октябрь).-С.15-16.
3. Каньшина А.В., Андреева О.Г., Андреев В.Г. Разработка иммуоферментной тест-системы для определения антител к вирусу репродуктивно-респираторного

- синдрома свиней в одном разведении сыворотки крови // Актуальные проблемы патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота: Материалы конференции молодых ученых.-Владимир.-2002.-С.82-87.
- 4.Дудникова Н.С., Пыльнов В.А., Гусева Е.В., Дудников С.А., Каньшина А.В. Выделение вируса РРСС и его адаптация к перевиваемой линии клеток MARC-145 // Ветеринария.-2002, №6.-С.23-25.
- 5.Каньшина А.В., Андреева О.Г., Пыльнов В.А., Андреев В.Г., Безбородова С.В. Применение иммуноферментной тест-системы с использованием моноклональных антител для выявления и титрования различных антигенов вируса РРСС // Материалы межвузовской научно-практической конференции. Кострома, 2003.-Т.1.-С.77.

№ - 5150