

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

Введение

Инфекционная бурсальная болезнь кур (ИББ) — высококонтагиозное заболевание, поражающее фабрициеву сумку и лимфатическую систему у птиц, вызывает иммунодепрессию, которая приводит к подавлению роста и смерти цыплят 3–6-недельного возраста. Смертность у молодняка иногда может достигать 90%. Заболевание вызывает вирус семейства *Birnaviridae*, геном которого представлен двумя двущепочечными сегментами РНК. Сегмент А (IBDA, 3,2 kВ) состоит из двух открытых рамок считывания (ОРС). ОРС1 кодирует полипротеин, автокатализирующий выработку двух нуклеокапсидных белков VP3 и VP2, которые вызывают образование нейтрализующих антител. ОРС2 кодирует небольшой полипептид VP5, не имеющий отношения к репликации вируса. Сегмент В (IBDV, 2,9 kВ) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу [4, 6].

В ретроспективной диагностике ИББ для обнаружения специфических антител используют непрямой вариант твердофазного иммуноферментного анализа (Н-ИФА), предполагающий использование очищенных и концентрированных препаратов антигена на основе цельного вируса ИББ. Однако существуют определенные трудности с получением и очисткой вирусного антигена. Большие потери при очистке значительно снижают чувствительность реакции Н-ИФА на основе вирусного антигена.

Все эти проблемы позволяет решить дополнительное использование в Н-ИФА рекомбинантных вирусных белков, получаемых *in vitro* или эукариотических экспрессирующих системах.

В нашей работе мы исследовали возможность применения в Н-ИФА для определения антител против вируса ИББ рекомбинантного VP3-белка, включающего аминокислотную последовательность VP3-белка вируса ИББ, который является высококонсервативным и иммуногенным и имеет линейную структуру, что облегчает клонирование и экспрессию белка в культуре клеток *Escherichia coli* [4, 6].

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали вакцинный штамм вируса ИББ, штамм «БГ» (ВНИИЗЖ).

Сыворотки. В работе использовали сыворотки крови с разным уровнем антител к вирусу ИББ, полученные от вакцинированных и невакцинированных кур.

Экспрессия и очистка gVP3IBDV. Получение рекомбинантного клона *E. coli*, экспрессию и очистку рекомбинантного белка проводили, как описано [1, 2], с небольшими модификациями. Рекомбинантный белок выделяли из клеточного лизата аффинной хроматографией с использованием Ni-NTA Agarose (QIAGEN) согласно рекомендациям производителя.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 15%-м ПААГе в течение 1 ч., как описано [7], при постоянном напряжении 200V и токе 60мА.

Экспрессированные белки, разделенные в 15%-м ПААГе, переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм и проводили иммуноблоттинг в течение 1 ч. при постоянном токе 200 мА и напряжении 15V с использованием аппарата для иммуноблоттинга (EC140 Mini Blot Module, Thermo EC) согласно руководству.

Мембрану инкубировали в 1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина в буфере ТБС с pH 7,4, содержащем 0,02M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 0,05% Tween-20 (BCA-ТБС), 1 час, затем обрабатывали в течение часа сывороткой крови кур, иммунизированных живой вакциной против вируса ИББ, разведенной 1:100 в буфере BCA-ТБС. После выдерживания в растворе (1:20) иммунопероксидазного антикуриного конъюгата (Synbiotics Corporation, USA) в течение 1 ч. мембрану окрашивали субстратной смесью, включающей 4-chloro-1-naphthol и 0,04% H₂O₂. Каждый этап перед окрашиванием заканчивали отмыванием мембраны 3–4 раза в буфере ТБС.

Непрямой вариант иммуноферментного анализа (Н-ИФА). В работе использовали коммерческие наборы для опре-

деления антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни кур при исследовании проб в одном разведении производства ВНИИЗЖ согласно наставлению к набору (ВНИИЗЖ-ИФА) АгиБВ-ИФА.

Первоначально была исследована возможность использования для сенсibilизации планшетов смеси рекомбинантного и нативного антигенов вируса ИБВ [3], но чувствительность реакции с использованием смешанного антигена не отличалась от чувствительности реакции с использованием одного антигена (данные не представлены), поэтому было принято решение о необходимости нанесения рекомбинантного антигена на слой нативного антигена с целью повышения чувствительности реакции Н-ИФА для определения антител к вирусу ИБВ.

Реакцию Н-ИФА с использованием для сенсibilизации планшетов препарата рекомбинантного VP3-белка (rVP3) rVP3IBDV-ИФА, а также с комплексным использованием вирусного и рекомбинантного антигенов, проводили, как описано [2], с небольшими модификациями. Вкратце, рекомбинантный антиген адсорбировали на 96-луночные полистироловые планшеты фирмы "Nunc" (Дания) в 0,1М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,5) приблизительно по 0,5–1 мкг белка на лунку. При сенсibilизации планшетов вирусным и рекомбинантным антигенами, в лунках сначала адсорбировали антиген вируса ИБВ, а затем наносили препарат рекомбинантного вирусного белка VP3, как описано выше. Серийные разведения контроль-

ных (отрицательных и положительных) и испытуемых сывороток в БСА-ТБС наносили по 100 мкл в лунку. Коммерческий препарат антикуриного иммунопероксидазного конъюгата в разведении 1:400 вносили также по 100 мкл в лунки планшета. После каждого этапа планшеты отмывали 4 раза буфером ТБС. Окрашивание производили субстратной смесью АБТС, содержащей 0,04% H_2O_2 .

Определение относительной чувствительности и специфичности. Относительную чувствительность и специфичность ИБВ+gVP3IBDV-ИФА относительно Н-ИФА с использованием антигена вируса ИБВ (ИБВ-ИФА) и рекомбинантным антигеном (rVP3IBDV-ИФА) вычисляли, как описано ранее [2]. Диагностическую чувствительность и специфичность вычисляли по стандартной формуле [5].

Результаты и обсуждение

В результате молекулярного клонирования ампликона были получены клоны *E.coli*, экспрессирующие рекомбинантный белок, обозначенный как rVP3, с молекулярной массой 30 кД.

Рекомбинантный белок выделяли из бактериального лизата методом металл-хелатной хроматографии. Выход очищенного препарата rVP3 составлял приблизительно 4 мг со 100 мл культуры. Белок анализировали электрофорезом в 15%-м ПААГе (рис. 1Б) и иммуноблоттингом в реакции с сывороткой крови кур, иммунизированных живой вакциной против вируса ИБВ. Иммуноблоттинг с положительной контрольной сывороткой подтвердил,

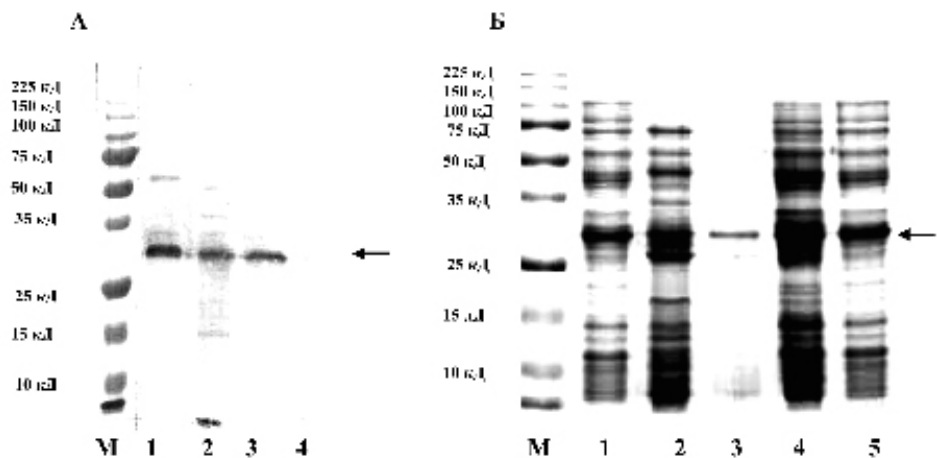


Рисунок 1. Образцы культуры *E.coli* и аффинно-очищенного рекомбинантного белка VP3. А. Иммуноблоттинг с сывороткой, содержащей антитела к вирусу ИБВ; Б. электрофорез в 15%-м ПААГе: М — белковый маркер; 1, 5 — ночная культура *E.coli* с рекомбинантной плазмидой; 2 — дневная культура *E.coli* с рекомбинантной плазмидой; 3 — белок rVP3; 4 — контроль бесплазмидной культуры *E.coli* (стрелкой обозначено расположение rVP3, ~ 30 кДА)

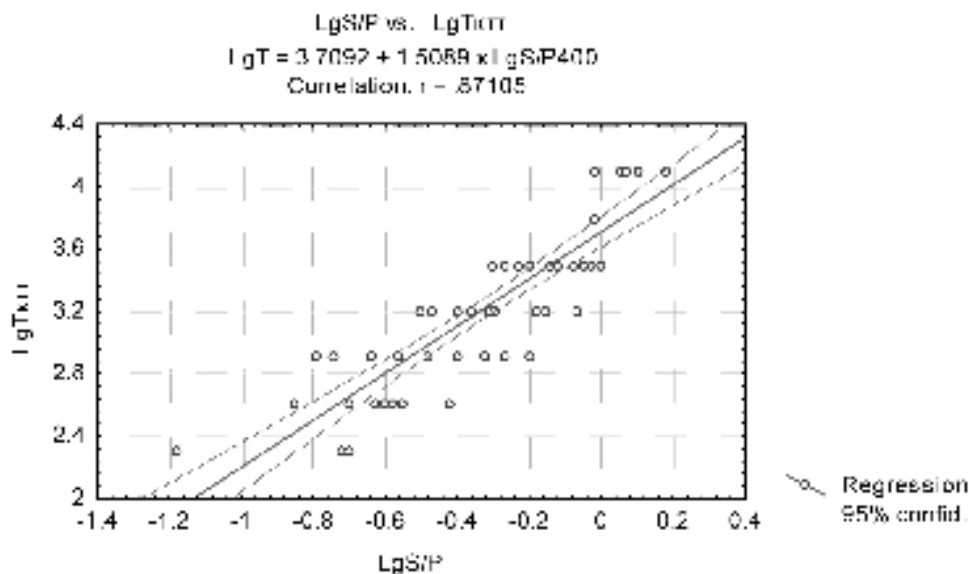


Рисунок 2. Уравнение линейной регрессии и калибровочная прямая для определения формулы расчета титра антител к вирусу ИБВ в ИБВ+гVP3IBDV-ИФА

что протеин, выделенный нами из ночной культуры, является белком гVP3 (рис. 1А).

Адсорбированный на планшетах на слой антигена вируса ИБВ рекомбинантный антиген гVP3IBDV сохранял свою активность при хранении в течение всего периода наблюдения (6 мес.).

Специфичность гVP3IBDV-ИФА оценивали, исследуя гетерологичные сыворотки против вирусов ньюкаслской болезни, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного энцефаломиеелита, синдрома снижения яйценоскости-76, инфекционного бронхита, реовируса, *M. gallisepticum*. Выбор сывороток для контрольной панели обуславливался перечнем вакцин против возбудителей заболеваний птиц, выпускаемых во ВНИИЗЖ. Сыворотки тестировали в разведении 1:400, так как в этом разведении наблюдали наибольшую разницу между значениями оптической плотности (ОП) отрицательного и положительного контролей.

Учет результатов производился с помощью формулы, полученной на основании тестирования 135 сывороток крови кур с разным уровнем антител к вирусу ИБВ в ИБВ+гVP3IBDV-ИФА, предварительно исследованных при использовании набора ВНИИЗЖ. Обработка результатов осуществлялась с помощью компьютерной программы «Statistica» (рис. 2).

Для объективной оценки иммунного ответа установили позитивно - негативный порог (ПНП). Двести четырнадцать заве-

домо отрицательных сывороток крови от невакцинированных кур, предварительно протестированных при использовании коммерческого набора для определения антител к вирусу ИБВ (ВНИИЗЖ), исследовали в ИБВ+гVP3IBDV-ИФА в разведении 1:400.

В качестве положительного и отрицательного контроля брали рабочие контрольные сыворотки из набора ВНИИЗЖ.

Позитивно-негативный порог определяли путем расчета средних значений оптической плотности отрицательных сывороток, прибавляя три значения стандартного отклонения. В результате полученная в виде прямой ПНП представляет границу, отражающую верхние 0,5% отрицательных величин, если допустить нормальную оптическую плотность отрицательных сывороток.

В итоге пороговое значение S/P составило 0,139. По формуле $\lg T = 3,7092 + 1,5089 \times \lg S/P$ был найден наивысший отрицательный титр. $T_{\text{максим.}} = 1:259$.

С учетом возможных погрешностей, допустимых в пределах одного разведения, где $T/2 < T < T \times 2$, выделяли сомнительную зону. Таким образом, титр антител в пределах 0–1:258 считали отрицательным, 1:259–1:399 — сомнительным, от 1:400 и выше — положительным.

На основании результатов, полученных при тестировании 364 сывороток крови кур с разным уровнем антител к вирусу ИБВ в реакции Н-ИФА с рекомбинантным анти-

Таблица 1

Статистические параметры для расчета ПНП

Статистические параметры	ОП	S/P
Среднее значение (n=214)	0,135215	0,050899
Минимальное значение	0,064000	0,000000
Максимальное значение	0,094	0,4410
Стандартное отклонение	0,062604	0,044128
Стандартная ошибка	0,004280	0,003016

Таблица 2

Оценка относительной чувствительности и относительной специфичности Н-ИФА на основе рекомбинантного антигена rVP3IBDV

АгИББ-ИФА	rVP3IBDV-ИФА		
	положительные сыворотки	отрицательные сыворотки	всего
Положительные сыворотки	131	19	150
Отрицательные сыворотки	4	210	214

геном и антигеном, включающим полную фракцию белков вируса ИББ, определили относительную специфичность и относительную чувствительность rVP3IBDV-ИФА. Данные представлены в табл.2.

Относительная чувствительность rVP3IBDV-ИФА составила 89%, относительная специфичность — 98%. Результаты, полученные в Н-ИФА с использованием двух антигенов, совпадали по качественным характеристикам на 95,5%.

Исследовали 295 сывороток крови кур с разным уровнем антител к вирусу ИББ, из которых 219 сывороток крови были от вакцинированных и 76 сывороток крови от невакцинированных кур, с целью сравнения чувствительности реакций Н-ИФА с рекомбинантным антигеном и антигеном, включающим полную фракцию белков вируса ИББ, а также антигеном ИББ+rVP3IBDV. Данные представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что реакция, основанная на совместном использовании вирусного и рекомбинантного антигенов, является более чувствительной, чем реакция с использованием одного антигена (нативного или рекомбинантного).

На основании результатов, полученных при тестировании 218 заведомо положительных сывороток крови от вакцинированных кур и 151 сыворотки крови от невакцинированных кур в реакции Н-ИФА с комплексным использованием нативного и рекомбинантного антигенов и антигеном фирмы Synbiotics(KPL), определили диагностическую специфичность и чувствительность обеих реакций, а также чувствительность, специфичность и точность Н-ИФА с антигеном ИББ+rVP3IBDV относительно Н-ИФА с антигеном фирмы Syn-

biotics (KPL). Результаты представлены в табл. 4.

Относительная чувствительность ИББ+rVP3IBDV-ИФА составила 98,15%, относительная специфичность — 97,5%. Результаты, полученные в Н-ИФА с использованием двух антигенов, совпадали по качественным характеристикам на 97,8%.

Вычислили и сравнили диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность Н-ИФА на основе антигена ИББ+rVP3IBDV и на основе антигена фирмы Synbiotics(KPL).

Диагностическая чувствительность ИББ+rVP3IBDV-ИФА составила 97,25%, диагностическая специфичность — 97,35%. Диагностическая чувствительность Н-ИФА на основе антигена фирмы Synbiotics(KPL) составила 93,1%, диагностическая специфичность — 94,04%. Как видно из расчетов, Н-ИФА на основе антигена ИББ+rVP3IBDV не уступает по чувствительности и специфичности набору фирмы Synbiotics(KPL).

Необходимо отметить, что Н-ИФА на основе комплекса нативного и рекомбинантного антигенов позволяет выявлять поствакцинальные антитела в возрасте от 20 дней, т.е. значительно раньше, чем это возможно в традиционных тест-системах на основе вирусного антигена. Было исследовано 50 сывороток крови от вакцинированных кур в возрасте от 15 до 40 дней. Вакцинация проводилась дважды в возрасте 5 и 15 дней. Результаты исследования представлены в табл. 5.

Выводы

Результаты проведенных исследований показали, что Н-ИФА на основе комплексного использования нативного и рекомбинантного антигенов (ИББ+rVP3IBDV) яв-

Таблица 3

Сравнение чувствительности Н-ИФА на основе вирусного, рекомбинантного и вирусного с рекомбинантным антигенами

	АгИББ-ИФА	rVP3IBDV-ИФА	АгИББ+ rVP3IBDV-ИФА	Всего
Положительные сыворотки	131	150	209	219
Отрицательные сыворотки	164	145	86	76

Таблица 4

Оценка относительной чувствительности и относительной специфичности Н-ИФА на основе объединенного антигена ИББ+rVP3IBDV

Аг Synbiotics(KPL)	Аг ИББ+rVP3IBDV		
	положительные сыворотки	отрицательные сыворотки	всего
Положительные сыворотки	212	0	212
Отрицательные сыворотки	4	153	157
Всего	216	153	369

лялся более чувствительным и специфичным тестом по сравнению с Н-ИФА на основе использования нативного или рекомбинантного антигена вируса ИББ по отдельности.

Относительная чувствительность ИББ+rVP3IBDV-ИФА составила 98,15%,

относительная специфичность — 97,5%. Результаты, полученные в Н-ИФА с использованием двух антигенов, совпадали по качественным характеристикам на 97,8%.

Диагностическая чувствительность ИББ+rVP3IBDV-ИФА составила 97,25%, диагностическая специфичность — 97,35%.

Таблица 5

Результаты исследования сывороток от вакцинированных кур в Н-ИФА с использованием различных антигенов вируса ИББ

№ п/п	Возраст птицы	Сыворотки, исследованные в Н-ИФА (положительные/общее количество)			
		Аг ИББ	Аг rVP3IBDV	Аг ИББ+rVP3IBDV	Аг Synbiotics(KPL)
1	15 дн.	0/10	0/10	1/10	2/10
2	17 дн.	0/10	0/10	2/10	2/10
3	21 дн.	0/10	1/10	4/10	5/10
4	38 дн.	3/20	7/20	20/20	20/20

РЕЗЮМЕ

С целью повышения чувствительности непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни (ИББ) на основе нативного антигена вируса ИББ был использован рекомбинантный антиген — аналог капсидного белка VP3 вируса ИББ. Чувствительность реакции повышалась за счет увеличения в составе антигена концентрации белка VP3, который является иммуногенным и вызывает выработку нейтрализующих антител. Диагностическая чувствительность Н-ИФА на основе комплексного использования рекомбинантного и нативного антигенов вируса ИББ составила 97,25%, диагностическая специфичность — 97,35%.

ABSTRACT

Recombinant capsid protein VP3 have been used as antigen indirect ELISA to achieve higher sensitivity and specificity of the assay using native antigen to detect IBDV-specific antibodies. Relative sensitivity of IBDV+rVP3IBDV-ELISA made up 98,15%, relative specificity — 97,5%. The results obtained in I-ELISA based on the use of the two antigens, have 97,8% coincidence in qualitative characteristics. Diagnostic sensitivity of IBDV+rVP3IBDV-ELISA made up 97,25%, diagnostic specificity — 97,35%.

Литература

1. А.В. Каньшина, А.С. Яковлева, А.М. Тимина и др. Использование рекомбинантного нуклеокапсидного белка для выявления антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней в непрямом ИФА // «Пробл. мониторинга и генодиагностики инфекц. бол. ж-ных»: Матер. Междунар. науч. конф. молодых ученых 24–26 марта 2004 г. Владимир, 2004. С. 107–110.

2. Н.Н. Луговская, А.В. Щербаков, А.С. Яковлева и др. Использование рекомбинантного N-белка в непрямом иммуноферментном анализе для обнаружения антител к вирусу инфекционного бронхита кур // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2005. Т. 3. С. 420–429.

3. J.T. Bosse, R. Friendship, S. Rosendal, B.W. Fenwick. Development and evaluation of a mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 1,5 and 7 infections in commercial swine herds // Vet. Diagn. Invest. 1993. V. 5. P. 359–362.

4. A. Francois, C. Chevalier, B. Delmas et al. Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens // Vaccine. 2004. V. 22, № 17–18. P. 2351–2360.

5. C.S. Hayhow. Development of antigen capture ELISA for detection of Enterovirus in commercial turkeys // Avian Dis. 1993. V. 37. P. 375–379.
6. F.S. Kibenge, P.K. McKenna, J.K. Dybing. Genome analysis of the large RNA segment (segment A) of

- a naturally avirulent serotype 2 infectious bursal disease virus // Virology. 1991. V. 184, № 1. P. 437–440.
7. U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

УДК 616.98:578.833.27:636.52/.58:616-097.3

**А.Э. Меньщикова, А.Н. Колотилов, Н.В. Беляева,
В.Н. Ирза, В.Н. Решетникова, Н.С. Мудрак**

ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ПТИЦ У ЦЫПЛЯТ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ ВАКЦИНОЙ ИЗ ШТАММА «CALNEK 1143 M»

Введение

Инфекционный энцефаломиелит птиц (ИЭП) или эпидемический тремор – контактное и широко распространенное заболевание, вызываемое энтеровирусом семейства Picornaviridae. Болезнь характеризуется высокой заболеваемостью молодняка раннего возраста, нарушением функции ЦНС: атаксией, тремором головы и шеи, парезами и параличами конечностей [2, 4].

У птицы старшего возраста наблюдается снижение яйценоскости. Экономический ущерб птицеводству складывается из потерь от летальности цыплят при остром течении заболевания (до 20–50%) [6].

Наиболее правильным и эффективным направлением в борьбе с этой инфекцией является своевременная вакцинопрофилактика. Для защиты птиц от заболевания ИЭП широко применяют живые вакцины. Живой вакциной из штамма «Calnek 1143M» прививают поголовье однократно методом выпаивания [8, 9].

Вакцинация предотвращает снижение у кур яйценоскости, вызванное этим заболеванием, вертикальную передачу возбудителя потомству и обеспечивает защиту молодняка в течение первых недель жизни от раннего заражения благодаря трансовариальному иммунитету. Показателем поствакцинального иммунитета является уровень специфических антител до вакцинации и через несколько недель после нее.

Одним из наиболее чувствительных, воспроизводимых и быстрых в постановке методов, позволяющих проводить скрининг сывороток крови кур на наличие антител, является иммуноферментный анализ [1, 3, 5].

Целью нашей работы было изучение динамики гуморального иммунитета к вирусу инфекционного энцефаломиелита птиц методом непрямого ИФА у цыплят, вакцинированных живой вакциной из штамма «Calnek 1143 M».

Материалы и методы

Вакцина. В опыте использовали живую сухую вакцину из штамма «Calnek 1143 M» производства ФГУ «ВНИИЗЖ».

Цыплята. Использовали цыплят 21-суточного возраста, серонегативных к вирусу ИЭП. Формировали две группы цыплят по 40 голов. Опытную группу цыплят прививали живой вакциной против ИЭП, в дозе по 3,0 Ig ЭИД/50 на голову, путем выпаивания. Контрольную группу оставляли интактной.

Серологические исследования: Сыворотки крови, полученные от цыплят до вакцинации и через каждые 7 дней после нее в течение 190 суток, исследовали на наличие специфических антител к вирусу ИЭП методом непрямого варианта ИФА с использованием коммерческого диагностического набора фирмы Synbiotics (США), сертифицированного на территории России.

Согласно наставлению по применению вакцины титр антител у 80% и более привитых цыплят к вирусу ИЭП в ИФА должен быть не ниже минимального положительного значения ($T=3397$), при отсутствии специфических антител у цыплят контрольной группы.

Результаты и обсуждение

Средние значения титров антител к вирусу ИЭП в группах цыплят до вакцинации и в разные сроки после нее приведены на рисунке и в табл. 1.