

метить, что инфекция, вызываемая вирусом трансмиссивного гастроэнтерита, в России имеет ограниченный характер в отличие от, например, ротавирусной инфекции свиней, которая широко распространена в хозяйствах страны. Кроме того, на присутствие ТГЭС было исследовано относительно небольшое количество образцов.

В настоящее время мы не имеем возможности проверить данную методику для выявления респираторного коронавируса свиней, однако достаточно большое количество проанализированных последовательностей генома РКВС позволяет надеяться, что разработанный метод будет успешно выявлять и этот вирус и дифферен-

РЕЗЮМЕ

Разработан метод выявления вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней на основе полимеразной цепной реакции. Метод позволяет дифференцировать вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней от респираторного коронавируса свиней по длине амплифицируемого фрагмента.

ABSTRACT

Porcine transmissible gastroenteritis virus detection assay using polymerase chain reaction was developed. The method allows to differentiate porcine transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus by the length of the amplified fragment.

Литература

1. Т.И. Алипер, В.Ф. Васильев, В.А. Сергеев. Персистенция вируса и эпизоотологическая опасность реконвалесцентов при ТГС // Ветеринария. 2001. № 5. С. 16–21.
2. А.Н. Гречухин. Эпизоотология вирусного (трансмиссивного) гастроэнтерита свиней в свиноводческих комплексах с промышленной технологией // Инфекционные бол. с.-х. ж-ных.: Сб. науч. тр. Л., 1988. С. 37.
3. Г.Е. Ирская. Локализация вируса трансмиссивного гастроэнтерита в органах поросят при экспериментальном заражении // Инфекционные и инвазионные заболевания с.-х. ж-ных и птиц: Сб. науч. тр. Персиановка, 1993. С. 7–11.
4. О.Г. Грибанов, А.В. Щербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Простой метод выделения и очистки РНК // Биоорг. химия. 1997. Т. 23, № 29. С. 763–765.
5. M. Pensaert, E. Cox, K. van Deem et al. A sero-epizootiological study of porcine respiratory coronavirus in Belgian swine // Vet Q. 1993. V. 1, № 5. P. 16–20.
6. E. Cox, M.B. Pensaert, P. Callebaut. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus // Vaccine. 1993. V. 11, № 2. P. 267–272.
7. H. Laude, K.V. Reeth, M. Pensaert. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions // Vet. Res. 1993. V. 24. P. 125–150.

УДК 619:578.825.1.31:573.6.086.83:57083.3

А.С. Оганесян

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

Введение

Болезнь Ауески — контагиозная вирусная болезнь сельскохозяйственных животных всех видов, пушных зверей и грызунов, характеризующаяся поражением центральной нервной системы и органов дыхания. Вызывается вирусом семейства Herpesviridae, рода Varicellavirus. Признаки заболевания у свиней зависят от возраста животных и патогенных свойств вируса. Летальный исход болезни в естествен-

ных условиях чаще всего наблюдают у поросят-сосунов и группы отъема. Инфицирование взрослых свиней обычно не приводит к гибели животного, но сопровождается длительным или пожизненным вирусоносительством. У свиноматок часто наблюдают рождение мертвых, мумифицированных плодов или аборт на разных сроках супоросности.

В связи с достаточно широким распространением профилактической вакцина-

ции, остается актуальной оценка уровня поствакцинальных антител к вирусу болезни Ауески (ВБА) в сыворотках крови свиней [1, 2].

В настоящее время для диагностики болезни Ауески у свиней применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА) в различных модификациях. На основе ИФА разработаны различные тест-системы, как правило, импортного производства [2].

Целью проведенной работы являлась разработка метода обнаружения антител к возбудителю ВБА в сыворотках крови свиней с помощью непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы

В работе использовали инаktivированный концентрированный, культуральный антиген вируса ВБА (штамм «Арский»).

Этапами очистки антигена являлись: концентрирование с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), ультрафильтрация на установке Vivocell 250 (Sartorius). Степень очистки контролировали электронно-микроскопическим методом, а титр антигена определяли в прямом иммуноферментном анализе с моноклональными антителами, специфичными к вирусу болезни Ауески, и в референтном тесте - реакции микронеutralизации (PMH).

В качестве положительного контроля использовали сыворотку свиней, специфичную к вирусу ВБА, с титром в ИФА 1:160–640 (в PMH не ниже 6,0 log₂). В качестве отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку крови свиней, не содержащую антител к вирусу ВБА, с титром в ИФА меньше, чем 1:20 (в PMH не выше 2,0 log₂).

Использовали препарат антисвинных антител, меченных пероксидазой хрена (ИЭ-иМ им. Н. М. Гамалеи, Москва).

Разведения антигена готовили на 0,05M карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5–9,6. В качестве блокирующего буферного раствора применяли трис-буферный раствор (ТБР) pH 7,4–7,6 с 10% сыворотки крови лошади. Для разведения исследуемых проб сыворотки крови и конъюгата использовали 3% раствор лошадиной сыворотки на промывочном буфере. Промывочный буфер готовили из трис-буферного раствора (ТБР) с добавлением 0,05% Tween-20. В качестве хромоген-субстратного раствора использовали раствор АБТС (Sigma) [3].

Непрямой вариант ИФА проводили по общепринятой схеме, все компоненты реакции вносили в объеме 50 мкл/лунку. Сы-

воротки разводили двукратным шагом с 1:20 до 1:2560. Между этапами реакции несвязавшиеся компоненты удаляли путем промывания лунок планшета 3–4 раза промывочным буфером. Индикацию проводили добавлением хромоген-субстратного раствора. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Униплан» (г. Москва) при длине волны 405 нм.

Результаты анализа выражали в виде титра сыворотки. Титром сыворотки считали ее максимальное разведение, при котором величина оптической плотности в 2 раза превосходила оптическую плотность в лунках с отрицательной контрольной сывороткой. Положительными считали пробы сывороток крови с титром 1:20 и выше.

Результаты и обсуждение

В литературе имеется ряд сообщений по применению неионного детергента NP-40 для подготовки вирусосодержащих проб. При этом повышается чувствительность и специфичность тест-системы за счет разрушения неспецифических гидрофобных связей между гликопротеинами и мембраной вириона. При разработке данного варианта ИФА инаktivированный концентрированный культуральный антиген вируса ВБА с целью повышения его активности обрабатывали различными препаратами. Для этого антиген выдерживали с препаратом в течение часа, при + 37° С. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, уровень оптической плотности выше при обработке антигена 1% NP-40 по сравнению с полученным уровнем оптической плотности при обработке его растворами других детергентов (1% SDS, 1% Тритон X-100), а также без предварительной обработки. При обработке антигена 1% SDS – наблюдали полную потерю активности антигена в ИФА.

С учетом полученных данных было решено для предварительной обработки антигена использовать 1% раствор детергента NP-40.

С помощью разработанного варианта ИФА было проведено исследование 157 проб сывороток крови свиней, полученных из 11 регионов Российской Федерации. Проводили также сравнение разработанного ИФА с коммерческим тестом СНЕК-IT-Aujeszky (Bommeli-IDEXX) и референтным тестом - реакцией микронеutralизации (данные PMH представлены к.б.н. Баборенко Е.П.). Полученные результаты частично представлены в табл. 2.

Для оценки специфичности разрабо-

Влияние различных детергентов на активность антигена в прямом варианте ИФА

Таблица 1

Разведение антигена	Активность антигена в ИФА (оптическая плотность)			
	без обработки	обработка		
		1% NP-40	1% SDS	1% Тритон X-100
1:5	0,245	0,618	0,095	0,523
1:20	0,115	0,519	0,078	0,373

Результаты сравнительного исследования сывороток крови свиней в ИФА и РМН

Таблица 2

Сыворотка крови от:	Сhek-it-ИФА	Н-ИФА		РМН	
	%- рез-т	титр	рез-т	титр (log ₂)	рез-т
Не вакцинированные, клинически здоровые поросята и свиноматки	0-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
	2-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
	3-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
	0-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
	0-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
Не вакцинированные, имеющие антитела к ВБА свиноматки	203-пол.	1:2560	пол.	7,5	пол.
	310-пол.	1:2560	пол.	7,75	пол.
	248-пол.	1:320	пол.	6,5	пол.
Вакцинированные свиноматки и поросята	591-пол.	1:1280	пол.	7,5	пол.
	145-пол.	1:40	пол.	3,0	пол.
	124-пол.	1:80	пол.	5,5	пол.
	154-пол.	1:40	пол.	5,75	пол.
	253-пол.	1:320	пол.	8,5	пол.
	126-пол.	1:20	пол.	5,5	пол.
	269-пол.	1:160	пол.	6,5	пол.
	598-пол.	1:2560	пол.	7,5	пол.
	268-пол.	1:160	пол.	6,5	пол.
	145-пол.	1:40	пол.	3,0	пол.
	171-пол.	1:160	пол.	7,0	пол.
	158-пол.	1:80	пол.	3,5	пол.
	154-пол.	1:40	пол.	5,75	пол.
	126-пол.	1:20	пол.	6,0	пол.
	530-пол.	1:640	пол.	6,75	пол.
	540-пол.	1:1280	пол.	7,5	пол.
Сыворотки специфичные к вирусам: РРСС	0-отр.	<1:20	отр.	<3,0	отр.
КЧС	0-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.
к Mycoplasma hyopneumonia	0-отр.	< 1:20	отр.	<3,0	отр.

Примечание: титр в РМН ≥ 3,0 log₂ –положительно, титр в Н-ИФА ≥ 1:20 – положительно; результат в СНЕКИТ-ИФА <90%-отрицательно, >100%-положительно

Результаты исследования сывороток в ИФА

Количество проб сыворотки	CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX)	Н-ИФА
Положительных проб	63 (В)	57 (А)
Отрицательных проб	29 (D)	28 (С)
Всего проб	92	92

танного варианта ИФА были использованы также гетерологичные референтные сыворотки против вирусов классической чумы свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней, *Mycoplasma hyopneumoniae*. Было показано, что активность антигена с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной сывороткой крови свиней).

Таким образом, результаты, полученные с помощью разработанного варианта ИФА совпадают с данными, полученными в реакции нейтрализации и с результатами теста CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX).

Определение относительной чувствительности и специфичности разработанного варианта ИФА проводили по сравнению с ИФА-набором CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX). Результаты исследования сывороток крови свиней с помощью ИФА и коммерческого набора CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX) представлены в табл. 3.

Относительную чувствительность рассчитывали как $A/B \cdot 100\%$, где: А – количество положительных проб при тестировании в разработанном варианте ИФА, В – количество положительных проб в тесте CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX).

Относительную специфичность определяли как $C/D \cdot 100\%$, где: С – количество

во отрицательных проб при тестировании в разработанном варианте ИФА, D – количество отрицательных проб в тесте CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX).

Относительная чувствительность разработанного варианта ИФА составила – 90,4%, а относительная специфичность – 96,5%.

Выводы

Таким образом, в результате проведенной работы был разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для определения титра антител к вирусу болезни Ауески в сыворотках крови свиней, который показал достаточно высокий уровень относительной чувствительности (90,4%) и относительной специфичности (96,5%).

Разработанная методика ИФА является воспроизводимой, результаты реакции имеют выраженную специфичность и совпадают с результатами, полученными с помощью коммерческого теста CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX) и реакции микронейтрализации.

Методика определения титра антител к вирусу болезни Ауески в сыворотках крови свиней в непрямом варианте ИФА может быть использована для определения уровня антител у вакцинированных и переболевших животных, а также для проведения серологического мониторинга в свиноводческих хозяйствах.

РЕЗЮМЕ

Разработан простой и чувствительный вариант ИФА для определения антител к вирусу болезни Ауески в пробах сывороток крови свиней. В качестве антигена использовали инактивированный концентрированный культуральный вирус болезни Ауески (штамм «Арский»), предварительно обработанный препаратом детергента NP-40. Представлены результаты сравнительного исследования сывороток крови свиней с помощью предложенного варианта ИФА, РМН и коммерческого теста CHEKIT-Aujeszký (Bommeli-IDEXX). Определена относительная специфичность и чувствительность разработанного метода. Полученную тест-систему применяли для скрининговых исследований иммунного статуса свинопоголовья различных хозяйств Российской Федерации.

SUMMARY

A simple and sensitive ELISA for detection of antibody to Aujeszký's disease virus in porcine sera was developed. An inactivated concentrated cultural Aujeszký's disease virus («Arsky» strain), that was previously treated by the NP-40 detergent, was used as an antigen. The results of comparative testing of porcine sera using the suggested ELISA, microneutralization test and commercial CHEKIT-Aujeszký test-kit (Bommeli-IDEXX) are presented in the paper. The relative specificity and sensitivity of the developed assay were determined. The developed test-system was used for screening studies of the immune status of pigs on different pig farms of the Russian Federation.

Литература

1. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных. М: ВНИТИБП, 1998. 928 с.
2. Н.И. Закутский, И.Ю. Хухоров, В.И. Жестерев, и др. Герпесвирусные болезни животных. Владимир/Покров: Фолиант, 2003. 283 с.
3. Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: пер. с англ. М.: Мир, 1999. 558 с., ил.