

УДК 619:579.887.11:573.6.086.83:57083.3:616-074

М.В. Чельшева, А.В. Щербаков

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИФА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р65 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

Введение

В настоящее время *Mycoplasma hyopneumoniae*, как наиболее значимый в эпизоотологическом плане вид микоплазм, представляет серьезную угрозу здоровью свиней и имеет особое значение в условиях интенсивного содержания животных. *M. hyopneumoniae* вызывает энзоотическую пневмонию свиней – инфекционную хроническую болезнь, характеризующуюся катаральной бронхопневмонией, постоянной лихорадкой, кашлем, задержкой роста поросят и прогрессирующим исхуданием при осложнениях [4, 5]. В сочетании с другими респираторными патогенами (вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вирус гриппа свиней, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* и т. д.) вызывает комплекс респираторных заболеваний свиней, что отягощает проявление основных симптомов пневмонии. Ранняя диагностика инфекции и изоляция инфицированных свиней из стада являются наиболее эффективными средствами предупреждения распространения и развития болезни.

Энзоотическую пневмонию диагностируют путем обнаружения у больных животных *M. hyopneumoniae* или антител к ней. Для выявления антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней используются такие методы диагностики, как реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако специфичность этих методов невысока из-за перекрестных реакций с другими микоплазмами свиней, что обусловлено наличием общих антигенов у *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* и *M. flocculare* [4, 6].

В связи с этим перспективным направлением в диагностике энзоотической пневмонии является разработка и использование ИФА на основе видоспецифичных белков *M. hyopneumoniae*. В настоящее время у *M. hyopneumoniae* идентифицированы несколько видоспецифичных иммунодоминантных белков, среди них поверхностные протеины р46, р65 и р97 [4].

Цель данной работы состояла в получении рекомбинантного белка р65 и раз-

работке на его основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней.

Материалы и методы

Микроорганизмы. Для клонирования использовали полевой изолят *M. hyopneumoniae*, выделенный из легких больного поросенка.

Выделение бактериальной ДНК из суспензии осуществляли с использованием 6 М гуанидинтиоцианата и стекловолонистых фильтров GF/F [1].

ПЦР. Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10Ч буфера для Taq-полимеразы, 3 mM Mg²⁺, 0,2 mM dNTPs, 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы, по 20 пмоль праймеров, 5 мкл раствора бактериальной ДНК и воду до конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Minicycler PTC-100 (MJ Research, США). Программа включала 35 циклов ПЦР при следующем температурном режиме: 30 сек денатурации при 94° С, 30 сек отжига праймеров при 55° С и 40 сек элонгации при 72° С. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2,0%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Молекулярное клонирование продуктов ПЦР осуществляли по общепринятым методикам [2].

Экспрессия рекомбинантного белка. Культивирование *E. coli* проводили в орбитальном шейкере при 150 об/мин при 37° С. В дневную культуру клеток, достигшую логарифмической фазы роста, добавляли индуктор IPTG (Promega, США). Уровень экспрессии и размер рекомбинантных белков определяли с помощью вертикального электрофореза в 12%-ном ПААГ.

Сыворотки крови свиней. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови, в которой антитела к *M. hyopneumoniae* были определены с помощью коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США).

В качестве отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку, полученную от здорового животного, не име-

ющего антител к *M. hyopneumoniae*.

Для определения специфичности метода использовали сыворотки крови от животных, имеющих антитела к вирусам репродуктивно-респираторного синдрома свиней, классической чумы свиней, болезни Ауески, трансмиссивного гастроэнтерита, цирковирису свиней 2-го типа.

Для определения чувствительности метода применяли сыворотки крови от свиней с разным уровнем антител.

Все сыворотки были проверены в ИФА с использованием коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX). Постановку и интерпретацию результатов реакции проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Непрямой вариант ИФА. Метод последовательных разведений сывороток крови в ИФА проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями. Рекомбинантный белок (концентрация 5 мкг/мл) адсорбировали на 96-луночные полистироловые планшеты фирмы «Nunc» (Дания) в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) по 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 16–18 ч при 4° С. Затем отмывали 3 раза буфером PBST (на 1 л раствора: NaCl — 29 г; KCl — 0,2 г; Na₂HPO₄ — 1,15 г; K₂HPO₄ — 0,2 г; Tween-20 — 0,1%; рН 7,0). Лунки планшетов блокировали 1% раствором молока в PBST, внося по 100 мкл раствора в каждую из них, и инкубировали 1 ч при 37° С. Планшеты отмывали трехкратно раствором PBST. Методом последовательных двукратных разведений одновременно с исследуемой сывороткой крови наносили отрицательную и положительную контрольные сыворотки, начиная с разведения 1:20. Инкубировали планшеты в термостатируемом шейкере 1 ч при 37° С. Повторяли отмывку планшетов. Затем вносили также по 100 мкл на лунку антивидовой конъюгат (Sigma, США) в рабочем разведении и инкубировали планшеты в аналогичных условиях. После отмывки добавляли субстрат ABTS в том же объеме. Реакцию останавливали через 10–15 мин добавлением 1% додецилсульфата натрия. Учет результатов производили на спектрофотометре «Униплан» (г. Москва) при длине волны 405 нм.

Таким образом, методом последовательных двукратных разведений сывороток крови в ИФА определяли титр антител в пробах. Титром исследуемой сыворотки считали последнее ее разведение, в котором значение оптической плотности (ОП)

вдвое превышало среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Непрямой вариант ИФА для выявления антител к *M. hyopneumoniae* по одному разведению сывороток крови проводили по вышеприведенной схеме, но исследуемые и контрольные сыворотки вносили в блокирующем буфере в разведении 1:40.

Методом одного разведения в ИФА определяли значение процента позитивности (ПП) по формуле:

$$\frac{(\text{ОП пробы} - \text{ОП К}^-)}{(\text{ОП К}^+ - \text{ОП К}^-)} \times 100\%,$$

где ОП пробы — оптическая плотность исследуемой сыворотки, ОП К⁻ — оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки, ОП К⁺ — оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Диагностическую чувствительность и специфичность вычисляли по формулам, рекомендованным Международным эпизоотическим бюро: $D_{\text{чув}} = (\text{ИП} / \text{ИП} + \text{ЛО}) \times 100\%$; $D_{\text{спец}} = (\text{ИО} / \text{ИО} + \text{ЛП}) \times 100\%$, где ИП — истинно положительный результат, ЛО — ложноотрицательный результат, ИО — истинно отрицательный результат, ЛП — ложноположительный результат.

Результаты и обсуждение

Разработка непрямого варианта ИФА

ДНК *M. hyopneumoniae* выделяли из 10% суспензии легких поросенка с признаками пневмонии. Ген, кодирующий белок р65, амплифицировали методом ПЦР. В реакции использовали праймеры, содержащие сайты рестрикции Bam HI и Hind III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликон клонировали в экспрессирующий плазмидный вектор. В результате трансформации рекомбинантной плазмидой компетентных клеток *E. coli* получили клоны, экспрессирующие белок р65 *M. hyopneumoniae*, содержащий на N-конце шесть остатков гистидина. Очистку рекомбинантного белка проводили методом металл-хелатной хроматографии. Со 100 мл культуры *E. coli* было получено 2,5 мг рекомбинантного белка с концентрацией 2 мг/мл.

Антигенную активность белка проверяли в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками свиней, взятыми в разведении 1:40. Рекомбинантный белок разводили от 1:100 (20 мкг/мл) до 1:6400 (0,313 мкг/мл). Зависимость средней оптической плотности контрольных сывороток от концентрации рекомбинантного ан-

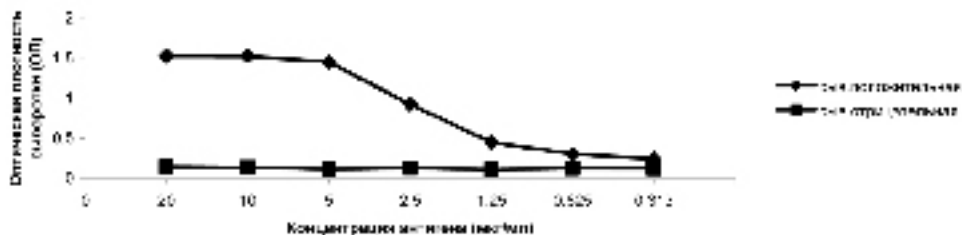


Рисунок 1. Антигенная активность рекомбинантного белка в непрямом ИФА с контрольными сыворотками

тигена *M. hyorheumoniae* представлена на рис. 1.

Максимальное разведение белка, при котором еще проявлялась его антигенная активность, составляла 1:1600 (1,25 мкг/мл). Таким образом, в ИФА с контрольными сыворотками белок р65 продемонстрировал высокую антигенную активность. Концентрация белка, равная 5 мкг/мл, была выбрана в качестве рабочей для ИФА.

Для определения рабочего разведения сывороток крови методом последовательного титрования в ИФА исследовали 105 сывороток крови свиней с разным уровнем антител. Для каждой сыворотки вычислили титр и процент позитивности. С помощью компьютерной программы определили коэффициент корреляции, стандартную ошибку, построили отдельные линии регрессии для разведений 1:20, 1:40, 1:80, соответственно. Результаты регрессионного анализа по всем данным представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что каждое из представленных разведений имеет сильную корреляционную связь, однако наибольшее значение коэффициента корреляции соответствует разведению 1:40 при одинаковых значениях стандартной ошибки 0,05.

Для определения позитивно-негативного порога (ПНП) реакции в ИФА исследовали 94 заведомо отрицательные сыворотки крови свиней в рабочем разведении. Получили среднее значение ОП отрицательных сывороток для разведения 1:40, равное 0,159 оптических единиц (о. е.). Прибавляя к данной величине два и три значения стандартного отклонения, рассчитали нижнюю и верхнюю границы ПНП, что составило

0,17 о.е. и 0,23 о.е. В качестве критерия для разграничения специфической и неспецифической реакций приняли процент позитивности, который вычислили для каждого из определенных значений (0,17 о. е. и 0,23 о. е.). Было установлено, что сыворотки следует считать отрицательными, если процент позитивности меньше 20%, и положительными, если процент позитивности больше 25%. Результаты реакции считались сомнительными, если значение полученного для сыворотки процента позитивности попадало в промежуточный интервал (20–25%).

Для получения достоверных результатов при определении уровня антител по одному разведению сыворотки необходимо было определить допустимые значения ОП контрольных сывороток, исследованных в разведении 1:40. Было показано, что оптимальными значениями ОП контрольных сывороток являются значения, лежащие в диапазоне: для положительного контроля — от 0,800 до 1,400, для отрицательного контроля — от 0,067 до 0,105.

В табл. 2 показаны результаты анализа значений оптической плотности контрольных сывороток, исследованных в разведении 1:40.

Если значения оптической плотности контрольных сывороток выходят за рамки допустимых значений, то результаты реакции будут считаться сомнительными, и пробы должны быть исследованы заново.

Специфичность ИФА на основе рекомбинантного белка определяли по результатам тестирования 153 пробы сывороток крови свиней, не имеющих антител к *M. hyorheumoniae*. Для определения диагностической чувствительности протестировали

Таблица 1
Значения коэффициента корреляции и стандартной ошибки для различных разведений сывороток

Разведение	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка
1:20	0,87	0,05
1:40	0,91	0,05
1:80	0,90	0,05

Таблица 2

Допустимые значения ОП контрольных сывороток

	Отрицательный контроль (N)	Положительный контроль (P)	Разница между контролями (P-N)
Среднее значение	0,086	1,100	1,014
Доверительный интервал	0,067 – 0,105	0,800 – 1,400	0,734 – 1,294

45 проб серопозитивных сывороток крови. Все сыворотки параллельно тестировались с использованием коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX). Результаты исследования сывороток на наличие антител к *M. hyopneumoniae* представлены в табл. 3.

По результатам исследования 45 положительных сывороток чувствительность разработанной тест-системы относительно коммерческого набора составила 96,7% (2 ложноотрицательных результата).

При исследовании 153 отрицательных сывороток крови свиней относительная специфичность разработанной тест-системы составила 95,6% (4 ложноположительных результата).

Согласованность двух тестов определяли по методу капа-статистики. Полученные данные представлены в табл. 4.

Абсолютная согласованность результатов ИФА (43+148)/197=0,97;
случайная согласованность положительных результатов 0,23 x 0,24=0,055;
случайная согласованность отрицательных результатов 0,77 x 0,76=0,585;
обобщенная случайная вероятность

согласованности результатов 0,055 x 0,585=0,032;

наблюдаемая согласованность результатов без учета случайностей 0,97-0,032=0,968;

неслучайная максимально возможная согласованность методов 1-0,032=0,968;

к-критерий (капа-статистика): 0,938/0,968=0,97.

Полученное в нашем случае значение к-критерия, равное 0,97, свидетельствует об очень хорошей согласованности результатов двух тест-систем.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен рекомбинантный белок р65, и на его основе разработан непрямой вариант ИФА для обнаружения антител к *M. hyopneumoniae*. Показано, что разработанный метод очень хорошо согласуется с коммерческим набором «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США) – значение к-критерия составляет 0,97.

Выводы

1. Методом молекулярного клонирования и экспрессии в *E. coli* получен рекомбинантный белок р65 *M. hyopneumoniae*.

Таблица 3

Результаты исследования сывороток крови свиней с использованием разработанной тест-системы и коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX)

Статус животного	Непрямой вариант ИФА	« <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Antibody Test Kit» (IDEXX)
Животные, не инфицированные <i>M. hyopneumoniae</i> (153 сыворотки)	отр. — 148, пол. — 4, сомн. - 1	отр. — 153
Животные, подозреваемые в заражении <i>M. hyopneumoniae</i> (45 сывороток)	пол. — 43, отр. — 2	пол. — 45

Таблица 4

Согласованность результатов двух иммуноферментных тест-систем для выявления антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней

Сравниваемые тест-системы		Результат в наборе « <i>M. hyopneumoniae</i> Antibody Test Kit» (IDEXX)		Всего	Выявленная пре-валентность в не-прямом ИФА
		положительно	отрицательно		
Результат в не-прямом ИФА ВНИИЗЖ	положительно	43	4	47	(43+4)/197=0,24
	отрицательно	2	148	150	(2+148)/197=0,76
Всего		45	152	197	
Выявленная превалентность в наборе « <i>M. hyopneumoniae</i> Antibody Test Kit» (IDEXX)		(43+2)/197=0,23	(4+148)/197=0,77		

2. На основе рекомбинантного антигена р65 разработана иммуоферментная тест-система для определения антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней.

3. Установлено, что специфичность и

чувствительность разработанного теста относительно коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США) составляет 95,6% и 96,7%, соответственно.

РЕЗЮМЕ

Экспрессией в *E. coli* получен рекомбинантный белок р65 *Mycoplasma hyopneumoniae*. На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант иммуоферментного анализа для выявления антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней. Установлена очень хорошая согласованность ($k=0,97$) разработанной тест-системы и коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США).

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae recombinant p65 protein was prepared by expression in *E. coli*. Indirect enzyme immunoassay has been developed on the basis of recombinant antigen, for the detection of antibodies to *M. hyopneumoniae* in porcine blood sera. Very good consistency ($k=0.97$) has been established between the developed test-system and commercial test kit «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, USA).

Литература

1. О.Г. Грибанов, А.В. Щербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид и РНК // Биохимия. 1996. Т. 21, № 6. С. 1064–1070.
2. Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 399 с.
3. S.N. Done. Enzootic pneumonia (mycoplasmosis) revisited // Pig J. 1996. V. 38, P. 40–61.
4. K. Cheikh, F. Shareck, S. Dea. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli* — expressed p46 and p65 membrane proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003. V. 10, № 3. P. 459–468.
5. F.C. Minion, E.J. Lefkowitz, M.L. Madsen et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis // J. Bacteriol. 2004. V. 186, № 21. P. 7123–7133.
6. E.L. Tracher. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* // Anim. Health Res. Rev. 2004. V. 5. P. 317–320.

УДК 619:616.98:579.843.95:578.74:616 – 097:470

О.И. Ручнова, О.В. Прунтова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОГО РОДСТВА ИЗОЛЯТОВ *PASTEURELLA MULTOCIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Введение

Пастереллезы — остро и хронически протекающие инфекционные болезни сельскохозяйственных животных и птиц. Широко распространены во всех странах мира. Экономический ущерб особенно велик при остром течении болезни, когда проводят вынужденный убой больных животных [1].

Pasteurella multocida является наиболее важным патогенным видом рода *Pasteurella*, который имеет широкий круг хозяев, включая большинство млекопитающих, птиц, а также человека. Этот микроорганизм является возбудителем геморрагической септицемии животных (серовариант В6), холеры птиц (серовариант А1 и А3), а также легочных пастереллезов (серогруппы А и Д), осложняющих респираторные инфекции вирусной и микоплазменной этиологии [2].

Основным звеном в системе мер борьбы с этим заболеванием является специфическая профилактика. Но для того, чтобы вакцины против пастереллеза были эффективны, в их состав должны входить те сероварианты пастерелл, которые вызывают вспышку заболевания.

Установлено, что антигенная структура пастерелл сложна и включает капсульный и соматический антигены. По современной классификации представители вида *P. multocida* подразделяются на 5 капсульных серогрупп (А, В, Д, Е и F) и 16 серовариантов по соматическому антигену (с 1 по 16) [1]. В настоящее время большая часть референтных штаммов различных серовариантов пастерелл находится толь-