

ВНУ

На правах рукописи

Коржов Василий Васильевич

**Разработка компонентов набора для определения
уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей
методом иммуноферментного анализа**

03.00.23 - биотехнология

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

Шелково – 2006 г.

2006 А

3732

На правах рукописи

Коржов Василий Васильевич

**Разработка компонентов набора для определения
уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей
методом иммуноферментного анализа**

03.00.23 - биотехнология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

Шелково – 2006 г.

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности (ВНИТИБП) Российской академии сельскохозяйственных наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Кузнецова Светлана Владимировна

Научный консультант: доктор ветеринарных наук
Литвинов Олег Борисович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Клюкина Валентина Ивановна

доктор биологических наук,
Верховский Олег Анатольевич

Ведущее учреждение: Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии им. К.И. Скрябина
(МГАВМиБ, г. Москва).

Защита состоится 24 марта 2006 года в 12 часов на заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Д 006.069.01 во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности (141142, г. Щелково, Московская область, пос. Биокомбинат, ВНИТИБП).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан 22 февраля 2006г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Ю.Д.Фролов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Одним из движущих факторов развития экономики нашей страны является научно-технический прогресс, способствующий ускорению развития народного хозяйства путем интенсификации науки и производства, внедрения новых технологий. Процесс интенсификации охватывает и биологию в самом широком смысле слова.

В связи с развитием конного спорта и увеличением количества коневодческих хозяйств в нашей стране, становится актуальной проблема диагностики и ликвидации ряда инфекций. Инфекционная ринопневмония (РПЛ) – одна из наиболее распространенных инфекционных болезней в коневодстве. В естественных условиях вирус РПЛ поражает лошадей, ослов и мулов, независимо от пола, породы и возраста. Отмечено, что чистокровные лошади более восприимчивы, чем полукровки и местные породы.

Инфекционная ринопневмония лошадей наносит значительный экономический ущерб коневодству, который складывается из потери воспроизводительной способности конематок, недополучения приплода, выбраковки ценных в племенном отношении лошадей и проведения ветеринарно-санитарных мероприятий. Возникнув в коневодческом хозяйстве любого типа (конный завод, племенная конеферма, ипподром, конноспортивный комплекс и др.), РПЛ принимает характер стационарной инфекции. Острое течение инфекции чередуется с периодами стертого атипичного проявления болезни, что крайне осложняет диагностику заболевания. Изучение РПЛ в течении последнего времени показало актуальность данной проблемы.

Поэтому в системе мер, направленных на борьбу с ринопневмонией лошадей, важное значение имеют быстрые и точные методы лабораторной диагностики. Используемые в настоящее время в ветеринарной практике серологические методы диагностики имеют определенные недостатки. Предварительная клиническая диагностика респираторной формы болезни затруднительна, так как симптомы заболевания сходны с клиникой других вирусных и бактериаль-

ных болезней, особенно таких, как грипп лошадей, вирусный артеринит, бруцеллез или вообще клиника не проявляется (88).

Диагностика инфекционной ринопневмонии включает клинический осмотр, учет нарастания случаев абортов во второй половине жеребости, выделение и идентификацию вируса на культуре клеток, выявление антител различными методами диагностики (РИФ, РН, ПЦР, РТГА, РГА, РСК).

Несмотря на то, что ветеринарная практика имеет в своем распоряжении большой набор диагностических сывороток и диагностикумов, улучшения качества и стандартизация диагностических препаратов для практических лабораторий по-прежнему остается важной задачей.

При диагностике вирусных и бактериальных инфекций в ветеринарии все более широкое применение находят такие современные и высокоточные методы, как молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако ввиду их высокой стоимости, сложности в постановке и необходимости дорогостоящего оборудования и реактивов метод определения антигенов и антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) при оптимальном соотношении себестоимость-чувствительность остается действенным инструментом в ветеринарной лабораторной практике. Высокая разрешающая способность этого метода обусловлена, главным образом, природой лиганда, степенью очистки компонентов и чувствительностью приборов, регистрирующих наблюдаемый эффект. Таким образом, очистка и концентрирование вирусов является решающим условием при изготовлении диагностикумов и получении высокоактивных иммунных сывороток, используемых при создании компонентов, необходимых для проведения иммуноферментного анализа.

Для получения антивидовых иммуноглобулинов животных, меченых пероксидазой из хрена (ПХ), необходимо наличие чистых препаратов иммуноглобулинов G, M и A классов.

Методы выделения иммуноглобулинов из сыворотки человека разработаны детально, но применительно к иммуноглобулинам животных они не всегда эффективны. Использование многих иммунологических методов для решения

прикладных задач в области ветеринарии сдерживается отсутствием коммерческих моноспецифических антисывороток. Идеальным условием получения моноспецифических антисывороток представляется иммунизация продуцентов чистыми антигенами.

Ключевым моментом в отработке твердофазного непрямого ИФА является получение конъюгата, то есть иммуноглобулина меченого пероксидазой. Качество получаемого конъюгата находится в прямой зависимости от серологической активности иммуноглобулина, активности фермента и условий связывания этих компонентов.

Быстрый и точный диагноз инфекционной ринопневмонии лошадей является решающим условием организации необходимых мер борьбы с этим заболеванием.

Перечисленные выше обстоятельства явились основополагающими в создании иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу РПЛ, что позволит решить проблему массового эпизоотологического обследования поголовья лошадей.

1.2. Цели и задачи исследования.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлась разработка тест-системы на основе концентрированных и аффинно-очищенных антигенов вируса РПЛ, штамм СВ/69, при использовании их в качестве компонента набора для постановки серологических реакций и иммуноферментного анализа при определении уровня антител к вирусу РПЛ в сыворотке крови лошадей.

Решались следующие задачи:

- 1.2.1. Разработать метод получения очищенного и концентрированного вируса РПЛ, штамм СВ/69, репродуцированного в культуре клеток ПТ-80 и изучить его биологические свойства;

- 1.2.2. Выделить поверхностные антигены вируса РПЛ, изучить их состав в электрофорезе и активность в иммуноблоттинге и получить на их основе иммуносорбент на BrCN сефарозу
- 1.2.3. Выделить IgG лошади, получить анти-IgG лошади антисыворотки на кроliках, выделить анти-IgG лошади антитела и синтезировать анти-IgG лошади иммунопероксидазный конъюгат
- 1.2.4. Выделить на полученном сорбенте специфические к антигенам вируса РПЛ антитела и иммобилизовать их в качестве лиганда на BrCN сефарозу
- 1.2.5. Разработать тест - систему для определения уровня антител к вирусу РПЛ на основе аффинно-очищенных антигенов вируса РПЛ методом иммуноферментного анализа
- 1.2.6. Провести сравнительную оценку определения уровня анти-РПЛ антител в серологических реакциях (РН, РТГА) и разработанной иммуноферментной тест - системе

1.3. Научная новизна.

- Разработан метод получения очищенных и концентрированных поверхностных антигенов вируса РПЛ, репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, с помощью препаративной аффинной хроматографии на анти-РПЛ IgG BrCN Сефарозе
- Выявлено 10 структурных гликопротеинов вируса РПЛ, штамм СВ/69 с молекулярной массой от 24 до 260 кД, которые отщепляются Тритоном X-100
- В иммуноблоттинге показано, что 10 белков вируса РПЛ, отщепляющиеся при обработке Тритоном X-100, индуцируют выработку анти-РПЛ антител в организме животных

- Разработана тест-система для определения уровня антител к вирусу РПЛ методом иммуноферментного анализа на основе аффинно очищенных антигенов вируса РПЛ, штамма СВ/69.

1.4. Практическая значимость работы.

Результаты проведенных исследований позволили разработать инструкцию по изготовлению и проект нормативно-технической документации на «Тест-систему для определения уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей методом иммуноферментного анализа». Набор предназначен для индикации и количественного определения анти-РПЛ антител в сыворотках крови лошадей.

Внедрение в практику ветеринарии иммуноферментной тест - системы для определения уровня антител к вирусу РПЛ позволит решить проблему массового эпизоотологического обследования поголовья лошадей, на территории РФ так и на территориях других стран, составляющего основу мероприятий по предотвращению, ликвидации и предупреждению распространения инфекционной ринопневмонии лошадей.

Внедрение в практику «Тест-системы для определения уровня антител к вирусу РПЛ в иммуноферментном анализе» позволит проводить диагностику РПЛ в племенных и пользовательских хозяйствах (ипподромы, заводов, частных конферм и др.) в качестве профилактических мер по предупреждению РПЛ, что будет способствовать оздоровлению хозяйств, обеспечению эпизоотологического благополучия, повышению сохранности молодняка и продуктивности поголовья.

1.5. Апробация работы.

Материалы исследований доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ВНИТИБП (2003 – 2005 г.г.), на 3-й международной научно-практической конференции «Современные технологические и селекционные аспекты развития животноводства в России», Дубровицы (2005 г.), на междуна-

родном симпозиуме «Защита животных от экотоксинов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний», Казань (2005 г.)

По материалам диссертации опубликовано 3 работы.

1.6. Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 143 страницах машинописного текста и состоят из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы и практические предложения, список литературы, содержащий 90 отечественных и 144 зарубежных источника и приложение. В приложении представлены документы, подтверждающие результаты отдельных этапов работы, их научную и практическую ценность. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами, 24 рисунками и 1 схемой.

Автор выражает глубокую благодарность академику РАСХН, профессору А.Я. Самуйленко и профессору Кузнецову Д.П. за научно-методическую помощь в организации и проведении исследований.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена во ВНИТИБП в 2002 -2005 гг. в рамках Программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на 2000 – 2005г.

В работе использовали:

Вирус ринопневмонии лошадей (РПЛ), штамм «СВ/69», репродуцированный в перевиваемой культуре клеток почки телят (ПТ-80), первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК), перевиваемой культуре клеток почки свиньи (СПЭВ) и перевиваемой культуре клеток почки кошки (CrFK).

Питательные среды: среда Игла, 199, ГЛАХ (институт полиомиелита, г. Москва); сыворотка КРС для культуральных работ (ООО Фуру), фетальная сыворотка коров (ООО Фуру).

Животные: кролики массой 2,5 – 3,0 кг. Содержание и кормление кроликов проводили согласно принятым нормам.

Дезинтеграцию клеточных суспензий осуществляли на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при 22 кГц в течение 10 секунд импульсивно 6 раз.

Концентрирование вируса РПЛ проводили осаждением ПЭГ с различной молекулярной массой и в различных концентрациях, высаливанием сульфатом аммония, ультрафильтрацией на полупроницаемых мембранах и осаждением ультрацентрифугированием при различных скоростях и продолжительности.

В работе по очистке вируса РПЛ от баластных белков использовали ультрацентрифугирование в градиентах сахарозы и Фикола-400. Плотность каждой фракции определяли на рефрактометре RL по составленным калибровочным кривым. В качестве контроля использовали дезинтегрированные ультразвуком незараженные вирусом РПЛ клетки ПТ-80.

Титр инфекционности вируса определяли по $TCD_{50/мл}$ на культуре клеток ПТ-80 в 24-луночных микропланшетах для культуральных работ. Результаты оценивали по цитопатическому действию через 3 - 5 суток после заражения клеток и рассчитывали титр вируса по методу Ашмарина И.П.

Гемагглютинирующую активность определяли по методу Крюкова Н.Н. и др. с оценкой реакции по общепринятой крестовой системе. В реакции использовали, эритроциты лошади, сыворотки лошадей с подтвержденным диагнозом и предварительно протестированные в РТГА.

РТГА проводили согласно инструкции по применению Набора для диагностики РПЛ.

Поверхностные антигены вируса РПЛ, штамм «СВ/69» отщепляли путем обработки вирус-содержащей суспензии Тритоном X-100.

Общий белок определяли по методу Лоури и на спектрофотометре СФ-26. Процент очистки вируса рассчитывали на инфекционную дозу.

Вируснейтрализующую активность сывороток определяли в реакции вируснейтрализации на 96-ти луночных микропланшетах по методу Florent G.

Электрофорез в ДСН – ПААГ проводили по методу Лазмли.

Электроперенос белков после окончания электрофореза в ДСН – ПААГ осуществляли по методике Тоубина.

Иммуноиндикацию антигенов вируса РПЛ на нитроцеллюлозных мембранах проводили в непрямом методе ИФА.

Гипериммунные антисыворотки к IgG лошади получали по методу разработанному в лаборатории иммунологии и утвержденному на методическом совете ВНИТИБП.

Иммуноглобулины класса G (IgG) выделяли из цельной сыворотки лошадей высаливанием сернокислым аммонием с последующим обессоливанием препарата гельфильтрацией на сефадексе G-25 и очисткой ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-Трисакрил-М.

Очистку анти-IgG проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными на BrCN-Сефарозу 4В очищенными иммуноглобулинами.

Контроль чистоты препаратов IgG осуществляли с помощью диск-электрофореза в 7,5 % полиакриламидном геле (ПААГ).

Однородность и специфичность препаратов IgG проверяли с помощью иммуноэлектрофореза.

Для получения конъюгатов анти-IgG лошади с пероксидазой из хрена использовали перйодатный метод Nakane P. При проверке активности конъюгатов использовали метод прямого твердофазного ИФА. Рабочее разведение конъюгата определяли согласно временной инструкции по изготовлению и контролю антивидовых иммуноглобулинов, меченных пероксидазой, утвержденной Главбиопромом Агропрома СССР в 1986г. Реакцию учитывали на автоматическом спектрофотометре.

В работе использовали стандартные методы прямого и непрямого твердофазного ИФА на 96 луночных микропланшетах по Engvall и др., а также метод конкурентного ИФА по Van Weemen и др. Результаты анализа учитывали визуально и фотометрически через 10 - 15 минут после внесения субстратного раствора.

Результаты исследований обрабатывали статистически в программе Microsoft Excel.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выбор культуры клеток для репродукции вируса ринопневмонии лошадей, штамм «СВ/69»

Вирус РПЛ, штамм СВ/69 репродуцировали в перевиваемой культуре клеток почки теленка – ПТ-80, в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) (на уровне 5 - 30-го субпассажа)

Клетки выращивали на культуральной среде содержащей половину среды Игла, половину среды 199, 10% сыворотки КРС для культуральных работ, предварительно протестированной на наличие антител к вирусу ИРТ, либо 5% фетальной сыворотки КРС, 2 мМ глютамина, 1 мМ пирувата натрия и 40 единиц гентамицина на литр среды.

После образования монослоя клеток ПТ-80 его трижды отмывали раствором Хенкса и инокулировали вирус РПЛ, штамм СВ/69, в течение часа при 20 °С из расчета 0.1-1 ТЦД₅₀ на клетку. Затем добавляли бессывороточную среду ГЛАХ (гидролизат лактальбумина на растворе Хенкса), содержащую 40 единиц гентамицина на литр среды.

Первые признаки цитопатического действия вируса РПЛ, штамм СВ/69, на перевиваемой культуре клеток ПТ-80 проявлялись через 12 часов. После проявления 80% ЦПД, через 72 часа, клетки разрушали однократным замораживанием-оттаиванием, культуральные матрасы встряхивали и осаждали клеточный детрит центрифугированием при 5000 об/мин в течение часа. Надосажденную вируссодержащую среду исследовали на инфекционную и гемагглютинирующую активность.

Определение титра инфекционности вируса РПЛ проводили в 24-луночных панелях по ТЦД_{50/мл} на культуре клеток ПТ-80. Посевная концентрация клеток составила 120-150 тыс./мл. После формирования монослоя из лунок

удаляли ростовую среду, однократно промывали раствором Хенкса и вносили вирус (предварительно раститрованный на среде поддержки без сыворотки от 10^{-2} до 10^{-8}) в количестве 1 мл на лунку. Результаты оценивали по цитопатическому действию через двое – трое суток после заражения клеток и рассчитывали титр вируса по методу Ашмарина И.П.

Вирус РПЛ, выращенный в перевиваемой культуре ПТ-80, проявлялся в реакции РГА в титрах 1:8-1:16, обладал инфекционностью на уровне 6.9-7.1 lgТЦД_{50/мл}, 80% цитопатический эффект проявлялся на 3 сутки культивирования. Ни в одном эксперименте не удалось репродуцировать вирус РПЛ, штамм СВ/69, в перевиваемой культуре клеток – СПЭВ. При репродукции вируса РПЛ в первично-трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона коровы, вирус накапливался в титрах 5.6-6.1 lgТЦД_{50/мл} и проявлялся в РГА в титрах от 1:4 до 1:8. При репродукции вируса РПЛ в перевиваемой культуре почки кошки – CrFK, вирус проявлялся в реакции РГА в титрах 1:2-1:4, обладал инфекционностью на уровне 5.8-6.4 lg ТЦД_{50/мл}, 80% цитопатический эффект проявлялся на 4 сутки культивирования.

В образцах первично-трипсинизированной культуры клеток почки эмбриона коровы (ПЭК), инфицированных дозой 0.1-1 ТЦД₅₀/клетку, вирусные частицы с типичной для вируса РПЛ морфологией обнаруживаются уже через 12 ч, достигая максимума к 72 ч культивирования.

Очистка и концентрирование вируса РПЛ.

Для получения очищенных и концентрированных препаратов вируса РПЛ было использовано несколько принципов выделения вируса из вирусосодержащих суспензий.

При концентрировании вируса РПЛ, штамм «СВ/69», были изучены различные условия осаждения его полиэтиленгликолем (ПЭГ) с различным молекулярными массами: 3000, 6000 и 20 000 дальтон в концентрации 5.0, 7.5 и 10.0%.

При концентрировании вируса РПЛ, штамма СВ/69, ПЭГ очистка вируса достигает 88.1 – 97.6%. Потеря вируса равна 36.9 – 84.2%. Лучшие результаты

получены в случае применения ПЭГ с молекулярной массой 6000 дальтон в концентрации 7.5%. Очистка вируса равна 97.6%, а потеря 36.9%.

Для концентрирования вируса РПЛ также был использован принцип осаждения вируса высаливанием. Для этой цели использовали 40% сульфат аммония. До 59.4% вируса РПЛ, штамма СВ/69, осаждается 40% сульфатом аммония при концентрировании в 10 раз. Очистка от балластных белков составляет в этом случае 71.6 %.

Метод ультрафильтрации позволяет концентрировать препараты вируса РПЛ в 10 – 50 раз. Особенностью концентрирования вирусной суспензии на ядерных фильтрах является снижение в концентрате количества общего белка. При концентрировании вирусной суспензии по объему в 10 – 50 раз количество белка в расчете на инфекционную дозу вируса снижается на 85.0 – 87.4%. Однако общее количество белка в концентрате при этом многократно увеличивается, что не позволяет добиться очистки вируса. При концентрировании препарата в 10 раз потеря вируса не наблюдалось, с повышением кратности концентрирования до 50 раз потеря вируса составляла 20.4%.

Наряду с концентрированием вышеописанными методами испытывался также метод осаждения вируса высокоскоростным ультрацентрифугированием. Вирус из предварительно осветленной низкоскоростным центрифугированием культуральной жидкости осаждали при 90000g в течение 1, 2, 3, 4 и 5 часов. Высокоскоростное центрифугирование при 90000g в течение 5 часов позволяет практически полностью без потерь осадить вирус РПЛ из вирусосодержащей суспензии. Очистка при этом достигает 97,2

Концентрированный и частично очищенную вирусосодержащую культуральную среду центрифугировали при 90000g в ступенчатом градиенте сахарозы от 15 до 55% с диапазоном изменения концентрации в 10%. По окончании ультрацентрифугирования собирали фракции по 1 мл. В каждой фракции измеряли рефрактометрический индекс, титр инфекционности, титр гемагглютинирующей активности и титр в ИФА. Пик инфекционной активности приходится на фракции с плотностью $1,20\text{г/см}^3$, соответствующий уровню 45% сахарозы, с

выходом вируса до 63,8%. Одновременно происходит очистка на 97,1%. Максимумы активности в ИФА и РСК совпадают с пиком инфекционной активности.

Определение плавучей плотности вируса РПЛ, штамм «СВ/69», позволило при очистке вируса использовать центрифугирование на «подушке» сахарозы или иначе на градиентную интерфазу. На дно центрифужной пробирки помещали «подушку» из 55% сахарозы с плотностью 1.25г/см^3 , затем наслаивали 45% сахарозу с плотностью 1.20г/см^3 , а сверху – 25% сахарозу с плотностью 1.10г/см^3 . На такой преформированный ступенчатый градиент наслаивали вирусный препарат. Центрифугирование проводили при 161000г в течение 90 минут.

Вирус локализовался в интерфазе между 25% и 55% сахарозы. Посторонние компоненты, с меньшей плавучей плотностью (белки и нуклеиновые кислоты), через зону 45% сахарозы не проходят и остаются в верхней части центрифужной пробирки. При этом достигается не только очистка на 99.6% (3.2мг/мл белка в исходном препарате и 0.19мг/мл – в конечном), но и концентрирование его в 6 – 7 раз. Выход вируса составил 84.2%.

Таким образом, ультрацентрифугирование вируса РПЛ в градиенте плотности 15% - 55% и на «подушке» сахарозы позволяет получить высокоочищенный и концентрированный препарат вируса РПЛ. Плавучая плотность вируса РПЛ, штамм СВ/69, в растворе сахарозы равна 1.20г/см^3 .

Была также определена плавучая плотность вируса РПЛ в градиенте Фиколл – 400. Для этого очищенный и концентрированный вирус на этапе осаждения ПЭГ М-6000 ресуспендировали в 0.06М трис-НСl буфере, содержащем 0.1М NaCl и 1мМ ЭДТА (ТНЕ буфер), pH 6.8 и осветляли низкоскоростным центрифугированием при 5000г в течении 10 минут. Вирус из надосадка осаждали ультрацентрифугированием при 90000г в течение 4 часов. Осадок ресуспендировали в ТНЕ буфере и наносили на линейный 10% - 40% градиент Фиколла-400. Центрифугирование проводили при 90000г в течение 4 часов.

По окончании центрифугирования собирали фракции по 1 мл. В каждой фракции измеряли рефрактометрический индекс, титр инфекционности, титр гемагглютинирующей активности и активность в непрямом твердофазном ИФА. Результаты представлены на рисунке 5.

Вирус РПЛ концентрировался в двух зонах, соответствующих 19% и 29% Фиколла-400 с плотностью 1.065 и 1.098 г/см³, соответственно, так как здесь были наивысшие титры инфекционности вируса, его гемагглютинирующая активность, и активность в ИФА.

Фракции, содержащие вирус РПЛ, объединяли. Степень очистки определяли по отношению титра инфекционности вируса к количеству общего белка. В результате проведенной работы вирус был очищен в 156 раз, потери составили 49%.

Таким образом, в линейном 10% - 40% градиенте плотности Фиколла-400 вирус РПЛ штамм «СВ/69» располагался в двух зонах и имел плавучую плотность 1.065 и 1.098 г/см³, соответственно.

Суммируя результаты экспериментов по концентрированию и очистке вируса РПЛ, штамм СВ/69, репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, (Таблица 11) можно заключить, что осаждение вируса ПЭГ с молекулярной массой 6000 Д в концентрации 7.5% наиболее приемлемый способ для первоначального концентрирования и очистки вируса, так как при концентрировании в 10 раз позволяет, во-первых, удалить более 95% балластного белка при потере не более 37% инфекционных частиц вируса, во-вторых, работать одновременно с большим объемом вирусосодержащей суспензии. Сульфат аммония осаждает вместе с вирусным материалом большее количество балластного белка – очистка не превышает 71%. Ультрафильтрация, несмотря на возможность работы с большими объемами вирусосодержащего материала и сохранения до 85% инфекционных вирусных частиц не позволяет добиться одновременной очистки, так как количество балластного белка, в расчете на инфекционную дозу, увеличивается при концентрировании в 50 раз на 42%. Процесс осаждения вируса ультрацентрифугированием при 90000g в течение 5 часов позволяет практиче-

ски без потерь осадить вирус на дно центрифужной пробирки при очистке до 96%, но очень трудоемок и позволяет одновременно очищать не более 40 мл вирусосодержащей культуральной среды. Тоже самое можно отметить относительно ультрацентрифугирования в градиентах сахарозы и Фиколла-400.

Определив условия концентрирования вируса РПЛ, штамм СВ/69, репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, вышеописанными методами, была составлена схема получения концентрированного и очищенного вируса, включающая осаждение вируса из культуральной среды ПЭГ с молекулярной массой 6000 Д в концентрации 7.5%, переосаждение осадка ультрацентрифугированием при 90000g в течение 5 часов и осаждение полученного материала на градиентную интерфазу сахарозы.

Таким образом, получены препараты вируса РПЛ, которые использовались для изучения белкового состава вируса, выделения гликопротеинов, обладающих антигенной активностью, с целью синтеза иммуносорбента для выделения анти-РПЛ антител из сывороток естественно переболевших животных.

При определении условий хранения вируса РПЛ, штамм «СВ/69», репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, его помещали в условия, при которых, температура соответствовала -50° , -20° , -7° , $+4^{\circ}$, $+20^{\circ}$ и $+37^{\circ}\text{C}$.

Вирус РПЛ хранится в условиях температуры от $+4^{\circ}$ до -50°C практически без снижения титра инфекционности в течение 1 месяца. При дальнейшем хранении вируса происходит снижение титра инфекционности на 1 lg ТЦД_{50/мл} практически ежемесячно.

В течение первых суток титр инфекционности вируса РПЛ, штамм «СВ/69», репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, снижается с 5,75 до 5,5 lg в условиях температуры $+20^{\circ}$ и до 4,5 lg - при $+37^{\circ}\text{C}$. Далее при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ титр инфекционности снижается до 0 через 4 суток и до 2,25 lg при $+20^{\circ}\text{C}$.

Антиген вируса РПЛ для определения уровня антител методом иммуноферментного анализа

Для изучения поверхностных гликопротеинов вируса РПЛ, их выделяли из концентрированной вирусосодержащей суспензии, которую обрабатывали 1% тритоном X-100 и инкубировали при $+20^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут на шейкере. Нуклеокапсид и неразрушенные вирусные частицы осаждали центрифугированием при 100 тыс. g в течение четырех часов, а надосадов концентрировали ультрафильтрацией на мембране с пределом исключения 3 кД до концентрации 500 мкг/мл. Далее белки разделяли электрофорезом в ДСН-ПААГ.

Тритонем X-100 отщепляется 10 белков с ММ 260, 150, 138, 90, 87, 65, 62, 50, 46, 24 кД.

Вирусные белки, индуцирующие выработку анти-РПЛ антител у восприимчивых к ринопневмонии животных, определялись посредством иммуноблоттинга с индикацией белков в непрямом методе ИФА. В качестве анти-РПЛ антитисыворотки использовали сыворотку от переболевших животных в разведении 1:50 (титр в непрямом ИФА 1:25600). У переболевших животных вырабатываются антитела к 10 (ММ 260, 150, 138, 90, 87, 65, 62, 50, 46, 24 кД) белкам.

Таким образом, в составе вируса РПЛ, штамм «СВ/69», выявлено 10 гликопротеинов, отщепляющихся при обработке Тритонем X-100 с ММ от 24 до 260 кД, которые индуцируют выработку анти-РПЛ антител у зараженных ринопневмонией лошадей.

Концентрированные ультрафильтрацией белки вируса РПЛ, отщепленные Тритонем X-100 были иммобилизованы на BrCN Сефарозу 4В по стандартной методике.

Полученный таким образом иммуносорбент был использован для аффинного выделения анти-РПЛ антител из сывороток естественно переболевших животных. Элюированные с колонки анти-РПЛ IgG сразу переводили с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-25 в буфер для иммобилизации на носителе, концентрировали ультрафильтрацией и осветляли центрифугированием при 5000g в течение 30 минут. Очищенные и концентрированные анти-РПЛ IgG пришивали к активированной BrCN-Сефарозе 4В в количестве 6мг белка на 1мл геля, согласно инструкции производителя.

Колонку с анти-РПЛ IgG иммуносорбентом трижды промывали 0.1М глицин-HCl и ЗФР, затем уравнивали ЗФР, содержащим 0.1% Тритон X-100 и через подготовленную таким образом колонку пропускали вируссодержащую суспензию в режиме замкнутого реактора в течение ночи при +4 °С. После отмывки колонки десятью объемами ЗФР, содержащим 0.1% Тритона X-100, и пятью объемами ЗФР элюировали вирусные белки 0.1М глицин HCl, pH 2.0. Элюат немедленно нейтрализовали 1М NaOH. Элюируемые фракции контролировали путем отбора 5 – 50мкл из собираемой фракции для некачественного анализа по Бредфорду. Во фракции определяли содержание белка, объединяли и немедленно концентрировали для дальнейшего исследования ультрафильтрацией в ячейке ФМ001 на мембране с пределом исключения 3кД при давлении 0.3мПа до концентрации 0.1мг/мл. Затем колонку уравнивали адсорбирующим буфером содержащем 0.02% азида натрия.

Степень очистки полученного препарата определяли с помощью электрофореза в 7.5% ДСН-ПААГ. С помощью аффинной хроматографии удается выделить гликопротеины вируса РПЛ практически без примесей.

Специфичность аффинно очищенных гликопротеинов определяли в иммуноблоттинге с анти-РПЛ сывороткой лошади после электрофореза в 7.5% ДСН-ПААГ. Все гликопротеины сохранили свою антигенную активность после аффинной очистки на иммуносорбенте с анти-РПЛ IgG.

Таким образом была получена матрица для одностадийной очистки антигенов вируса ринопневмонии лошади из вируссодержащих суспензий, использование которой позволяет практически без потерь выделять поверхностные белки вируса РПЛ.

Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа для определения уровня антител к вирусу РПЛ

С целью оптимизации условий постановки реакции ИФА, необходимо подобрать концентрации используемых компонентов. Оптимальную концентрацию антигена для ИФА установили его титрованием с положительной (спе-

цифичной к вирусу РПЛ) и отрицательной (от здоровых животных) сыворотками в разведении 1:100 в прямом ИФА.

Оптимальная концентрация антигена составила 1мкг/мл, что обеспечивало высокий уровень оптической плотности и достоверное различие результатов со специфической (ОП₄₉₀ 1.8 – 1.6) и контрольной сыворотками (ОП₄₉₀ 0.150 – 0.200).

Для установления пороговой чувствительности ИФА определяли зависимость величины ОП₄₉₀ в реакции ИФА от разведения контрольных сывороток при оптимальной концентрации сорбированного антигена вируса РПЛ. Двукратные разведения сывороток начинали с разведения 1:50. Достоверно регистрируемое различие в показаниях ОП₄₉₀ (более чем в 2 раза) наблюдалось при разведении специфической и контрольной сывороток с 1:400. При разведении ниже 1:400 наблюдается неспецифическое взаимодействие, что сказывается на результатах реакции.

Таким образом, была определена концентрация антигена вируса РПЛ и положительных сывороток, которые были использованы для определения уровня антител к вирусу РПЛ иммуноферментным методом.

Выявление антител к вирусу РПЛ методом иммуноферментного анализа.

Методом ИФА было исследовано 235 сыворотки лошади, полученных из различных хозяйств и по наличию специфических антител к вирусу РПЛ были определены благополучные и неблагополучные по РПЛ хозяйства.

Из всех положительных сывороток с установленным титром антител в ИФА произвольно взяли 107 и исследовали в реакции вируснейтрализации и торможения гемагглютинации.

Сравнительные исследования 107 сывороток лошади в реакциях РН и ИФА показали, что 93 образца, которые имели в реакции нейтрализации титр антител 1:4 и выше, давали в ИФА титры не менее, чем 1:400. Кроме того, титр 14-ти отрицательных в реакции вируснейтрализации сывороток (титры не более, чем 1:2) не превышали в ИФА – 1:200.

Результаты, полученные в ИФА, сравнивали с результатами, полученными в РТГА. 28 сывороток отрицательных в РТГА (т.е. титр $\leq 1:4$) давали в ИФА титр не более, чем 1:200, что позволяет отнести их с отрицательным или сомнительным. Обе методики ставятся без использования культуры клеток, быстры и позволяют исследовать большое количество сывороток. Преимуществом метода ИФА является инструментальный учет результатов, что исключает субъективность их оценки.

Таким образом, при сравнительной оценке уровня анти-РПЛ антител, полученных различными методами (РТГА, РН и ИФА), установлено, что результаты титрования сывороток в ИФА имеют высокий коэффициент корреляции ($r = 0.94$) с результатами РН и РТГА ($r = 0.86$), чувствителен, быстр в исполнении и может быть использован при определении уровня анти-РПЛ антител при обследовании большого количества животных.

Набор для определения уровня антител к вирусу РПЛ в иммуноферментном анализе

В результате проведенных исследований были получены компоненты набора для определения уровня антител к вирусу РПЛ, определены условия постановки тест-системы ИФА и создан набор определяющий уровень анти-РПЛ антител. Набор предназначен для массового серологического обследования поголовья лошадей на наличие антител к вирусу РПЛ методом ИФА.

Сущность иммуноферментной реакции заключается в специфическом взаимодействии антител и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу антивидового иммуноглобулина, меченного ферментом, способным вызвать разложение субстрата с образованием цветного продукта ферментативной реакции.

Набор представляет собой комплект биологических и химических компонентов, использующихся при постановке реакции, и полистироловой 96-луночной микропанели, сенсibilизированной антигеном вируса РПЛ и положительной и отрицательной контрольными сыворотками.

Биологические компоненты:

№1. Разборный иммунологический планшет сенсibilизированный антигеном вируса РПЛ – 2 шт.

№2. Позитивная контрольная сыворотка 0,1 см³ - 1 фл.

№3. Нормальная контрольная сыворотка 0,1 см³ - 1 фл.

№4. Конъюгат иммунопероксидазный анти-IgG лошади 1 см³, - 1 фл.

Химические компоненты:

№5. Буфер для растворения конъюгата 1,5 см³, - 1 фл

№6. Буфер инкубационный 20 кратный концентрат, 20 см³, - 2 фл.

№7. Однокомпонентный субстрат (ТМБ), 25 см³, - 1 фл

№8. Стоп- реагент (1 М H₂SO₄), 11 см³, - 1 фл.

На основании проведенной работы была разработана и утверждена «Временная инструкция по изготовлению тест системы для определения уровня антител к вирусу РПЛ в иммуноферментном анализе. Отзывы о диагностикуме положительные. Поступили просьбы о необходимости промышленного производства наборов и обеспечение ими потребностей ветеринарных служб.

"Тест система для определения уровня антител к вирусу РПЛ в иммуноферментном анализе " предназначена для эпизоотологического обследования поголовья в племенных и пользовательных хозяйствах при организации оздоровительных в отношении РПЛ мероприятий в ветеринарных лабораториях республиканского и областного масштаба, на пунктах пограничного ветеринарного контроля для проведения проверки импортируемых животных. Внедрение в практику ветеринарии иммуноферментного диагностикума на РПЛ позволит решить проблему массового эпизоотологического обследования поголовья лошадей, составляющего основу мероприятий по ликвидации и предупреждению распространения данного заболевания. Диагностикум может быть предложен для экспорта в страны со стационарным неблагополучием скота по РПЛ.

Внедрение в практику набора по определению уровня антител к вирусу РПЛ в иммуноферментном анализе позволит повысить эффективность диагностики, что будет способствовать в комплексе мер оздоровлению хозяйств от

инфекционной ринопневмонии лошадей, обеспечению эпизоотологического благополучия, улучшению качества продукции.

Экономический эффект от применения наборов для диагностики ринопневмонии лошадей скота составит 830 тыс. рублей на тысячу исследований (в ценах 2005г).

Выводы.

1. Разработан метод концентрирования и очистки вируса РПЛ, штамм «СВ/69», репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, позволяющий получать препараты с титром инфекционности вируса выше, чем в исходной суспензии на $2.0 - 2.5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$ и очищенных от балластных белков на 97-98%.
2. При изучении состава поверхностных антигенов вируса РПЛ, штамм «СВ/69», полученных при обработке вирусосодержащей суспензии Тритон-ом Х-100, в иммуноблоттинге выявлено 10 структурных гликопротеинов с ММ от 24 до 260 кД, индуцирующих выработку анти-РПЛ антител в организме зараженных вирусом ринопневмонии лошадей.
3. Показана возможность одноэтапной препаративной очистки антигенов вируса РПЛ из вирусосодержащих суспензий с помощью аффинной хроматографии на анти-РПЛ IgG Сефарозе 4В.
4. На основе очищенных и концентрированных антигенов вируса РПЛ разработаны компоненты набора для определения уровня анти-РПЛ антител в сыворотках лошадей в иммуноферментном анализе.
5. При сравнительной оценке различных методов определения уровня анти-РПЛ антител установлено, что в ИФА и РТГА, коэффициент корреляции равен $r=0,86$, в ИФА и РН – $r=0,94$. Преимуществом метода ИФА при определении антител к вирусу РПЛ в сыворотках крови лошадей является возможность инструментального учета результатов.
6. Разработана тест-система для определения уровня антител к вирусу РПЛ методом иммуноферментного анализа на основе аффинно-очищенного антигена вируса РПЛ, штамм «СВ/69».

7. Практические предложения.

На основе проведенной работы представлена нормативная документация:

«Временная инструкция по изготовлению и контролю компонентов набора для определения уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей на основе аффинно очищенных антигенов вируса РПЛ, штамм «СВ/69», утверждена директором ВНИТИБП 10 сентября 2005 г.

Проект технических условий на «Набор для определения уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей в иммуноферментном анализе».

Проект «Инструкции по применению набора для определения уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей в иммуноферментном анализе», утвержденная директором ВНИТИБП 10 сентября 2005 г.

«Методические рекомендации по определению уровня антител к вирусу ринопневмонии лошадей в иммуноферментном анализе», рекомендованы на заседании секции «Ветеринарная медицина» 14 февраля 2006 г. для утверждения РАСХН в установленном порядке.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коржов В.В., Самуйленко А.Я., Кочиш И.И., Кузнецов Д.П. // Изучения репродукции вируса РПЛ в первично трипсинизированной культуре клеток почки телят, перевиваемой культуре клеток ПТ-80, СПЭВ, CrFK // Материалы 3-й международной научно-практической конференции «Современные технологические и селекционные аспекты развития животноводства России», Дубровица 2005. Научные труды ВИЖ. Выпуск 63. Том 2, с. 257-260
2. Коржов В.В., Кузнецов Д.П., Кочиш И.И. // Разработка тест-системы для детекции антител к вирусу инфекционной ринопневмонии лошадей методом ИФА // Материалы международного симпозиума 28-30 ноября «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» Казань, 2005. Том 2, с. 193-197.
3. Коржов В.В., Кузнецов Д.П., Кочиш И.И. // Концентрирование и очистка вируса ринопневмонии лошадей. // Материалы международного симпозиума 28-30 ноября «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» Казань, 2005. Том 2, с. 198-202.

2006 A

3732

■ - 3732

Отпечатано ООО Мещера
Зак.559 тир 100