



УДК 619:616.98:578.833.31:616-076

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЧМЖЖ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ОДНОГО РАЗВЕДЕНИЯ

А.В. Сухоруков, С.М. Мамадалиев, Ж.К. Кошематов

ТОО «Бицентр», г. Степногорск, bicenter@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,

п.г.т. Гвардейский

В статье приводятся результаты по разработке непрямого варианта ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови животных при анализе проб в одном разведении. Установлена оптимальная сенсibilизирующая доза антигена вируса ЧМЖЖ, определено оптимальное разведение сывороток, подобрано оптимальное разведение антивидового конъюгата. Для снятия неспецифичности в процессе постановки ИФА подобран блокирующий реагент. Для определения титра антител по показателю оптической плотности определены параметры уравнения линейной регрессии и построен калибровочный график. Определены пороговые значения отрицательных и положительных проб. Разработанная тест-система испытана при анализе проб сывороток крови от больных и переболевших животных.

Введение

Чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) – высококонтагиозное вирусное инфекционное заболевание мелкого рогатого скота и некоторых видов диких животных [1]. Возбудитель принадлежит роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae* [2]. Болезнь регистрируется во многих странах и наносит большой экономический ущерб. В последние годы ЧМЖЖ распространилась во многих государствах южной Азии, в частности она ежегодно регистрируется в Таджикистане и Китае, ближайших к Казахстану государствах [3, 4, 5].

Это ставит задачу разработки чувствительных и надежных методов диагностики данной инфекции. Для диагностики ЧМЖЖ применяется реакция преципитации в агаровом геле, реакция связывания комплемента, иммуноэлектроосмофорез, ИФА и др. [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. ИФА является наиболее чувствительным, специфичным и быстрым. Метод позволяет поставить надежный диагноз в короткое время и исследовать большое количество проб. Первые данные о применении ИФА для диагностики ЧМЖЖ относятся к 1989 г.

[17, 18] и с тех пор с успехом применяется для диагностики этого заболевания.

Основные варианты ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ - в настоящее время используют конкурентный и блокирующий [13, 14, 15]. Эти методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью, но требуют использования моноклональных антител. Тем не менее хорошие результаты показал непрямой метод, обычно используемый в тест-системах для выявления антител против различных инфекций [19].

Благодаря инструментальным методам измерения оптической плотности, появилась возможность количественного определения антигенов и антител в испытуемой пробе в широком диапазоне концентраций, используя одно-единственное разведение пробы. При этом интенсивность регистрируемых сигналов непосредственно коррелирует с уровнем определяемого агента [20, 21, 22]. Данный метод используется в большинстве коммерческих тест-систем, поскольку позволяет снизить стоимость анализа за счет исследования пробы в одной лунке планшета и в последнее время все больше внимания в области ИФА уделяется разработкам



диагностических наборов для анализа методом одного разведения [23, 24, 25].

В связи с этим задачей наших исследований являлось разработать иммуноферментную тест-систему для выявления антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови мелкого рогатого скота.

Материалы и методы

Антигены. Для сорбции микропланшет использовали культуральный антиген вируса ЧМЖЖ, приготовленный из вакцинного штамма и очищенный высокоскоростным центрифугированием на 30%-й сахарозной подушке.

Сыворотки. В опытах использовали гипериммунные сыворотки, сыворотки от вакцинированных животных, пробы сывороток, взятых от животных с подозрением на ЧМЖЖ, а также отрицательные сыворотки, не содержащие антитела против вируса ЧМЖЖ, полученные от коз и овец.

Конъюгат. Конъюгат для постановки ИФА готовили периодатным методом Wilson M.V. и Nakane P.K. Антивидовые антитела для конъюгата получали на кроликах путем иммунизации иммуноглобулинами овцы с последующим выделением аффинной очисткой с использованием иммуносорбента, полученного по методу Avrameas S. и Guilbert B. [26].

Постановка ИФА. Оптимизацию условий постановки непрямого метода ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ проводили согласно выбранного нами режима постановки, оптимального для ветеринарной лаборатории при исследовании большого количества проб. На всех этапах постановки объем реагентов в лунках планшета, за исключением стоп-реагента, составляет 0,1 см³. Микропланшеты для ИФА сенсibilизировали антигеном вируса ЧМЖЖ, разведенным в 0,02М карбонатном буфере (КББ) рН 9,6, в течение 16-18 ч при 4°C. Далее плашки трижды промывали 0,01М фосфатным буферным раствором, содержащим 0,05% твин-20 (ФБС-Т) и вносили блокирующий

раствор – ФБС-Т с 1% бычьего сывороточного альбумина. Инкубировали 60 мин при 37°C. После блокирования вносили разведения контрольных и исследуемых сывороток и инкубировали 60 мин при 37°C. После промывали трижды ФБС-Т, вносили рабочие разведения антивидового конъюгата и выдерживали 30 мин при 37°C. После контакта с конъюгатом микропланшеты промывали пять раз ФБС-Т и вносили раствор субстрата. В качестве субстрата использовали однокомпонентный тетраметилбензидин производства Clinical science product inc. По истечении 30 мин вносили по 0,05 см³ стоп-реагента. Оптическую плотность (ОП) измеряли в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Обработка результатов. Расчет средних арифметических, стандартного отклонения осуществляли с помощью программы Microsoft Excel, расчет параметров уравнения линейной регрессии и построение калибровочного графика осуществляли в программе Statistica 6.0.

При тестировании сывороток в одном разведении для некоторых расчетов применяют S/P-отношение, которое рассчитывается по формуле:

$$S/P = (ОП-NC)/(PC-NC), \text{ где}$$

ОП – оптическая плотность исследуемой сыворотки;

NC – оптическая плотность отрицательного контроля;

PC – оптическая плотность положительного контроля.

Результаты и обсуждение

Разработка непрямого метода ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ методом одного разведения включала в себя определение оптимального разведения исследуемых и контрольных образцов сывороток, оптимального разведения антивидового конъюгата, параметров уравнения линейной регрессии и построение калибровочного графика для определения титра антител, а также опреде-



ление позитивно-негативного порога положительных и отрицательных сывороток.

Определение оптимального разведения антигена вируса ЧМЖЖ для сенсibilизации микропланшет

Определение оптимального разведения антигена вируса ЧМЖЖ для сенсibilизации микропланшет проводили перекрестным титрованием с антивидовым конъюгатом. Сыворотки при этом брали в разведении 1/20. Планшеты сенсibilизировали в течение 16-18 ч при 4°C. Оптимальное разведение антигена и антивидового конъюгата определяли по максимальной разнице ОП между положительной и отрицательной сывороткой и по величине их сигнала.

Полученные результаты показали, что наиболее оптимальным разведением антигена вируса ЧМЖЖ для сорбции планшет является 1/200, дающее наибольшее различие между положительной и отрицательной сыворотками при сохранении достаточно высокого уровня ОП положительной и относительно низкого уровня ОП отрицательной сыворотки. Титр антивидового конъюгата при этом составил 1/1600.

Выбор величины разведения исследуемых и контрольных сывороток при тестировании проб в одном разведении

В опыте использовали специфические сыворотки с разным титром антител против вируса ЧМЖЖ и нормальные сыворотки, полученные от здоровых животных. ИФА проводили согласно вышеуказанному режиму. Образцы исследовали в трех разведениях: 1/10, 1/20 и 1/50. Оптимальное разведение определяли по максимальной разнице ОП между позитивными и негативными пробами. При этом были получены следующие результаты:

Разведение 1/10 – 1,235

Разведение 1/20 – 0,767

Разведение 1/50 – 0,601

Таким образом, исходя из полученных результатов, наиболее оптимальным разведением является 1/10. При анализе большого количества сывороток в ветеринарных

лабораториях большое значение имеет быстрота постановки. Полученное нами разведение дает то преимущество, что в процессе постановки анализа разведение можно готовить непосредственно в лунке планшета, предварительно внося раствор для разведения проб, а затем добавив определенное количество сыворотки для приготовления разведения. Это исключает использование дополнительной посуды для приготовления предварительных разведений и комплектации тест-систем дополнительными планшетами.

Подбор блокирующего реагента для снятия неспецифичности в процессе постановки непрямого варианта ИФА для выявления антител

Подбор блокирующего реагента проводили с использованием следующих компонентов: 1% раствор БСА, 5% раствор обезжиренного молока, 1% раствор желатина, 1% раствор гидролизата казеина. В качестве контроля использовали промысловый раствор, не содержащий дополнительных компонентов. Наиболее эффективный блокирующий реагент определяли по средним значениям ОП положительных и отрицательных сывороток и по максимальному различию между ними.

Полученные результаты проведенных исследований показали, что наиболее оптимальными блокирующими компонентами для блокирования твердой фазы являются желатин и гидролизат казеина, и для снятия неспецифичности в процессе инкубации с исследуемыми пробами (в качестве раствора для разведения испытуемых и контрольных проб) – гидролизат казеина. Использование гидролизата казеина позволяет получить самый низкий показатель ОП отрицательных проб – не более 0,11, и при этом сохраняет достаточно высокий показатель ОП положительных проб – 0,8-1,0.

Определение параметров уравнения линейной регрессии и построение калибровочного графика для определения титра антител по показателю ОП



Важным вопросом при анализе сывороток методом одного разведения является определение титра антител в исследуемом образце, поскольку по титру антител судят о том, от какого животного получена сыворотка – от больного, вакцинированного или гипериммунного. При разработке каждой современной иммуноферментной тест-системы определяют параметры уравнения и строят калибровочный график, по которому можно определить титр сыворотки по показателю ОП.

Для определения параметров уравнения и построения калибровочного графика исследовали в ИФА пробы сывороток против вируса ЧМЖЖ с различным содержанием антител. Для каждой пробы определяли показатель S/P в разведении 1/10 и титр сыворотки. При помощи программы Statistica 6.0 рассчитали параметры уравнения линейной регрессии и построили калибровочный график (рисунок 1).

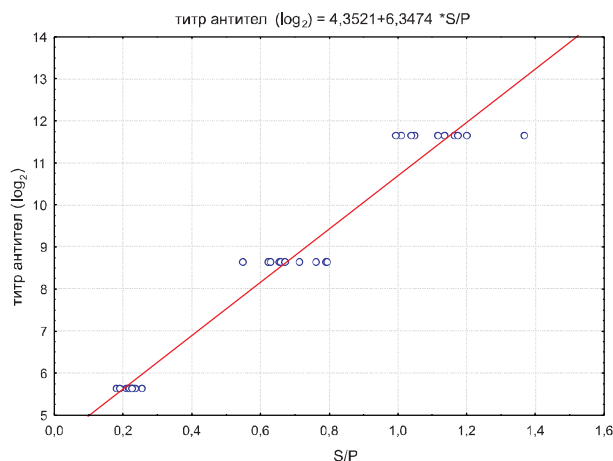


Рис. 1. Уравнение линейной регрессии (вверху) и калибровочный график зависимости показателя S/P от титра антител против вируса ЧМЖЖ.

Определение позитивно-негативного порога (ПНП) для разграничения неспецифической и специфической реакции.

Одним из важных аспектов при разработке непрямого варианта ИФА и интерпретации его результатов является

обоснование пороговых значений ОП, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специфическую (положительную) реакции. Для установления этих параметров в непрямом варианте ИФА определяли значение оптической плотности 24 образцов сывороток крови коз и овец, не имеющих антител к вирусу ЧМЖЖ.

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, определяет границу положительных и отрицательных значений ОП (cut off) или граничное значение (ГЗ). В наших опытах среднее значение ОП отрицательных сывороток составило 0,104, стандартное отклонение – 0,007. ГЗ соответственно составило 0,124. Зона сомнительных значений ОП («серая зона») определяется как $\pm 10\%$ от ГЗ и в нашем случае составила от 0,112 до 0,136.

Определение эффективности разработанного метода ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ.

Для оценки эффективности разработанного нами метода необходимо было провести исследования по определению чувствительности и специфичности тест-системы.

Для определения чувствительности проводили сравнительную оценку разработанного метода с реакцией иммунодиффузии в агаровом геле (РДП) и реакцией связывания комплемента (РСК). Сыворотки исследовали в раститровке и сравнивали их предельные титры в разных методах. При исследовании в ИФА методом одного разведения титр определяли по уравнению линейной регрессии, рассчитанному нами ранее. Полученные результаты представлены в таблице 1.



Таблица 1

Определение чувствительности непрямого метода ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ по сравнению с другими серологическими методами

Исследуемая сыворотка	ΔОП в ИФА	Титр в ИФА	Титр в РДП	Титр в РСК	Титр ИФА/ титр РДП	Титр ИФА/ титр РСК
SS ₁	1,15	1/2760	1/16	1/32	172,5	86,25
SS ₂	0,804	1/545	1/4	1/8	136,25	68,125
SS ₃	1,035	1/1610	1/8	1/16	201,25	100,625
SS ₄	0,306	1/53	-	-	-	-
SN ₁	0,107	-	-	-	-	-
SN ₂	0,112	-	-	-	-	-
SN ₃	0,104	-	-	-	-	-

Примечание: ΔОП – средняя оптическая плотность;
SS – сыворотка специфическая;
SN – сыворотка нормальная.

Из результатов, представленных в таблице 1, следует, что разработанный нами метод ИФА превосходит по чувствительности РДП в 136-200 раз и РСК – в 68-100 раз.

Специфичность метода оценивали по реакции с отрицательными сыворотками и сыворотками к другим инфекциям мелкого рогатого скота: контагиозная эктима овец (КЭО), оспа овец (ОО). Активность сывороток оценивали по ОП. Результаты проведенных исследований показали, что ОП гетерологичных сывороток (КЭО, ОО) сравнима с ОП отрицательных сывороток, следовательно, тест-систему можно считать специфичной.

Оценка эффективности разработанного метода ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ при исследовании сывороток животных, полученных из очага инфекции

Из очага инфекции было получено 13 образцов сывороток, взятых от животных с подозрением на ЧМЖЖ. Все сыворотки были исследованы с помощью разработанного нами метода. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что из исследованных 13 проб сывороток положительный результат показали 7 сывороток, отрицательный результат – 2 сыворотки и сомнительный результат показали 4 пробы.

Таблица 2

Результаты экспертизы проб сывороток на обнаружение специфических антител в сыворотках крови больных животных

Испытуемые пробы	Результаты исследований в серологических реакциях			
	РСК	РН	ОП в ИФА	Интерпретация
1	-	+	0,233	+
2	-	-	0,121	±
3	-	+	0,354	+
4	-	-	0,116	±
5	-	+	0,472	+
6	-	-	0,109	-
7	-	-	0,118	±
8	-	+	0,361	+
9	-	+	0,289	+
10	-	-	0,120	±
11	-	+	0,255	+
12	-	+	0,176	+
13	-	-	0,105	-
SS _{ЧМЖЖ} контрольная	1:16	+	1,141	+
SN	-	-	0,097	-

Примечание: «-» - отрицательный результат;
«+» - положительный результат;
«±» - сомнительный результат;
SS – сыворотка специфическая;
SN – сыворотка нормальная.

Таким образом, нами отработан не прямой метод ИФА для выявления антител против вируса ЧМЖЖ при исследовании сывороток в одном разведении. Метод показал высокую чувствительность и специфичность и хорошие результаты при анализе сывороток от больных животных из очага инфекции и может быть использован при проведении серологических исследований поголовья мелкого рогатого скота на ЧМЖЖ.



Литература

1. Furley C.W., Taylor W.P., Obi T.U. An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. // *Vet. Rec.*, 1987, - Nov. - 7;121(19):443-7.
2. Gibbs E.P.J., Taylor W.P. et al. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. // *Intervirology*. - 1979. - v. 11. - N5. - p. 268-274.
3. Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М., Кошембетов Ж.К., Нурабаев С.Ш. Чума мелких жвачных животных в Республике Таджикистан // Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и сельскохозяйственной биотехнологии». 19-20 мая 2005 г. – Павлодар, 2005. - С. 66-71.
4. Wang Z., et al. Peste des petits ruminants virus in Tibet, China. // *Emerg. Infect. Dis.* 2009, Feb; 15(2): 299-301.
5. Bao J.Y., et al. Sequence analysis of the nucleocapsid gene and genome promoter region of peste des petits ruminants virus of Chinese origin. // *Bing Du Xue Bao*. 2008 Nov;24(6):464-71.
6. Taylor W.P. & Abegunde A. The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats // *Res. Vet. Sci.*, 1979, 26, 94-96.
7. Durojaiye O.A. Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants // *Trop. Anim. Health Prod.*, 1982, 14, 98-100.
8. Peste des petits ruminants. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2004). Terrestrial Manual 5th Edition, Chapter 2.1.5.
9. Taylor W.P. Serological studies with the virus of peste des petits ruminants in Nigeria // *Res. Vet. Sci.*, 1979, 26, 236-242.
10. Majiyagbe K.A., Nawathe D.R. & Abegunde A. Rapid diagnosis of PPR infection, application of immuno-electro-osmophoresis (IEOP) technique // *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.*, 1984, 37(1), 11-15.
11. Durojaiye O.A. Detection of the antigen of peste des petits ruminants virus in tissues by indirect immunofluorescence technique // *Nig. Vet. J.*, 1984, 13, 77-80.
12. Durojaiye O.A., Obi T.U. & Ojo O. Virological and serological diagnosis of peste des petits ruminants // *Trop. Vet.*, 1983, 1, 13-17.
13. Libeau G. et al. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein // *Res. Vet. Sci.*, 1995, 58, 50-55.
14. Choi K.S., Nah J.J., Ko Y.J., Kang S.Y., Jo N.I. Rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to peste des petits ruminants virus. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, Apr.;12(4):542-7.
15. Saliki J.T. et al. Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste des petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera // *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31(5), 1075-1082.
16. Степанов А.В. и др. Молекулярно-генетический метод диагностики чумы мелких жвачных // Материалы межд. науч.-практ. конф. 15-16 авг. 2000 г. – Покров, 2000.
17. Olaleye O.D., Oyejide A., Ikede B.O. Correlation of humoral immune response with clinical presentation, pulmonary lesions and mortality patterns of goats experimentally infected with peste des petits ruminants virus. // *Cytobios.* 1989; 57(230-231):141-7.
18. Obi T.U., Ojeh C.K. Dot enzyme immunoassay for visual detection of peste-des-petits-ruminants virus antigen from infected caprine tissues. // *J. Clin. Microbiol.* 1989, Sep; 27(9):2096-9.
19. Balamurugan V., Singh R.P., Saravanan P., Sen A., Sarkar J., Sahay B., Rasool T.J., Singh R.K. Development of an indirect ELISA for the detection of antibodies against Peste-des-petits-ruminants virus in small ruminants. // *Vet. Res. Commun.* 2007, Apr; 31(3): 355-64.
20. Crowther, J.R. (1986) Use of enzyme immunoassays in disease diagnosis, with particular reference to rinderpest, In Nuclear and Related Techniques for Improving Productivity of Indigenous Animals in Harsh Environments. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, pp. 197–210.
21. Hamblin, C. and Crowther, J.R. (1982) A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the serological confirmation of SVD, in The ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Veterinary



- Research and Diagnosis (Wardley, R.C. and Crowther, J.R., eds.), Martinus Nijhoff, The Netherlands, pp. 232–241.
22. The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa. Phase two. Results for 1993. Proceedings of a Research Coordination Meeting of the FAO/IAEA/SIDA/OAU/IBAR/ PARC Coordinated Research Programme organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Cairo, Egypt, 7–11, November 1993.
 23. Волкова М.А. и др. Непрямой вариант ИФА для количественного определения антител к аденовирусу птиц Iсеротипа // Труды федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2005. - С. 251-260.
 24. Щербачев А.В. и др. Разработка и применение иммуноферментной тест-системы для определения антител к неструктурным белкам вируса ящура // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2006. – Т.4. – С. 26-39.
 25. Тимина А.М. и др. Разработка и применение непрямого варианта ИФА для обнаружения антител к цирковирусу свиней типа 2 // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2006. – Т.4. – С. 102-115.
 26. Avrameas S, Guilbert B. Biologically active water-insoluble protein polymers. Their use for the isolation of specifically interacting proteins // *Biochimie*. 1971;53(5):603–614.

Түйін

Мақалада МКҚЖ вирусына қарсы антиденелерді анықтау үшін ИФСөның тікелей емес вариантын жасау, бірінші реттік араластырма үлгісін сараптаудағы нәтижелері келтірілген. МКҚЖ вирусы антигенінің сенсбилиздеуші оптимум мөлшері бекітілді, сарысудың оптимум араластырмасы анықталынды, антитүрлік конъюгаттың оптимум араластырмасы таңдалып алынды. ИФС жүргізу үрдісінде арнайылықты тұмшалаушы реагент таңдалып алынды. Оптикалық тығыздығы бойынша антидененің титрін анықтау мақсатында сызықтық регрессия теңдеуінің параметрлері анықталып, калибрлік график құрастырылды. Оң және теріс үлгілердің шектік мәні анықталды. Жасалып шығарылған тест- жүйе ауру және ауырған жануарлардан алынған қан сарысуын сараптау барысында сыналды.

Summary

The article presents the results on the development of the indirect ELISA to detect antibodies against the PPR virus in the blood serum of animals while analyzing samples in one dilution. The optimal dose of sensitizing antigen of the virus has been established, the optimal dilution of sera has been determined, optimal breeding anti-specific conjugate has been selected. To remove non-specificity in the process of performing ELISA, a blocking reagent has been picked up. To determine the titer of antibody in terms of optical density, the parameters of linear regression equation have determined and a calibration graph has been constructed. The threshold meanings of negative and positive samples have been defined. A developed test system has been tested while analyzing the samples of blood serum of the sick and recovered animals.