

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КОНКУРЕНТНОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К РОТАВИРУСУ ГРУППЫ А В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

О. П. Бьядовская¹, Е. А. Бухон², А. А. Нестеров³

¹ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

² Ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: budoragina@arriah.ru

³ Научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nesterov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе конкурентного варианта иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител к ротавирусу группы А в сыворотках крови, полученных от разных видов сельскохозяйственных животных (КРС, свиньи). В качестве антигена для ИФА был выбран штамм TE87 серогруппы А ротавируса КРС, адаптированный к перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) с титром инфекционной активности 7,0–7,5 lg TCID₅₀/см³, обладающий группоспецифичностью и наиболее технологичный для наработки производственного антигена. Специфичность полученных компонентов – ротавирусного антигена и гипериммунной сыворотки кролика – подтверждали методом ПЦР-РВ и иммуноблота. Разработка тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА включала в себя выбор оптимального состава блокирующего буфера, разведения антигена, специфической гипериммунной сыворотки и антивидового конъюгата. Определены допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток, установлены значения позитивно-негативного порога реакции. Оценку специфичности и чувствительности метода относительно коммерческого набора Ingelasa (Испания) проводили при параллельном тестировании 203 проб сыворотки крови КРС. В результате проведенных исследований разработан чувствительный (92%) и специфичный (94%) конкурентный вариант ИФА, позволяющий с точностью 92,6% выявлять антитела к ротавирусу группы А в сыворотках крови КРС и свиней. С использованием разработанной тест-системы проведено исследование 2259 образцов сывороток крови КРС и свиней, поступивших в 2016–2017 гг. из 48 хозяйств различных регионов Российской Федерации. Средний процент серопозитивных к ротавирусу группы А животных у КРС составил 42%, а у свиней – 84%.

Ключевые слова: ротавирус, культура клеток, иммуноферментный анализ, сыворотки крови, крупный рогатый скот, свиньи.

UDC 619:616.98:578.823.91:616-078:616-097

DEVELOPMENT AND USE OF THE COMPETITIVE ELISA-BASED TEST SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO GROUP A ROTAVIRUS IN LIVESTOCK SERA

O. P. Bjadovskaya¹, Ye. A. Bukhon², A. A. Nesterov³

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

² Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: budoragina@arriah.ru

³ Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: nesterov@arriah.ru

SUMMARY

Test-system based on competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to Group A rotavirus in sera collected from livestock of various species (cattle, pigs) was developed. Bovine rotavirus TE87 strain of serogroup A adapted to continuous porcine embryo kidney cell culture was selected as an antigen for ELISA. The said strain has the infectivity titre of 7.0–7.5 lg TCID₅₀/cm³. It is group-specific and the most technologically suitable for production antigen scaling-up. Specificity of prepared components, rotavirus antigen and hyperimmune rabbit serum, was confirmed by real-time PCR and immunoblotting. The development of competitive ELISA-based test-system included selection of optimal blocking buffer composition as well as optimal antigen dilution, specific hyperimmune serum and anti-species conjugate. Admissible optical density values of control sera and cut-off values were determined. The test-system was examined for its specificity and sensitivity as compared to those ones of INGENASA test-kit (Spain) by parallel testing of 203 cattle sera. Performed studies resulted in the development of sensitive (92%) and specific (94%) competitive ELISA enabling detection of antibodies against Group A rotavirus in cattle and porcine sera with 92.6% accuracy. A total of 2,259 cattle and porcine sera submitted from 48 farms located in various Russian Federation regions in 2016–2017 were tested with the developed test-system. Average proportion of Group A rotavirus-positive cattle and pigs was 42% and 84%, respectively.

Key words: rotavirus, cell culture, enzyme-linked immunosorbent assay, sera, livestock, pigs.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее часто выявляемым этиологическим агентом острых гастроэнтеритов молодняка крупного рогатого скота (КРС) является ротавирус, который относится к семейству *Reoviridae*, роду *Rotavirus*. Ущерб, причиняемый ротавирусами, состоит из отставания в росте и гибели молодняка и особенно ощутим в животноводческих хозяйствах промышленного типа. Результаты проведенных ранее исследований свидетельствуют о широком распространении данной инфекции в хозяйствах РФ [2, 6, 7]. Высокий уровень заболеваемости обусловлен периодической сменой доминирующих G[P]-типов ротавируса группы А, генетическим и антигенным разнообразием циркулирующих штаммов [11, 13, 14].

Важным условием успешной борьбы с инфекцией является своевременная диагностика заболевания с применением различных диагностических методов, поскольку этиология возбудителей разнообразна, а клиническая картина относительно одинакова [5].

Для серологической диагностики в последнее время широко применяют иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность, специфичность и экспрессность. Именно конкурентный вариант ИФА (К-ИФА) требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и позволяет одновременно тестировать сыворотки крови от разных видов сельскохозяйственных животных [4, 10, 15].

Целью данной работы стала разработка тест-системы на основе К-ИФА для выявления антител к ротавирусу группы А в сыворотках крови КРС и свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В работе использовали культуральный диагностический антиген ротавируса группы А, серотип G8P7, штамм TE87 (Коллекция штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»), адаптированный к перевиваемой культуре клеток эмбриона свиньи (СПЭВ), с титром инфекционной активности $7,0-7,5 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$.

Специфическая гипериммунная сыворотка. Использовали специфическую гипериммунную поликлональную сыворотку кролика, полученную в результате 3-кратной иммунизации с интервалом 10 и 21 сут эмульгированным предварительно очищенным и концентрированным антигеном с добавлением стерильного масляного адъюванта Montanide ISA 70. Иммунизацию кроликов проводили введением антигена подкожно в область спины в объеме $1,0 \text{ cm}^3$. Животных обескровливали на 40–41 сут после первой иммунизации.

Антивидовой конъюгат. В качестве антивидового конъюгата использовали иммуноглобулины против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma).

Исследуемые препараты. Сыворотки крови КРС, свиней, поступившие из различных хозяйств Российской Федерации. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали референтные сыворотки коммерческого набора Ingenasa (Испания).

Методы. В работе использовали общепринятые методы культивирования ротавируса КРС, определения титра инфекционности ротавируса КРС, постановки реакции микронейтрализации для определения титра вируснейтрализующих антител, получения антигена (низкоскоростным центрифугированием), электрофорез и иммуноблот для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса, метод Бредфорда для измерения концентрации белка [3], полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [8, 9, 12]. Постановку ИФА проводили с использованием разработанной ФГБУ «ВНИИЗЖ» тест-системы К-ИФА, а также коммерческих наборов INgezim Rotavirus Bovino и INgezim Rotavirus Porcino (Ingenasa, Испания) согласно инструкции к набору.

Статистическая обработка и анализ полученных данных произведены с использованием методов, описанных Ашмариним И. П. и соавт. [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

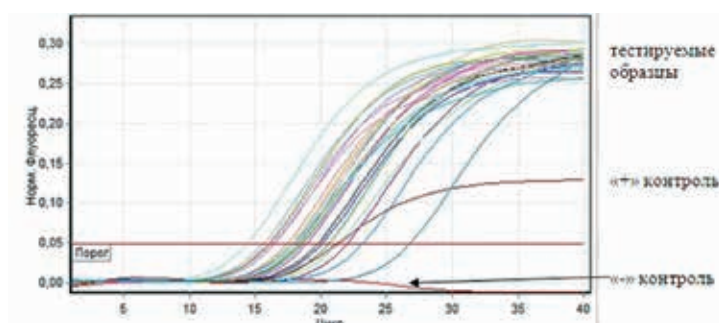
Одним из важных этапов при разработке ИФА является получение активного и специфического антигена. Для этого в культуре клеток СПЭВ выделили и адаптировали 9 полевых изолятов ротавируса КРС, циркулирующих на территории РФ. После сравнения биологических и молекулярно-генетических свойств изолятов и штаммов ротавируса КРС, находящихся в Коллекции штаммов микроорганизмов (КШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ», в качестве антигена для разработки диагностической тест-системы был выбран штамм TE87 серогруппы А ротавируса КРС, обладающий достаточной инфекционной активностью ($7,0-7,5 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$), группоспецифичностью и наиболее технологичный для наработки производственного антигена. Специфичность очищенных препаратов антигена ротавируса группы А штамм TE87 подтверждали методом ПЦР-РВ (рис. 1).

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

Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (Laemmli, 1970 г.). Специфичность полученных компонентов – ротавирусного антигена и гипериммунной сыворотки кролика – подтверждали методом иммуноблота [3]. Для проведения исследований использовали специфические сыворотки крови кролика, полученные на разные штаммы и изоляты ротавируса группы А, а именно: TE87, Nebraska, «Юрьево-Поле/03/2000» (рис. 2).

Как видно из представленных на рисунке 2 данных, гипериммунные сыворотки кролика (2, 3, 4), полученные на различные штаммы ротавируса группы А, в отличие от нормальной сыворотки крови кролика (1), имели одну специфическую область связывания, которая соответствовала белку VP6 (мол. масса 44 кДа). Таким образом, было подтверждено, что сыворотка

Рис. 1. Результаты выявления генома ротавируса КРС в ПЦР-РВ



крови кролика, полученная на диагностический штамм TE87, обладает межштаммовой группоспецифичностью и ее можно применять в качестве конкурентных антител при постановке К-ИФА.

Концентрация белка в препаратах антигена ротавируса, полученная по методу Бредфорда [3] с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (10; 5; 2,5 и 1,25 мкг белка) при длине волны 595 нм, составила 0,5–1,0 мг/мл. Полученный очищенный и концентрированный ротавирусный антиген был использован для разработки тест-системы на основе К-ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Разработка тест-системы на основе К-ИФА включала в себя выбор оптимального разведения антигена, специфической гипериммунной сыворотки и антивицевого конъюгата, определенных в непрямом варианте ИФА. Учет результатов реакции производился с применением спектрофотометра Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм. Разработка тест-системы предполагает подбор наиболее подходящих буферных систем, блокирующих растворов, а также определение времени адсорбции компонентов реакции и температурного режима. Таким образом, были оптимизированы следующие параметры постановки ИФА: время адсорбции антигена – 18 ч при 4 °С; в качестве блокирующего буфера выбран 1% раствор бычьего сывороточного альбумина, рабочее разведение антигена для сенсбилизации планшета – 1:200; оптимальное разведение конъюгата составило 1:2000; оптимальное разведение специфической сыворотки – 1:4000.

Важным этапом разработки тест-системы является получение достоверных ($p < 0,5$) результатов. Для этого были определены допустимые значения оптической плотности (ОП) контрольных сывороток, которые для отрицательного контроля должны быть не ниже 0,982, для положительного контроля – не выше 0,321, минимальная разница ОП положительного и отрицательно-го контролей – не меньше $0,661 \pm 0,122$.

Следующим аспектом разработки является определение пороговых значений результатов, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специфическую (положительную) реакции. Путем расчета получили среднее значение отношения ОП пробы к отрицательному контролю (S/N), которое для отрицательных сывороток составило 0,799, и стандартное отклонение 0,075; нижняя граница отрицательных значений равна 0,65, а верхняя граница положительных значений – 0,57. Согласно полученным данным, большинство отрицательных сывороток ($n = 204$) имело значение S/N в диапазоне от 0,60 до 0,80, а основная часть положительных сывороток ($n = 260$) – от 0,20 до 0,4 (рис. 3). Таким образом, установленный позитивно-негативный порог реакции подтвердил правильность определенных ранее пороговых значений и позволил проводить оценку результатов при тестировании сывороток в разработанном К-ИФА.

Дальнейшим этапом работы стала оценка относительной чувствительности и специфичности разработанной тест-системы в сравнении с коммерческим набором Ingenasa (Испания). При параллельном тестировании с использованием обеих тест-систем исследовали 203 сыворотки крови КРС с разным уровнем антител к ротавирусу (таблица). Полученные данные позволили рассчитать относительную чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной



Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга антигена штамма TE87 со специфическими сыворотками кролика, полученными на разные штаммы ротавируса

1 – нормальная сыворотка крови кролика;
2, 3, 4 – специфические сыворотки кролика на штаммы и изоляты TE87, Nebraska, «Юрьево-Поле/03/2000».

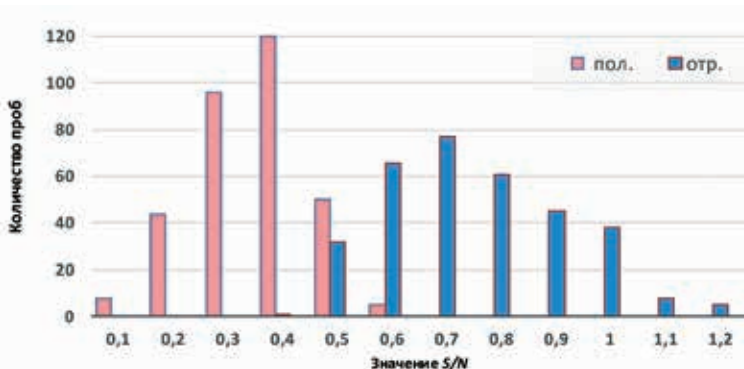


Рис. 3. Распределение исследованных проб сывороток по значению S/N

тест-системы по сравнению с коммерческим набором. В результате проведенных исследований разработан чувствительный (92%) и специфичный (94%) конкурентный вариант ИФА, позволяющий с точностью 92,6% выявлять антитела к ротавирусу группы А в сыворотках крови КРС и свиней.

С использованием разработанной методики проведено исследование 2259 образцов сывороток крови КРС и свиней, поступивших в 2016–2017 гг. из 48 хозяйств различных регионов РФ. Средний процент се-

Таблица
Оценка относительной чувствительности и специфичности тест-системы К-ИФА

Ingenasa	К-ИФА, ФГБУ «ВНИИЗЖ»		
	Положительные	Отрицательные	Всего
Положительные пробы	141/a	3/b	144 (a + b)
Отрицательные пробы	12/c	47/d	59 (d + c)
Всего проб	153 (a + c)	50 (d + b)	n = 203

a – истинно положительные результаты; b – истинно отрицательные результаты;
c – ложноотрицательные результаты; d – ложноположительные результаты.

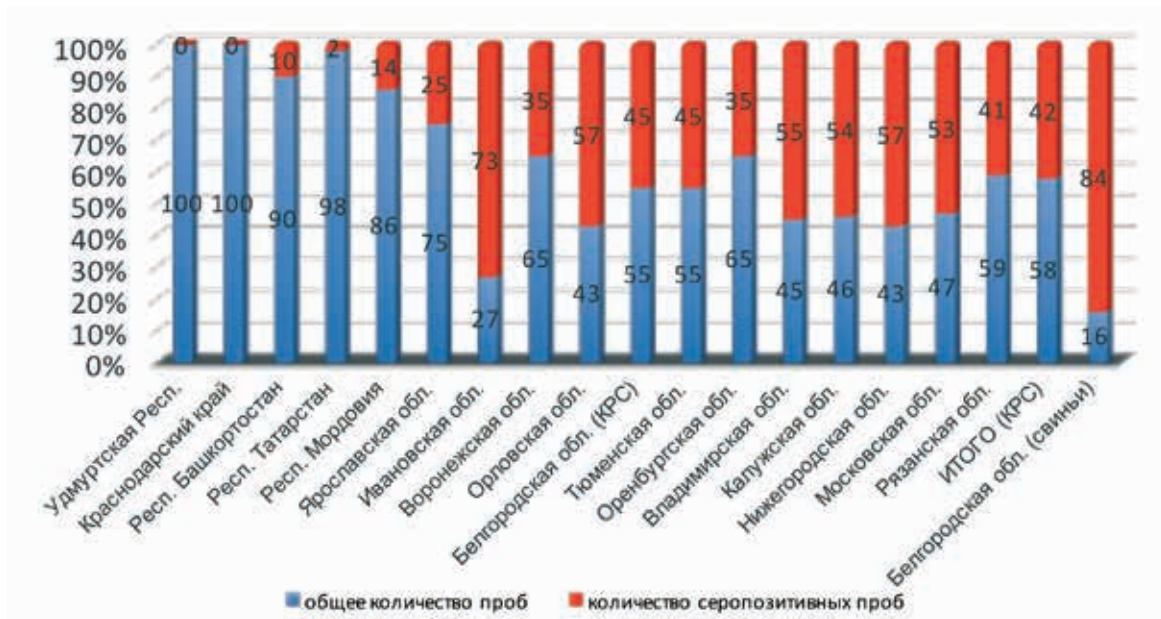


Рис. 5. Распределение выявленных серопозитивных животных по регионам РФ

ропозитивных к ротавирусу группы А животных у КРС составил 42%, а у свиней – 84%. Проведенный серологический мониторинг показал наличие у сельскохозяйственных животных достаточно высокого уровня специфических антител к ротавирусу группы А (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана иммуноферментная тест-система для определения специфических антител к ротавирусу группы А в сыворотках крови КРС и свиней. При этом получены специфические компоненты реакции, установлены величины пороговых показателей, проведена сравнительная оценка результатов исследований сывороток крови КРС и свиней с использованием разработанной иммуноферментной тест-системы и коммерческого набора зарубежного производства. Разработанная тест-система на основе конкурентного варианта ИФА позволяет выявлять антитела к ротавирусу группы А в сыворотках крови от разных видов сельскохозяйственных животных и может быть использована для проведения скрининговых серологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – 76 с.
2. Вирусные гастроэнтериты смешанной этиологии и их профилактика / А. И. Собко, Ф. С. Вабишевич, В. Н. Ткацкая [и др.] // Вопросы вет. вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: материалы науч. конф. – Покров, 1992. – Ч. 1. – С. 154–155.
3. Львов Д. К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 520–522.
4. Мникова Л. А., Гоголев М. М., Ишкова Т. А. Иммуноферментная тест-система для идентификации рота- и коронавирусного антигена, антигена диареи крупного рогатого скота // С.-х. биология. – 2000. – № 6. – С. 117–119.

5. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Ротавирусы. Вирусы и вирусные инфекции. – М.: Библионика, 2007. – С. 365–369.

6. Agrawal D. K., Singh N. P., Chauhan R. S. Colostral antibodies against rotavirus infection in neonatal calves // J. Immunol. Immunopathol. – 2002. – Vol. 4. – P. 107–109.

7. Almeida J. D., Craig C. R., Hall T. E. Multiple viruses present in the faeces of a scouring calf // Vet. Rec. – 1978. – Vol. 102, No. 8. – P. 170–171.

8. Beards G. M. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups // Arch. Virol. – 1982. – Vol. 74, No. 1 – P. 65–70.

9. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells / S. E. Crawford, M. Labbé, J. Cohen [et al.] // J. Virol. – 1994. – Vol. 68, No. 9. – P. 5945–5952.

10. Development, characterization, and diagnostic applications of monoclonal antibodies against bovine rotavirus / Y. Al-Yousif, F. Al-Majhdi, C. Chard-Bergstrom [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2000. – Vol. 7, No. 2. – P. 288–292.

11. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10, P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India / B. R. Gulati, R. Deepa, B. K. Singh [et al.] // J. Clinical Microbiol. – 2007. – Vol. 45, No. 3. – P. 972–978.

12. Estes M. K. Rotaviruses and their replication // Fields Virology / ed. D. M. Knipe, P. M. Howley [et al.]. – 4th ed. – Philadelphia, 2001. – P. 1747–1785.

13. Group A rotavirus in calves in Minas Gerais State, Brazil / E. F. Barbosa, H. C. P. Figueiredo, A. M. Garcia [et al.] // Ciencia Rural. – 1998. – Vol. 28. – P. 435–439.

14. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio / A. Lucchelli [et al.] // Am. J. Vet. Res. – 1992. – Vol. 53, No. 2. – P. 169–174.

15. Tsunemitsu H., Jiang B., Saif L. J. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30, No. 8. – P. 2129–2134.