

- кий. - Киев: Укр ИНТЕІ, 1993. - 208 с.
5. Федоров, Ю.Н. Иммунобиологические основы и принципы профилактики болезней новорожденных телят / Ю. Н. Федоров // Ветинформ. - 2002. - № 1. - С. 16-17.
 6. Федоров, Ю.Н. Иммунопрофилактика болезней новорожденных телят / Ю. Н. Федоров // Ветеринария. - 1996. - № 11. - С. 3-6.
 7. Эффективность вакцинопрофилактики вирусных диарей новорожденных телят рота- и коронавирусной этиологии/ В. А. Мищенко, О. И. Гетманский, Т. Б. Никешина [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья ж-ных. - Владимир, 2005. - Т.3. - С. 184-193.

УДК 619:616.98:578:579:636.5:573.6.086.83:57.083.3

Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин

СОЗДАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В ПТИЦЕВОДСТВЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ УЧЕТА, ОБРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Введение

Эпизоотическое благополучие по большинству инфекционных болезней млекопитающих и птиц во многом определяется своевременной диагностикой и специфической профилактикой. В связи с развитием промышленного птицеводства, возникновением новых инфекционных заболеваний птиц, против которых проводят профилактические вакцинации, требуется разработка чувствительных, высокоспецифичных и поддающихся автоматизации методов обнаружения возбудителей заболеваний и оценки иммунного статуса птиц.

В течение последнего десятилетия в промышленном птицеводстве были предприняты успешные попытки модернизации серологической диагностики с применением иммуноферментного анализа, в полной мере отвечающего современным требованиям при создании диагностических систем для конкретного возбудителя [10].

Первоначально были разработаны тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител в сыворотках крови кур к наиболее значимым возбудителям заболеваний птиц методом последовательных разведений сывороток. Однако их масштабное применение оказалось более трудоемким и дорогостоящим по сравнению с традиционными методами. В попытке увеличить количество тестируемых проб и уменьшить расход реактивов и трудозатраты в дальнейшем провели оценку различных способов для прогнозирования в ИФА титров антител при исследовании проб сывороток в одном разведении.

Рядом авторов были предложены различные способы преобразования значений абсорбции, измеренной в отдельном разведении сыворотки, в числовое значение титра антител [9, 10, 11]. Кроме того, с применением соответствующих устройств и измерительного оборудования была разработана технология, позволяющая определять в одной реакции уровень антител в большом количестве проб сывороток одновременно против нескольких антигенов. Это, в свою очередь, привело к созданию и внедрению в ветеринарную практику специализированных компьютерных программ не только для перевода оптической плотности в числовое значение точного титра, но и для автоматической обработки, хранения и создания баз данных [11].

Крупнейшие фирмы — производители иммуноферментных наборов для диагностики болезней птиц (IDEXX (США), KPL (США), Guildhay Ltd (Великобритания), Biocheck (Голландия)) при постановке реакции в одном разведении для расчета титра антител в сыворотке крови выбрали линейную зависимость $Ig\ T$ от величины $Ig\ S/P$ (отношение оптической плотности испытуемой пробы к оптической плотности положительного контроля), имеющую вид: $Ig\ T = A + B \cdot Ig\ S/P$. Для своих тест-систем каждая из этих фирм создала программное обеспечение с учетом их особенностей.

Задачей наших исследований было разработать отечественные тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для определения антител к семи наиболее значимым инфекционным заболеваниям кур

(нюкаслской болезни, инфекционному бронхиту, инфекционной бурсальной болезни, синдрому снижения яйценоскости, реовирусной инфекции, респираторному микоплазмозу и микоплазменному тено-синовиту) при исследовании сывороток в одном разведении и создание на их основе комплексной системы регистрации с применением компьютерной программы для обработки и хранения результатов при проведении массовых серологических исследований в птицеводствах.

Материалы и методы

Антигены. В качестве антигенов для непрямого варианта ИФА использовали вирусосодержащие материалы, полученные после заражения 9–11-суточных куриных СПФ-эмбрионов производственным штаммом H120 вируса инфекционного бронхита кур (ИБК), производственным штаммом Ла-Сота вируса нюкаслской болезни (НБ), производственным штаммом «БГ» вируса инфекционной бурсальной болезни (ИББ). Вакцинным штаммом реовируса птиц (РВП) S1133 заражали культуру клеток Vero. Для получения антигена вируса синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76) использовали экстраэмбриональную жидкость развивающихся утиных эмбрионов, содержащую штамм «B8/78» вируса ССЯ-76.

Культуральный антиген *Mycoplasma gallisepticum* (МГ), штамм S6, выращивали в среде Frey с 10–15% раствором лошадиной сыворотки. *Mycoplasma synoviae* (МС), штамм WUV 1853, культивировали в PPLO-бульоне с 15% раствором лошадиной сыворотки.

Инактивацию вирусов и микоплазм проводили с использованием димера аминокислоты этиленмина (АЭЭИ) в выбранной концентрации при 24° С в течение 6 часов при постоянном перемешивании. После инактивации суспензии всех антигенов очищали и концентрировали через градиент плотности сахарозы.

Полученные препараты антигенов проверяли на активность и специфичность в ИФА, исследовали под электронным микроскопом и в электрофорезе в ПААГ [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови СПФ-цыплят. В качестве положительного контроля – моноспецифичные сыворотки крови кур, двукратно вакцинированных соответствующими антигенами, с титрами в ИФА не менее 1:1600–1:6400. Материалом для исследования служили сы-

воротки крови кур с разным уровнем антител к выбранным антигенам, предварительно определенным при использовании базовых реакций РТГА, РДП, РН и коммерческих наборов фирмы KPL (США), сертифицированных на территории РФ.

Конъюгат. Использовали коммерческий аффинно очищенный козий антикуриный конъюгат меченный пероксидазой (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, (Москва).

Иммуноферментный анализ. Непрямой вариант иммуноферментного анализа проводился по стандартной схеме [1, 2].

Результаты и обсуждение

Рабочее разведение сыворотки. Для определения оптимального разведения предварительно методом последовательных разведений исследовали сыворотки крови кур с различным уровнем антител (не менее 60 сывороток на каждый антиген), предварительно протестированных либо в базовых реакциях (РТГА, РДП, РН), либо с применением коммерческих наборов для ИФА фирмы KPL (США), зарегистрированных на территории Российской Федерации. Были выбраны разведения 1:100, 1:200, 1:400, 1:800. Для каждой исследуемой сыворотки с определенным титром вычислялись четыре значения $S/P: S/P_{100}, S/P_{200}, S/P_{400}, S/P_{800}$.

Для тест-систем со всеми антигенами самое высокое значение коэффициента корреляции наблюдалось при разведении 1:400, которое и было выбрано в качестве рабочего [3, 5].

Более низкое значение коэффициента корреляции при разведении 1:200 могло объясняться тем, что разведение 1:200 являлось предельным значением верхней границы доверительного интервала для фоновых (отрицательных) титров <1:100, и при его выборе могли получиться некорректные результаты, так как это значение в большинстве случаев выходило за пределы линейной зависимости. При выборе рабочего разведения сыворотки 1:800 не выявлялись пробы с относительно низкой концентрацией антител.

С помощью компьютерной программы *Statistica* на основе данных, полученных в ходе исследований, строили калибровочные кривые зависимости и выводили уравнение линейной регрессии определения числового значения титров, исходя из значений оптической плотности исследуемых сывороток.

Уравнения для вычисления логарифмированного значения титра имели вид:

ИБК — $\lg T = 1,473 \cdot \lg S/P + 3,838$
 ССЯ — $\lg(T) = 2,367 \cdot \lg(S/P) + 4,162$
 МС — $\lg T = 1,375 \cdot (LG S/P) + 3,662$
 ИББ — $\lg T = 1,714 \cdot (LG S/P) + 3,855$
 НБ — $\lg(T) = 1,514 \cdot \lg(S/P) + 3,634$
 МГ — $\lg(T) = 1,359 \cdot \lg(S/P) + 3,73$
 РЕО — $\lg(T) = 1,232 \cdot \lg(S/P) + 3,583$

Позитивно-негативный порог и допустимые значения контрольных сывороток. Для объективной оценки иммунного ответа необходимо было установить позитивно - негативный порог (ПНП), для чего не менее 50 (на каждый антиген) заведомо отрицательных сывороток крови от СПФ-цыплят, протестированные с помощью коммерческого набора KPL, исследовали методом последовательных разведений.

Позитивно-негативный порог определяли путем расчета средних значений оптической плотности отрицательных сывороток для каждого разведения, прибавляя три значения стандартного отклонения. Позитивно-негативный порог, полученный в виде прямой, представлял границу, отражающую верхние 0,5% отрицательных величин.

Средние значения оптической плотности контрольных сывороток рассчитывали по сумме оптических плотностей всех разведений в трех повторностях. Определяли пороговое значение S/P и по формуле [1] находили наивысший отрицательный титр. С учетом возможных погрешностей, допустимых в пределах одного разведения, где $T/2 < T < 2 \cdot T$, выделяли сомнительную зону. Выделение сомнительной зоны повышает специфичность системы за счет некоторого снижения чувствительности [3, 4, 6, 7].

Обработка данных ИФА, основанная на методе вычисления величины S/P, позволяла обеспечить стабильность в определении титров антител вследствие уменьшения ошибок, так как значения оптической плотности исследуемых проб менялись одновременно со значениями оптической плотности контрольных сывороток. В этой связи особенно важно, чтобы значения оптической плотности для положительной и отрицательной контрольных сывороток находились в интервале допустимых значений.

Изменение значений оптической плотности контрольных сывороток в ту или

иную сторону увеличивает долю ошибки и ведет к появлению либо ложноположительных, либо ложноотрицательных результатов. Если значения оптической плотности контрольных сывороток выходят за рамки допустимых значений, то результаты реакции будут считаться недостоверными, и пробы должны быть исследованы повторно.

Полученные результаты легли в основу компьютерной программы «СИНКО-ИФА» — программа для регистрации, обработки, хранения результатов иммуноферментного анализа в ветеринарии, созданной в ФГУ «ВНИИЗЖ». Коэффициенты уравнения линейной регрессии для расчета титров в каждой тест-системе были заложены в программу для преобразования значений оптической плотности, полученных в результате исследования сывороток, в числовое значение титра.

Кроме того, в программе предусматривались автоматизированные учет и обработка результатов иммуноферментного анализа, а также хранение обработанной информации в базе данных с возможностью быстрого поиска и выборки групп данных. Она также позволяла вводить информацию по новым иммуноферментным тест-системам, в том числе и зарубежного производства при условии соблюдения ряда формальных условий сходства этих наборов. Программа была написана для работы в операционной системе Windows 3.11 и выше и позволяет работать с целым рядом спектрофотометров-ридеров как отечественного, так и зарубежного производства [8].

Выводы

Таким образом, разработанные отечественные иммуноферментные тест-системы для количественного определения антител к семи возбудителям (ньюкаслской болезни, инфекционному бронхиту, инфекционной бурсальной болезни, синдрому снижения яйценоскости, реовирусной инфекции, респираторному микоплазмозу и микоплазменному теносинувиту) наиболее значимых инфекционных заболеваний в промышленном птицеводстве и компьютерная программа явились основой для создания комплексной автоматизированной системы для проведения ИФА при массовых серологических исследованиях.

РЕЗЮМЕ

Созданы иммуноферментные тест-системы для количественного определения антител в сыворотках крови кур при исследовании их в выбранном рабочем разведении для серодиагностики семи наиболее значимых инфекционных заболеваний в промышленном птицеводстве. Определены позитивно-негативный порог, допустимые значения оптической плотности отрицательной и положительной

контрольных сывороток. Параметры расчета титров антител были внесены в разработанную компьютерную программу «СИНКО-ИФА» для учета, обработки и хранения результатов анализа.

ABSTRACT

ELISA-kits for the antibody quantification in chicken sera tested at the selected working dilutions were developed for serological diagnosis of the seven most significant infectious diseases in commercial poultry. Positive and negative thresholds, acceptable optical density values for negative and positive control sera were determined. Parameters for antibody titre calculation were introduced into the developed "SINKO-ELISA" software for recording, processing and storing of assay results.

Литература

1. Н.С. Мудрак, Т.В. Оковытая, Л.А. Щербакова и др. Оптимизация условий постановки непрямого твердофазного ИФА для выявления антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни // Вирусн. бол. с.-х. ж-ных: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Владимир, 1995. С. 245.
2. М.А. Волкова, Н.С. Мудрак, В.М. Гуленкин и др. Расчет титра сывороток по одному разведению при иммуноферментной диагностике ССЯ-76 // Пробл. инфекц. патол. с.-х. ж-ных: Тез. докл. конф., посвященной 100-лет. открытия вируса ящура. Владимир, 1997.
3. Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, А.В. Борисов. Иммуноферментная тест-система для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур // Роль вет. науки в развитии жив-ва: Матер. Междунар. науч.-произв. конф. Алматы, 2000. С. 139–140.
4. И.А. Волкова, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин и др. Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для определения антител к *Mycoplasma gallisepticum* при тестировании сывороток в одном разведении // Уч. зап. Витебск. гос. акад. вет. мед. Витебск, 2001. Т. 37, ч. 2. С. 23–24.
5. И.А. Волкова, М.С. Волков, Н.С. Мудрак и др. Разработка и применение тест-системы на основе непрямого иммуноферментного анализа для определения антител к возбудителю инфекционного синюита в сыворотках крови кур методом одного разведения // Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 45-лет. ФГУ ВНИИЗЖ. Владимир, 2003. С. 260–265.
6. Т.Б. Манин, С.К. Старов, В.В. Дрыгин и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления и количественной оценки антител к вирусу ньюкаслской болезни методом одного разведения // Матер. конф. молодых ученых. Владимир, 2000. С. 165–170.
7. А.И. Куприянов, Н.С. Мудрак, С.К. Старов, В.В. Дрыгин. Разработка непрямого варианта ИФА для количественного определения антител к возбудителю ареовирусной инфекции в сыворотках крови кур методом одного разведения // Матер. конф. молодых ученых. Владимир, 2000. С. 173–179.
8. Ю.В. Зинковский, Н.С. Мудрак, С.Н. Колосов, В.В. Дрыгин Зинковский, Ю.В. Компьютерная программа «Иммуноферментный анализ» // Матер. конф. молодых ученых. – Владимир, 2000. С. 173–179.
9. Z. Penzes, J. Meszaros. Comparison of different computational methods for measuring antibodies to avian infectious bronchitis virus in single serum dilution // Acta Vet. Hungar. 1992. V. 40, N 4. P. 311–321.
10. D.B. Snyder. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 2. Comparison of computational methods for measuring antibody titre in a single serum dilution // Avian Dis. 1983. V. 27. P. 474–484.
11. D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Mallinson et al. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 3. Simultaneous measurement of antibody titres to infectious bronchitis, infectious bursal disease and Newcastle diseases viruses in a single serum dilution // Avian Dis. 1984. V. 28. P. 12–24.

УДК 619:57082.26.001.8

Н.И. Герасимова, С.К. Старов, В.Н. Герасимов

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОГО СПОСОБА ПОДДЕРЖАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК СПЭВ, GH-91, VERO

Введение

Использование метода непрерывного пассирования клеточных культур, как одного из эффективных способов поддержания их высокой пролиферативной активности, сопряжено с вероятностью контаминации, излишними затратами. Чаще всего используется комбинированный метод поддержания культур. Однако в процессе хранения перевиваемые культуры клеток снижают первоначальную пролиферативную активность, которая может

быть восстановлена в течение 3–4 последовательных пассажей [2, 5, 10, 1]. Известен ряд приемов активизации роста клеток, хранившихся при различных температурах: повышение концентрации в питательной среде сыворотки крови животных, в том числе и от новорожденных плодов [6, 7].

Из-за риска контаминации используют сыворотки, обработанные полиэтиленгликолем [3], при этом утрату седиментированных компонентов сыворотки до-