



УДК 619:578:658.512(616-07)

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО НЕСТРУКТУРНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

К. Турсунов¹, К.Н. Мукантаев¹, К.К. Муканов¹, Е.М. Раманкулов¹, Д.Д. Харламбиева², С.А. Левицкий², В.Н. Лазарев², Г. Калыкова³

lii@biocenter.kz

¹РГП «Национальный центр биотехнологии РК», г. Астана

²ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, г. Москва

³ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии» МСХ РК, г. Астана

В результате проведенных исследований было определено, что полученный рекомбинантный 3А неструктурный антиген вируса ящура специфически реагирует с сыворотками от больных животных. На основе использования рекомбинантного 3А неструктурного антигена вируса ящура отработаны основные параметры непрямого варианта иммуноферментного анализа для дифференциальной диагностики сельскохозяйственных животных.

Введение

Важнейшим аспектом предотвращения распространения ящура среди животных является дифференциальная диагностика вакцинированных животных от скрытых вирусоносителей. У вакцинированных жвачных животных бессимптомная постоянная инфекция не диагностируется при использовании традиционных вирусологических и серологических методов, так как скрытые вирусоносители и вакцинированные животные имеют идентичные вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови. Поэтому неблагополучные по ящуру государства проводят углубленные исследования по установлению воздействия вируса на животных, обладающих иммунитетом к болезни после вакцинации, и разработке методов дифференцирования их от выздоравливающих животных. До дифференциации все вакцинированные животные представляют собой потенциальный риск распространения болезни.

Несколько диагностических тестов были разработаны для дифференциальной диагностики зараженных животных от вакцинированных. Все тесты основаны

на обнаружении антител к неструктурным белкам вируса ящура [1, 2, 3]. Тесты, основанные на использовании неструктурных белков, имеют дополнительное преимущество: антитела к структурным белкам, не специфичны по серотипам; неструктурные белки вируса преимущественно сохраняют различие между серотипами вируса ящура. Большинство из описанных в литературе тест-систем используют неструктурные белки вируса ящура 3А, 3В, 3С. При этом, согласно описанным данным, наиболее эффективно использование белка 3А, поскольку он является наиболее консервативным среди неструктурных белков вируса [4].

В связи с вышесказанным, целью работы являлась разработка на основе рекомбинантного неструктурного белка вируса ящура иммуноферментной тест-системы для выявления больных животных.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- тестирование полученного рекомбинантного 3А неструктурного антигена вируса ящура в иммуноферментном анализе с использованием сывороток от больных животных;



- отработка условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа на основе использования рекомбинантного неструктурного белка вируса ящура с применением контрольных сывороток от больных животных.

Материалы и методы

При разработке иммуноферментного анализа для дифференциальной диагностики ящура использовался очищенный рекомбинантный неструктурный антиген вируса ящура. При отработке концентрации и условий иммобилизации твердой фазы, условий блокировки свободной поверхности планшета и отработке рабочего разведения исследуемых сывороток использовался непрямой вариант иммуноферментного анализа. В качестве блокирующего раствора использовался яичный белок. Исследуемые сыворотки любезно предоставлены ГУ «Национальный центр мониторинга, референции, лабораторной диагностики и методологии в ветеринарии» МСХ РК.

Непрямой вариант иммуноферментного анализа ставился по следующей схеме:

1. Планшет иммобилизовали разведением антигена начиная с ряда А - 125 мкг/мл и заканчивая рядом Н - 0,7 мкг/мл. Антиген разводили в бикарбонатном буфере pH-9,5 и инкубировали при +4°C в течение 12 часов. После инкубирования отмывали 4 раза фосфатно-солевым буфером pH-7,2.

2. Во все лунки планшеты вносили по 0,1 мл 0,5% раствора яичного белка и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Повторяли процедуру отмывки.

3. Предварительно готовили разведения контрольных сывороток (K^+ , K^-). Для этого в две чистые пробирки вносили по 1 мл фосфатно-солевого буфера pH-7,2, затем в первую пробирку вносили 0,05 мл контрольной (K^+) сыворотки, во вторую пробирку вносили 0,05 мл контрольной (K^-) сыворотки, при этом получали разведение 1:20. Аналогично готовили разведения испытуемых сывороток.

4. Во все лунки иммунологического

планшета вносили по 0,1 мл сыворотки с расчетом одна сыворотка на один ряд. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C. Повторяли процедуру отмывки.

5. Во все лунки планшета, кроме лунок E11- H11 и E12- H12, заполняемые по 0,1 мл фосфатно-солевым буфером pH-7,2, вносили по 0,1 мл рабочее разведение антивидового конъюгата. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После инкубирования повторяли процедуру отмывки.

6. Во все лунки планшета вносили по 0,1 мл субстратной смеси. Субстратная смесь состоит из 8 мг ортофенилендиамина, 10 мл лимонной кислоты pH-4,5 и 50 мкл 3% перекиси водорода. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в темном месте при комнатной температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) в течение 15 мин.

7. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета по 0,1 мл 2М серной кислоты и проводили учет результатов ИФА.

8. Результаты реакции учитывали на спектрофотометре при длине волны 492 нм или визуально. Учет реакции вели, если в лунках с положительным контролем наблюдалось интенсивное окрашивание темно-коричневого цвета в 2 и более раза превышающее оптическую плотность в лунках с отрицательным контролем. Содержимое лунок отрицательных контролей должно быть бесцветным или иметь светло-желтую окраску.

При визуальном учете реакцию оценивали по следующей схеме:

++++ - интенсивное ярко-оранжевое окрашивание;

+++ - оранжевое окрашивание;

++ - светло-желтое окрашивание;

+ - слабое желтоватое окрашивание;

- (минус) – окрашивание отсутствует.

9. При спектрофотометрическом учете результаты анализа сывороток на ящур считали положительными, если значение ОП исследуемого образца превышало в 2 и более раза значение ОП контрольной,



негативной сыворотки. При визуальном учете реакцию считали положительной при наличии в лунках исследуемого образца продукта реакции с окраской оранжевого цвета с оценкой не ниже, чем на три креста, отрицательной - при наличии светло-желтого или отсутствия окрашивания в лунках с исследуемой и негативной, контрольной сыворотками.

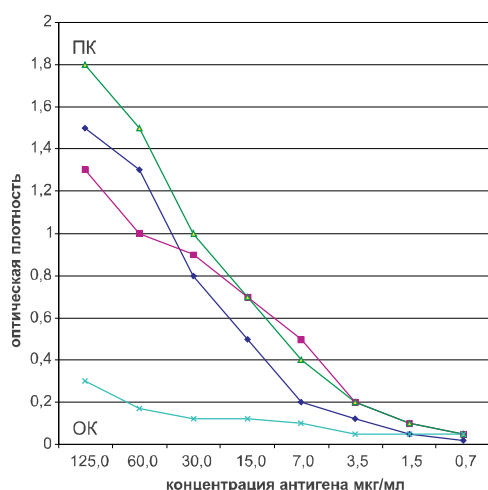
Результаты и обсуждение

Для проведения тестирования полученного рекомбинантного неструктурного белка вируса ящура на положительных контрольных сыворотках и сыворотках от больных ящуром животных использовался непрямой вариант иммуноферментного анализа. С этой целью иммунологические планшеты иммобилизовали разведением рекомбинантного белка, начиная с концентрации 125 мкг/мл до 700 нг/мл. На раститрованный антиген вносили контрольные положительные сыворотки и сыворотки от больных ящуром животных в разведении 1:20. Если полученный рекомбинантный неструктурный белок вируса ящура отвечает требованиям природного аналога – образуется комплекс «рекомбинантный антиген – положительные антитела», который выявлялся антивидовым конъюгатом. Обязательным условием постановки реакции является использование стандартизированных положительных и отрицательных контрольных сывороток.

Исследования рекомбинантного неструктурного антигена вируса ящура методом непрямого варианта иммуноферментного анализа с использованием сывороток, полученных от животных больных ящуром, показали, что все использованные антитела в разведении 1:20 реагировали с белками данной фракции в концентрации 3,5 мкг/мл (рис. 1). Из полученных результатов следует, что полученный рекомбинантный антиген является неструктурным 3А антигеном вируса ящура и обладает высокой иммуногенностью.

Аналогичные результаты были получены Родригес с соавторами [5], которые провели сравнение иммуногенности различных белков вируса ящура свиней. Анализ специфичности антител против неструктурных белков вируса ящура, выявленных в сыворотках от зараженных или вакцинированных свиней, показал, что неструктурный белок 3АВС является наиболее иммуногенным полипептидом вируса. Полученные результаты подтверждают предположение, что данный белок может быть использован для дифференциации зараженных свиней от вакцинированных. Более того, антитела к неструктурному белку 3АВС обнаруживались по истечении двух недель после вакцинации. По данным других исследователей, зараженные животные могут быть дифференцированы от вакцинированных по присутствию антител к 2С, 3А и 3АВС, которые продуцируются организмом только при его инфицировании вирусом [6]. У животных также выявлены значительные изменения в параметрах иммунного ответа к каждому из исследованных неструктурных белков, в зависимости от индивидуальных особенностей организма. Полученные авторами результаты отражают степень различия вирусной активности, которая отражается на количестве и иммуногенности различных неструктурных белков. Однако, полипротеин 3АВС был самым надежным и единственным индикатором инфекции в сыворотках животных [6, 7].

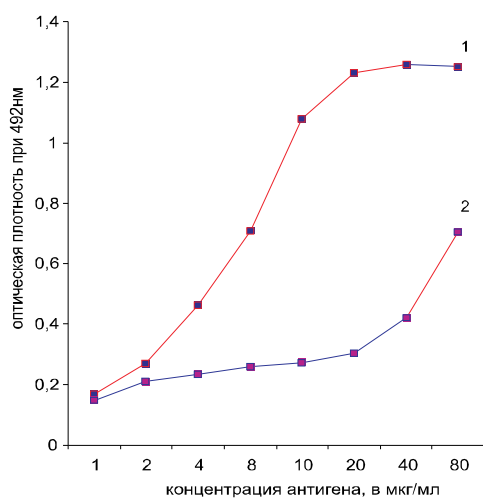
При разработке иммуноферментных тест-систем актуальным является правильный выбор параметров применения компонентов набора, от которых в большей степени зависит качество получаемых результатов. Все варианты иммуноферментного анализа являются многокомпонентными системами, и несоответствие параметра одного может приводить к неадекватным результатам. Следовательно, правильный выбор концентрации этих компонентов в конечном результате играет важную роль.



1-2 – сыворотка больных ящуром животных; ПК – контрольная положительная сыворотка; ОК – контрольная отрицательная сыворотка

Рис. 1. Уровень реакции хроматографической фракции, полученной при очистке рекомбинантного неструктурного белка вируса ящура с гомологичными сыворотками в иммуноферментном анализе

При проведении экспериментов по определению оптимальной концентрации антигена для иммобилизации его на поверхности твердой фазы использовались концентрации вирусных антигенов в диапазоне от 1 до 80 мкг/мл белка. Сорбцию антигенов на твердой поверхности проводили в стандартных условиях в течение 18 часов и температуре +4°C (рис. 2).

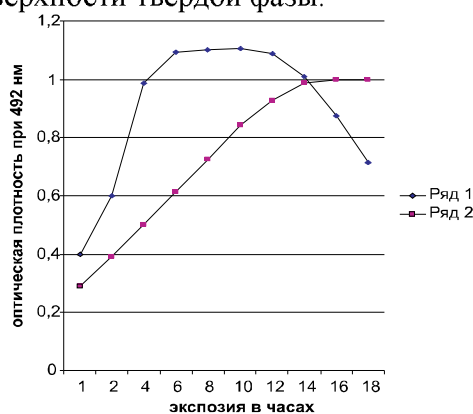


1 - позитивная сыворотка; 2 - негативная сыворотка.

Рис. 2. Зависимость степени адсорбции от концентрации рекомбинантного неструктурного антигена

Из рисунка 2 видно, что низкие концентрации антигена от 1 до 2 мкг/мл в реакции со стандартными положительными и отрицательными сыворотками в ИФА показали оптическую плотность реакции от 0,2 до 0,4. Причем эти показатели были как у положительных, так и у отрицательных сывороток. По мере увеличения концентрации антигена увеличивалось различие показателей оптической плотности положительной сыворотки от отрицательной. Оптимальной концентрацией антигена, вносимого в лунки планшета, является 10 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации антигена приводило к повышению оптической плотности в лунках с отрицательной сывороткой. Обобщая полученный результат, можно сказать, что 10 мкг/мл вирусных белков является оптимальной концентрацией для иммобилизации планшета. Дальнейшее увеличение концентрации антигена приведет к повышению фона реакции.

Следующим шагом отработки параметров иммобилизации твердой фазы рекомбинантным антигеном является определение степени адсорбции антигена в зависимости от времени и температуры. На рисунке 3 показано влияние временного фактора и температурного режима на прочность фиксации вирусного антигена к поверхности твердой фазы.



1 - экспозиция антигенов при $t + 37^\circ\text{C}$; 2 - экспозиция антигенов при $t + 4^\circ\text{C}$

Рис. 3. Зависимость степени адсорбции рекомбинантного неструктурного антигена вируса ящура от температуры и времени

Изучение кинетики фиксации антигена при температуре +4°C показало, что полное



насыщение твердой фазы происходит через 14-18 часов. При этом значения оптической плотности достигали 1,042 о.е. Дальнейшая экспозиция не приводила к существенному увеличению концентрации адсорбированного антигена, поскольку показатель оптической плотности реакционной жидкости оставался на одном уровне.

Максимальная адсорбция рекомбинантного неструктурного антигена при температуре 37°C происходила в течение 3-4 часов, при этом показатели оптической плотности реакции составляли 1,0 о.е. Увеличение времени адсорбции антигена до 18 часов приводило к повышению «фоновое» сигнала реакции только на 10-20%, что совпадало с динамикой фиксации антигена на поверхности лунок при +4°C.

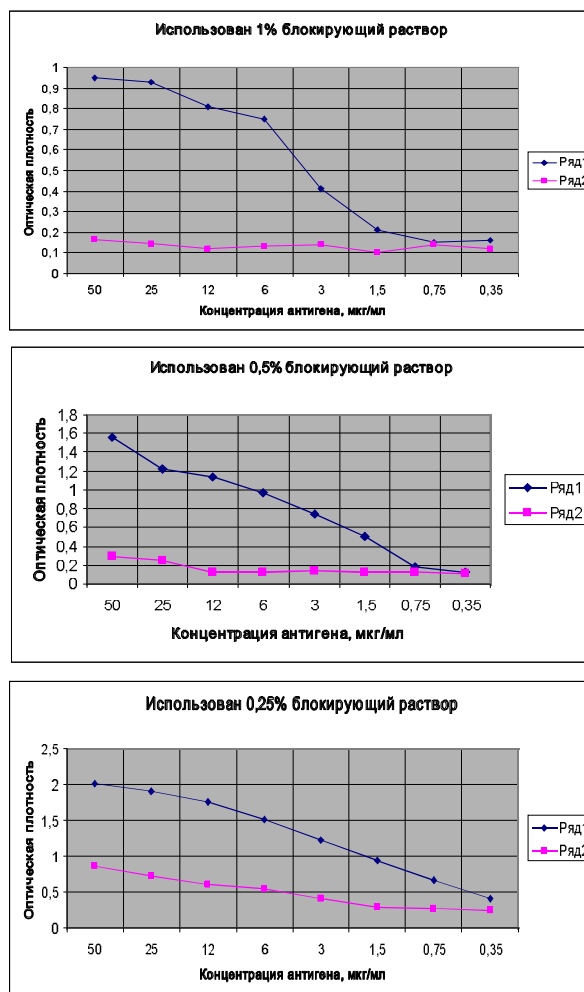
Однако адсорбция вирусного антигена при данной температуре в течение 18 часов приводила к резкому снижению антигенной активности из-за возможного разрушения белков, что вынудило нас отказаться от использования такого режима, и в дальнейшем адсорбцию антигена мы проводили в течение 16-18 часов при температуре +4°C.

Важным этапом отработки иммуноферментного анализа является подбор блокирующего раствора. Наиболее широко в качестве блокирующего раствора используются 1%-ный бычий сывороточный альбумин или 0,5%-ный желатин. В последнее время широкое распространение получили блокирующие растворы, состоящие из нескольких компонентов, например, сыворотка любого вида животного с добавлением обезжиренного сухого молока. Несмотря на это, выбор блокирующего раствора должен учитывать используемый антивидовой конъюгат. Так, при использовании конъюгата, например, против антител коров, конъюгат может реагировать с бычьим сывороточным альбумином и приводить к повышению неспецифического фона.

В данной работе в качестве блокирующего раствора использовался яичный белок. При определении оптимальной концентраций яичного белка в качестве

блокирующего раствора использовались 1, 0,5 и 0,25% растворы данного компонента. Эффективность блокировки определялась в непрямом иммуноферментном анализе. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Из рисунка 4 видно, что при использовании 0,25% раствора яичного белка в качестве блокирующего раствора максимальные оптические показатели отрицательной контрольной сыворотки достигают 0,9, а положительной сыворотки 2,0. При этом кривая оптических показателей отрицательной сыворотки имеет высокие показатели даже на концентрации антигена 0,36 мкг/мл и достигают 0,25. Оптические показатели отрицательной сыворотки на концентрации антигена 12 мкг/мл достигают 0,6.



1 - позитивная сыворотка; 2 - негативная сыворотка.

Рис. 4. Показатели иммуноферментного анализа при использовании различных концентраций блокирующего раствора



Противоположная картина наблюдалась при использовании 1% раствора яичного белка. Если оптические показатели отрицательной сыворотки на всех концентрациях антигена показали оптимальный результат, то показатели положительной сыворотки оказались заниженными. Например, показатели оптической плотности положительной сыворотки на концентрации антигена 12 мкг/мл достигли только 0,8.

Наиболее оптимальные результаты получены при использовании 0,5% раствора. Оптические показатели отрицательной сыворотки на концентрации антигена 12 мкг/мл составляли 0,1, тогда как оптические

показатели положительной сыворотки достигали 1,2.

Сравнительный анализ использования различных концентраций блокирующего раствора показал, что наиболее оптимальные результаты получены при использовании яичного белка в 0,5% разведении.

Для определения оптимального разведения исследуемых сывороток использовали разведения 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и 1:160 положительной и отрицательной контрольной сыворотки. Результаты оптических показателей иммуноферментного анализа в зависимости от различного разведения исследуемых сывороток представлены в таблице 1.

Таблица 1

Оптические показатели в зависимости от разведения исследуемых сывороток

Концентрация антигена, мкг/мл	Разведение сыворотки									
	1:160		1:80		1:40		1:20		1:10	
	ПКС	ОКС	ПКС	ОКС	ПКС	ОКС	ПКС	ОКС	ПКС	ОКС
40	0,873	0,185	1,135	0,201	1,575	0,232	1,960	0,306	2,543	0,398
20	0,714	0,120	1,089	0,138	1,146	0,141	1,231	0,250	1,816	0,304
10	0,523	0,111	0,603	0,125	0,785	0,121	1,024	0,178	1,315	0,278
5	0,389	0,087	0,472	0,096	0,589	0,101	0,804	0,101	1,011	0,287
2,5	0,221	0,065	0,275	0,102	0,346	0,098	0,530	0,172	0,681	0,252
1,25	0,112	0,071	0,106	0,078	0,121	0,100	0,179	0,155	0,452	0,225
0,6	0,108	0,056	0,118	0,080	0,134	0,104	0,154	0,155	0,219	0,263
0,3	0,101	0,039	0,109	0,071	0,122	0,099	0,159	0,151	0,214	0,204

Как видно из таблицы 1, наиболее оптимальным разведением исследуемых сывороток являются 1:20 - 1:40, позволяющих при концентрации антигена 10 мкг/мл добиваться оптимальных оптических показателей. Так, при разведении положительной и отрицательной контрольных сывороток 1:20 показатели составили 1,024 и 0,178, соответственно, при разведении 1:40 показатели составили 0,785 и 0,121. Оптические показатели, полученные при разведении сывороток 1:10, хотя и оказались высокими, были в пределах нормы.

При увеличении разведения сывороток показатели оптической плотности положительной и отрицательной контрольной сыворотки снижались и составили при 1:80 - 0,603 и 0,125, при 1:160 - 0,523 и 0,111.

Следовательно, при понижении степени разведения испытуемых сывороток до 1:10 происходит увеличение фона реакции отрицательной сыворотки. При увеличении степени разведения до 1:80 и выше снижаются показатели положительной контрольной сыворотки, что может привести к появлению ложно-отрицательной реакции.

Выводы

Рекомбинантный 3А неструктурный антиген в иммуноферментном анализе положительно реагировал с сыворотками от животных больных ящуром.

Отработаны оптимальные концентрации и условия иммобилизации планшета



рекомбинантным 3А неструктурным антигеном вируса ящура.

На основе рекомбинантного 3А неструктурного антигена отработаны основные

параметры постановки иммуноферментного анализа для серологической диагностики ящура.

Литература

1. De Diego M, Brocchi E, Mackay D, De Simone F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol.* 1997;142(10):2021-33.
2. Clavijo A, Wright P, Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet J.* 2004 Jan;167(1):9-22.
3. Kitching RP. Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. *Rev Sci Tech.* 2002 Dec;21[3]:531-8.
4. Paton DJ, de Clercq K, Greiner M, Dekker A, Brocchi E, Bergmann I, Sammin DJ, Gubbins S, Parida S. Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. *Vaccine.* 2006 Oct 30;24(42-43):6503-12. Epub 2006 Jul 5.
5. Rodriguez A., Dopazo J., Saiz J.C., Sobrino F. Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine // *Archives of Virology.* - 1994. - Vol. 136. - P. 123-131.
6. Mackay D.K.J., Forsyth M.A., Davies P.R., Berlinzani A., Belsham G.J., Flint M., Ryan M.D. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA // *Vaccine.* - 1998. - Vol. 16. - P. 446-459.
7. Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 1985 Sep 2; 188[2]:215-8.

Түйін

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде алынған ауысыл вирусының құрылымдық емес 3А рекомбинантты антигені ауру жануарлардың қан сарысуымен тәлімді байланысады. Ауысыл вирусының құрылымдық емес 3А рекомбинантты антигенін қолдану негізінде ауыл шаруашылық жануарлардың дифференциалды диагностикасы үшін иммуноферментті талдаудың жанама әдісінің негізгі шарттары оңтайландырылды.

Summary

It was determined that the isolated recombinant nonstructural 3A FMD virus antigen reacts specifically with sera of sick animals. The basic parameters of the indirect ELISA for the differential diagnosis of Farm Animals was developed based on the use of recombinant 3A non-structural antigen of FMD virus.