

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

УДК 619:616.98:578:636.2:616-078

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГА

О.Г. Губенко¹, О.П. Бьядовская², С.В. Кононова³, Ю.Ю. Бабин⁴, Н.А. Солоухина⁵, А.В. Кононов⁶

¹ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gubenko@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononova@arriah.ru

⁴ младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: babin@arriah.ru

⁵ магистрант, базовая кафедра микробиологии и вирусологии ВлГУ при ФГБУ «ВНИИЗЖ»

⁶ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты получения очищенных и концентрированных препаратов антигена вируса болезни Шмалленберга и специфических гипериммунных сывороток лабораторных животных, использованных для разработки непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: болезнь Шмалленберга, «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа.

UDC 619:616.98:578.826.2:616-078

PREPARATION OF SPECIFIC COMPONENTS OF ELISA TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF SCHMALLEMBERG DISEASE VIRUS ANTIGENS

O.G. Gubenko¹, O.P. Bjadovskaya², S.V. Kononova³, Yu.Yu. Babin⁴, N.A. Soloukhina⁵, A.V. Kononov⁶

¹ Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gubenko@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

⁴ Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: babin@arriah.ru

⁵ Master's Student, affiliated Microbiology and Virology Chair of the Vladimir University at the FGBI «ARRIAH»,

⁶ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

SUMMARY

Preparation of purified and concentrated antigens of Schmallenberg disease virus as well as specific hyperimmune sera in laboratory animals used for the development of indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is described in the paper.

Key words: Schmallenberg disease, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Шмалленберга — трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного рогатого скота, овец и коз всех возрастных групп, характеризующаяся абортными, мертворождением, лихорадкой, истощением, снижением удоев [1].

Вирус болезни Шмалленберга относится к семейству *Bunyaviridae*, роду *Orthobunyavirus*, серогруппе Симбу (*Simbu serogroup*). Вирус имеет сферическую форму, диаметр 90–100 нм, геном представлен РНК с отрицательной полярностью, состоящей из трех сегментов: L — большого, кодирующего РНК-полимеразу (транскриптазу); S — малого, кодирующего нуклеокапсидный белок (N) и неструктурный протеин (NSm), и М — среднего, кодирующего поверхностные гликопротеины (G₁ и G₂) (рис. 1) [1, 4].

Нуклеокапсид буньявирусов организован по типу спиральной симметрии. Снаружи нуклеокапсид покрыт двухслойным липидным суперкапсидом, на котором располагаются белковые структуры с гемагглютинирующей активностью, объединённые в форме поверхностной решётки [5]. Вирусные частицы не имеют мембранного или матриксного белка.

Имеются 4 структурных белка: 2 поверхностных гетеродимера — гликопротеины G_s и G_m, которые участвуют в прикреплении, слиянии клеток и ответственны за выработку защитных антител, а также вирусный полимеразный комплекс (RNP), состоящий из L-белка и нуклеопротеина N, который отвечает за транскрипцию и репликацию вирусов [5].

Сложная структурная организация вируса создает трудности при выборе условий очистки и концентрирования вирусосодержащего материала. Поэтому в ходе работы требовалось подобрать наиболее эффективный и простой метод получения очищенного и концентрированного препарата вируса болезни Шмалленберга (ВБШ).

Для оценки иммунобиологических свойств вируса, а также для контроля качества антигенного сырья, используемого при производстве диагностических наборов, актуальной является разработка непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа (ИФА), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность, специфичность и экспрессность.

Целью работы было получение специфических компонентов для непрямого «сэндвич»-варианта ИФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В ходе работы по очистке и концентрированию использовали ВБШ, изолят ВН80/11-4 (полученный из Института Фридриха Леффлера, Германия), адаптированный в ФГБУ «ВНИИЗЖ» к перевиваемой линии культуры клеток почки сирийского хомяка (ВНК-СТ) и почки сайги (ПС) с титром инфекционной активности 4,0 Ig ТЦД₅₀/см³.

Получение антигена. Культуральную жидкость, содержащую вирус, очищали от балластных белков и фрагментов клеток низкоскоростным центрифугированием при 4800 в течение 40 мин, далее полученную надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч 40 мин при 45000 г. Осадок, образовавшийся после центрифугирования, растворяли в 10 мМ трис-НСl с 100 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА (ТНЕ) буферном растворе и подвергли дальнейшему центрифугированию через слой 30% сахарозы при 106000 г в течение 2,5 ч. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе ТНЕ в объеме 1/250 от первоначального, таким образом концентрируя в 250 раз. Антиген фасовали в криопробирки и хранили до использования при температуре минус 80°C.

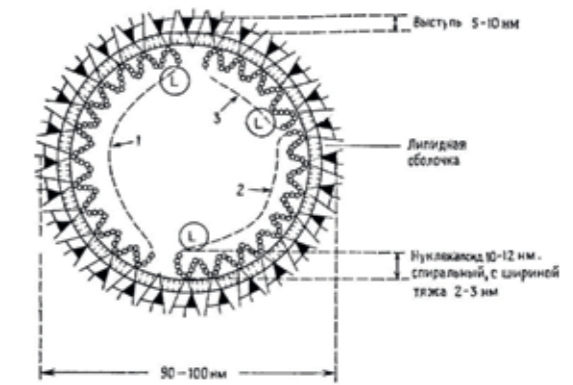


Рис. 1. Схематическое изображение структуры вириона буньявируса.

1, 2 и 3 — соответственно большая (L), средняя (M) и малая (S) молекулы РНК, связанные с молекулами белка L (компонент транскриптазы)

(<http://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-akabane-i-shmallenberga-shodstvo-i-razlichiya>)

Электрофорез. Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) [2].

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в препаратах антигена ВБШ измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина [2].

ПЦР-РВ. Для оценки специфичности очищенного вирусного антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва) согласно инструкции изготовителя. Для выявления генома вируса Шмалленберга использовали праймеры, амплифицирующие участок S-сегмента генома. ПЦР проводили согласно методике, разработанной Bilk и соавт. [3].

Иммунизация животных. Для получения специфической сыворотки крови кроликов и морских свинок использовали препараты антигена ВБШ.

Животных (3 кроликов и 3 морских свинок) иммунизировали антигеном, эмульгированным с добавлением стерильного масляного адьюванта Montanide ISA 70, трижды с интервалом 10 и 21 суток, подкожно в область спины по 0,5 см³ на морскую свинку и по 1,0 см³ — на кролика, и обескровливали на 40–41 сутки после первой иммунизации.

Улавливающие и детекторные антитела. В качестве улавливающих и детекторных антител использовали вирусспецифические гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок, полученные при иммунизации лабораторных животных, как описано выше.

Контрольные и испытуемые образцы. В качестве отрицательных контрольных образцов использовали культуральную жидкость культуры клеток (к/кл) ПС и ВНК-СТ. В качестве положительных контрольных проб использовали вирусосодержащую суспензию культуры клеток ПС с титром инфекционной активности 3,5 Ig ТЦД₅₀/см³. Испытуемыми образцами являлись вирусосодержащие суспензии, отобранные на различных этапах очистки и концентрирования ВБШ, а также гетерологичные антигены (ротавируса, вируса инфекционного ринотрахеита, вируса вирусной диареи и вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота).

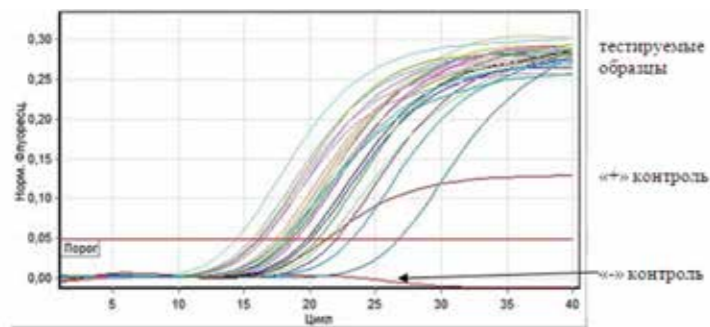


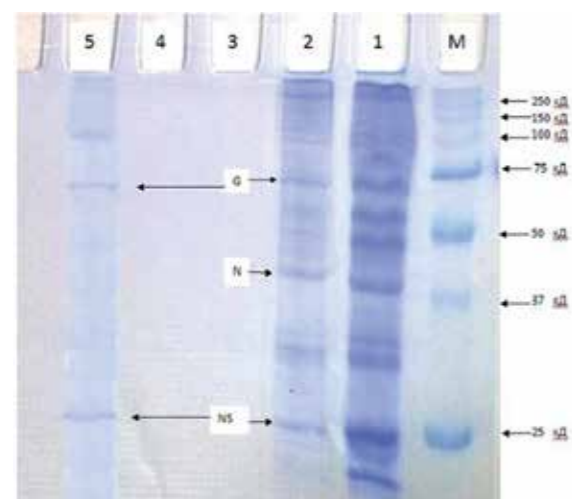
Рис. 2. Результаты выявления генома вируса болезни Шмалленберга в ПЦР-РВ

Конъюгат антивидовых антител, меченых пероксидазой хрена. Использовали коммерческий антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG морской свинки (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва).

Постановка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Рабочее разведение компонентов определяли в предварительных опытах путем постановки непрямого и прямого вариантов ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки). Реакцию ставили методом последовательных разведений, начиная с разведения 1:2, внося по 50 мкл соответствующих разведений антигена в лунки полистиролового планшета (Nunc, Maxi Sorp, Дания) с предварительно адсорбированными в них улавливающими антителами. Далее связавшийся антиген выявляли с помощью детекторных антител. Все компоненты реакции добавляли в объеме 50 мкл, инкубировали при температуре 37°C. Для иммобилизации улавливающих антител использовали 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер (рН 9,5–9,6). Тестируемые и контрольные пробы, детекторные антитела, антивидовой конъюгат разводили в 1 М трис-НСl с 0,15 М NaCl буферном растворе, содержащем 0,05% Твин-20 и 0,1% сухого молока. Этот же буфер, но без добавления сухого молока, применяли для межэтапных промывок. В качестве субстрата использовали го-

Рис. 3. Результаты электрофореза

M — белковый маркер;
1, 2, 5 — препараты очищенного и концентрированного культурального вируса;
3, 4 — препараты ×100 концентрата нормальной культуры ПС и ВНК-21.



товый раствор АВТС (SIGMA). Реакцию останавливали добавлением 1% раствора додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм на ИФА-ридере Sunrise (Tecan, Австрия).

Титром антигена в испытуемом образце считали его последнее разведение, в котором величина оптической плотности (ОП) двукратно превышала ОП отрицательного контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность очищенных препаратов антигена вируса болезни Шмалленберга подтверждали методом ПЦР-РВ (рис. 2) [3].

Все тестируемые в ПЦР-РВ образцы антигенов вируса имели пороговое значение (СТ) меньше 35 и были в диапазоне от 17 до 23 СТ, что свидетельствует о высоком содержании вируса в препаратах.

Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) [2].

На электрофореграмме вирусных белков выявлены полосы, соответствующие фракциям белков вируса болезни Шмалленберга: G — 70 кД, N — 42 кД, NS — 26 кД, которые кодируются средней (M) и малой (S) молекулами РНК соответственно (рис. 3).

Концентрация белка в препаратах антигена вируса болезни Шмалленберга, полученная по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (10, 5, 2,5 и 1,25 мкг белка) при длине волны 595 нм, составила 0,25–0,5 мг/мл.

Очищенный и концентрированный вирусный антиген был использован для получения специфических компонентов: гипериммунных сывороток кролика и морской свинки, используемых в качестве улавливающих и детекторных антител в ИФА. Титр антител сывороток в непрямом варианте ИФА составил 1:28000 и 1:16000 соответственно.

Разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА включала в себя выбор оптимального разведения улавливающих антител, определенного путем постановки непрямого варианта ИФА, которое составило 1:7000, а также детекторных антител и антивидового конъюгата, определенных в прямом варианте ИФА, в разведении 1:4000 и 1:1500 соответственно.

С использованием разработанной методики проведено исследование 50 образцов исходных культуральных антигенов ВБШ, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были протестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в к/кл ПС. Результаты частично представлены в таблице.

Из результатов, представленных в таблице, следует, что разработанная тест-система ИФА позволяла выявлять антиген вируса болезни Шмалленберга с титром инфекционной активности в диапазоне от 2,5 до 5,5 лг ТЦД₅₀/см³, что соответствует титру (разведению) в ИФА от 1:16 до 1:512.

При определении специфичности реакции с различными гетерологичными антигенами (ротавируса, вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота) было показано, что активность улавливающих антител к вирусу болезни Шмалленберга с гетерологичными антигенами не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной неинфицированной культурой клеток).

Таблица

Результаты выявления антигена вируса болезни Шмалленберга в вирусосодержащих препаратах

№ пробы	Характеристика исследуемого материала	Титр вируса (лг ТЦД ₅₀ /см ³)	ПЦР (результат)	Непрямой* «сэндвич»-вариант ИФА	
				титр	результат
1	Вирусосодержащая суспензия (ВБШ, 5 пас., к/кл ПС)	3,8	пол.	1:64	пол.
2	Вирусосодержащая суспензия (ВБШ, 3 пас., к/кл ПС)	4,0	пол.	1:128	пол.
3	Проба №3	3,0	пол.	1:32	пол.
4	Проба №4	2,5	пол.	1:16	пол.
5	Проба №5	отр.	пол.	<1:4	отр.
6	Концентрат антигена ВБШ (×100)	5,5	пол.	>1:512	пол.
7	Элюат №1	3,3	пол.	1:16	пол.
8	Элюат №2	3,0	пол.	1:16	пол.
9	Концентрат элюата №1 (×100)	4,5	пол.	1:128	пол.
10	Отрицательный контроль (культуральная жидкость нормальной неинфицированной ПС)	отр.	отр.	<1:4	отр.
11	Положительный контроль (вирусосодержащая суспензия ВБШ, 3 пас., к/кл ПС)	3,5	пол.	1:64	пол.
12	Антиген ротавируса КРС	отр.	отр.	<1:4	отр.
13	Антиген вируса инфекционного ринотрахеита КРС	отр.	отр.	<1:4	отр.

*пол. — положительно, «отр.» — отрицательно;

* результат ИФА в титрах: >1:8 — положительно, <1:4 — отрицательно;

пробы № 3–5 — надосадочная жидкость, полученная при очистке и концентрировании культуральной жидкости, содержащей вирус, в ходе центрифугирования при 4800, 45000 и 106000 g соответственно; пробы № 6–9 — антигенсодержащие суспензии (элюаты), полученные при очистке и концентрировании вирусосодержащей культуральной жидкости; пробы №10–12 — гетерологичные антигены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены специфические компоненты к вирусу болезни Шмалленберга, которые использовались для разработки непрямого «сэндвич»-варианта ИФА с целью контроля содержания вируса при культивировании и при производстве диагностических тест-систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина / А.В. Спрыгин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, В.А. Мищенко // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 6. — С. 24–34.
2. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.

3. Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization / A. Ariza, S.J. Tanner, C.T. Walter [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2013. — Vol. 41. — P. 5912–5926.

4. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns / S. Bilk, C. Schulze, M. Fischer, M. Beer // Vet. Microbiol. — 2012. — Vol. 159. — P. 236–238.

5. Zhang Y., Wu S., Wang J. Expression and purification of the nucleocapsid protein of Schmallenberg virus, and preparation and characterization of a monoclonal antibody against this protein // Protein Exp. Purific. — 2013. — Vol. 92. — P. 1–8.