УДК 619:616.98:578.835.2:616-078

DOI 10.29326/2304-196X-2018-3-26-13-16

НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

А. С. Яковлева[1], А. В. Каньшина[2], А. В. Щербаков[3]

[1] Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: yakovleva_as@arriah.ru*

[2] Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: kanshina@arriah.ru*

[3] Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: ascherbakov@arriah.ru*

РЕЗЮМЕ

Разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа, предназначенный для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней. В процессе валидации показано, что разработанный метод отличается высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью. При тестировании панели сывороток крови, полученных от экспериментально зараженных животных, метод позволил обнаружить антитела к вирусу ящура в 7 из 18 сывороток, отобранных на 6-й день после инфицирования, в 13 из 19 – на 7-й день после инфицирования, в 16 из 19 – на 8-й день после инфицирования и во всех 76 сыворотках, отобранных на 9–12-й день после инфицирования. Диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА составила 100% при тестировании 100 заведомо отрицательных сывороток крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии. Высокая специфичность и чувствительность метода, установленные на этапе разработки метода, подтверждены при проведении рутинных диагностических исследований.

Ключевые слова: вирус ящура, неструктурные белки, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая домашних и диких парнокопытных животных, в том числе и свиней. Заболевание относится к категории трансграничных болезней, способных вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae.* Различают семь серотипов вируса: O, A, C, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов вируса.

В России ящур неэндемичен, однако существует постоянная угроза заноса болезни из соседних азиатских стран, прежде всего из Китая. В связи с этим в Российской Федерации применяется стратегия профилактики и борьбы с ящуром, которая предполагает недопущение возникновения и распространения болезни на территории страны. В регионах с высокой степенью риска заноса и распространения инфекции создана буферная зона, в которой крупный и мелкий рогатый скот вакцинируется против ящура. Для выявления инфицированных животных среди вакцинированного поголовья применяются методы, позволяющие обнаруживать в крови животных антитела к неструктурным белкам вируса ящура. Такие антитела выявляются у инфицированных животных и не обнаруживаются у вакцинированных при условии применения очищенных вакцин, соответствующих требованиям Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [5, 6].

Ранее в ФГБУ «ВНИИЗЖ» был разработан и валидирован непрямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота [2]. Этот метод (ЗАВ-ИФА) уже несколько лет успешно применяется в диагностических и мониторинговых исследованиях.

В 2017 г. вступили в силу правила по регионализации территории РФ по ящуру. В соответствии с этими правилами животные могут перемещаться из зоны, где проводится вакцинация против ящура, в регионы без вакцинации только при условии отсутствия в их крови постинфекционных антител к вирусу ящура. Таким образом, при коммерческих операциях, связанных с перемещениями животных, обязательной стала проверка их инфекционного статуса на ящур [4].

Поскольку это правило распространяется и на свиней, в свиноводческих хозяйствах, оказавшихся в зоне с вакцинацией, стал востребованным тест, позволяющий исследовать сыворотки крови животных на наличие антител к вирусу ящура.

Таблица 1
Влияние состава блокирующего буфера на средние показатели оптической плотности контрольных сывороток
n = 4

Блокирующий раствор	Показатели на антигенном ряду			Показатели на безантигенном ряду	
	ОП KS+	ОП KS-	S/N	ОП KS+	ОП KS-
Раствор молока:					
1%	1,19 ± 0,09	0,21 ± 0,01	5,63 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
3%	1,09 ± 0,08	0,16 ± 0,01	**6,90 ± 0,07**	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
10%	1,00 ± 0,08	0,15 ± 0,01	**6,55 ± 0,06**	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
БСА:					
1%	1,42 ± 0,09	0,35 ± 0,01	4,04 ± 0,08	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
3%	1,31 ± 0,05	0,38 ± 0,02	3,44 ± 0,06	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
10%	1,29 ± 0,09	0,34 ± 0.01	3,79 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Сыворотка лошадиная нормальная:					
1%	0,98 ± 0,08	0,24 ± 0,01	4,14 ± 0,08	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
3%	1,22 ± 0,04	0,29 ± 0,01	4,17 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
10%	0,96 ± 0,05	0,19 ± 0,01	5,00 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01

Цель работы – разработка и валидация ЗАВ-ИФА, предназначенного для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В качестве антигена использовали рекомбинантный белок ЗАВ, полученный экспрессией в *E. coli*. Условия экспрессии и очистки описаны ранее [3].

Сыворотки крови животных. В качестве положительного контроля использовали референтную сыворотку крови свиньи, экспериментально зараженной вирусом ящура типа А, в качестве отрицательного контроля – сыворотку крови свиньи, не имеющей антител к вирусу ящура. Данные сыворотки были проверены на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура методом ИФА с использованием коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

Для установления рабочего разведения сывороток, позитивно-негативного порога, диагностической чувствительности и специфичности реакции использовали сыворотки крови от свиней с известным инфекционным статусом. В качестве заведомо положительных проб были использованы 132 сыворотки крови свиней, экспериментально зараженных вирусом ящура, отобранные на 6–12-е сутки после инфицирования. Данные пробы были предоставлены сотрудниками референтной лаборатории диагностики ящура. В качестве заведомо отрицательных проб использовали сыворотки крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии.

Конъюгат антивидовых антител. В работе использовали коммерческий пероксидазный конъюгат антител к иммуноглобулинам G свиней (Sigma).

Иммуноферментный анализ. Разработка ЗАВ-ИФА являлась предметом исследований и описана в разделе «Результаты и обсуждение». ИФА с использованием коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария) проводили в соответствии с инструкцией к набору.

Статистическую обработку результатов ИФА проводили согласно рекомендациям МЭБ [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация реагентов и протокола реакции. Были установлены рабочие разведения антигена и антивидового конъюгата, оптимальный состав блокирующего раствора, температурно-временной режим для каждого этапа ИФА, допустимые значения оптической плотности (ОП) контрольных сывороток.

Рабочее разведение антигена и антивидового конъюгата определяли шахматным титрованием с использованием положительной и отрицательной сывороток. За рабочее разведение антигена и конъюгата принимали значение, при котором ОП положительной контрольной сыворотки находилась в пределах 1,0–1,1, отрицательной контрольной сыворотки – в пределах 0,08–0,19. Рабочее разведение антигена составило 2 мкг/мл, рабочее разведение конъюгата анти-IgG свиней составило 1:20 000.

При выборе блокирующего раствора проверяли 1%-е, 3%-е и 10%-е обезжиренное молоко и 10%-ю лошадиную сыворотку на основе буфера ТБС, содержащего 0,01% Твина-20. Выяснили, что использование 3%-го и 10%-го обезжиренного молока в блокирующем буфере и для разведения образцов является наиболее оптимальным (табл. 1).

Для определения оптимального рабочего разведения сывороток тестировали 47 сывороток крови свиней с различным уровнем антител методом последовательных разведений в четырех различных разведениях: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Для каждого разведения сывороток определяли величину (S/P) по формуле

$$S/P = (ОП - NC_x)/(PC_x - NC_x),$$

где ОП – средняя оптическая плотность исследуемой сыворотки;
NC_x – средняя оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки;
PC_x – средняя оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Затем рассчитывали lg S/P и lg T для каждого разведения. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica. В результате были определены коэффициенты корреляции (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, наибольший коэффициент корреляции R = 0,87 при наименьшей стандартной ошибке 0,66646 получили при разведении сывороток 1:80. Поэтому данное разведение было выбрано в качестве рабочего.

Уравнение линейной регрессии для разведения сывороток 1:80 имело вид:

$$\lg T = 2{,}9941 + 1{,}3653 \times \lg S/P,$$

где 2,9941 и 1,3653 – коэффициенты A и B соответственно.

На рисунке представлен график зависимости lg S/P от lg T для рабочего разведения сывороток 1:80.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема постановки ЗАВ-ИФА. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рекомбинантного белка в рабочем разведении в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) и инкубировали 16–18 ч при 4 °С. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл блокирующего раствора (ФБР, 10%-е обезжиренное молоко, pH 7,4) и инкубировали 1 ч при 37 °С. После отмывания планшетов раствором ФБС-Т тестируемые сыворотки, разведенные 1:80 в блокирующем буфере (ФБР, 3%-е обезжиренное молоко, pH 7,4), вносили в объеме 100 мкл в лунку и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов, вносили конъюгат в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки вносили субстрат ABTS, через 10–15 мин останавливали реакцию добавлением 1%-го раствора додецилсульфата натрия и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

Оценка сходимости результатов реакции. Для оценки сходимости результатов реакции положительную сыворотку крови свиней в рабочем разведении вносили в лунки планшета и после проведения реакции измеряли ОП в каждой лунке. Коэффициент вариации рассчитывали по формуле

$$C = (\delta/\bar{x}) \times 100\%,$$

где δ – среднее квадратичное отклонение;
$\bar{x}$ – среднее арифметическое.

При исследовании положительной сыворотки на одном планшете коэффициент вариации составил 8,6%, что указывает на хорошую сходимость реакции (табл. 3).

Определение аналитической специфичности реакции. Для определения аналитической специфичности исследовали 10 гетерологичных сывороток крови свиней, содержащих антитела против вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вируса классической чумы свиней, цирковируса свиней 2-го типа, вируса болезни Ауески. Активность антигена с гетерологичными сыворотками не превышала фонового уровня, полученного в реакции с неиммунной сывороткой.

Определение позитивно-негативного порога реакции (ПНП). Исследовали 92 заведомо отрицательные сыворотки крови свиней. ПНП определяли, вычисляя средние значения ОП отрицательных сывороток и прибавляя три значения среднего квадратичного отклонения. Среднее значение ОП отрицательных сывороток с утроенным значением среднего квадратичного отклонения составило 0,392. Граница ПНП при исследовании сывороток крови свиней соответствовала процен-

Таблица 2
Значения коэффициента корреляции для различных разведений сывороток

Разведение	Коэффициент корреляции
1:20	0,80186
1:40	0,82486
1:80	0,87514
1:160	0,81618

ту позитивности (ПП), равному 30. Сыворотки свиней с ПП < 30% считались отрицательными, с ПП ≥ 30% – положительными.

Определение диагностической специфичности реакции. Диагностическую специфичность ЗАВ-ИФА определяли путем тестирования 100 заведомо отрицательных сывороток крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии. При этом не было получено ни одного ложноположительного результата. Таким образом, на данной панели сывороток специфичность реакции составляла 100%.

Определение диагностической чувствительности реакции. Для оценки диагностической чувствительности ЗАВ-ИФА использовали сыворотки крови свиней, экспериментально инфицированных вирусом ящура: 4 головы были заражены вирусом типа А, 11 – типа О, 4 – типа Азия-1. Кровь отбиралась до заражения, а также с 6-го по 12-й день после инфицирования (ДПИ).

Все сыворотки, отобранные до заражения, были серонегативными в ЗАВ-ИФА. Антитела к вирусу ящура были обнаружены в 7 из 18 сывороток на 6-й ДПИ, в 13 из 19 – на 7-й ДПИ, в 16 из 19 – на 8-й ДПИ и во всех 76 сыворотках, отобранных на 9–12-й ДПИ (табл. 4).

Сыворотки, отобранные на 6–8-й ДПИ, были включены в панель для оценки способности метода выявлять антитела на ранних сроках после заражения как косвенного показателя аналитической чувствительности. При определении диагностической чувствительности

График зависимости lg титра антител в ИФА от lg S/P, определенного в рабочем разведении сывороток 1:80

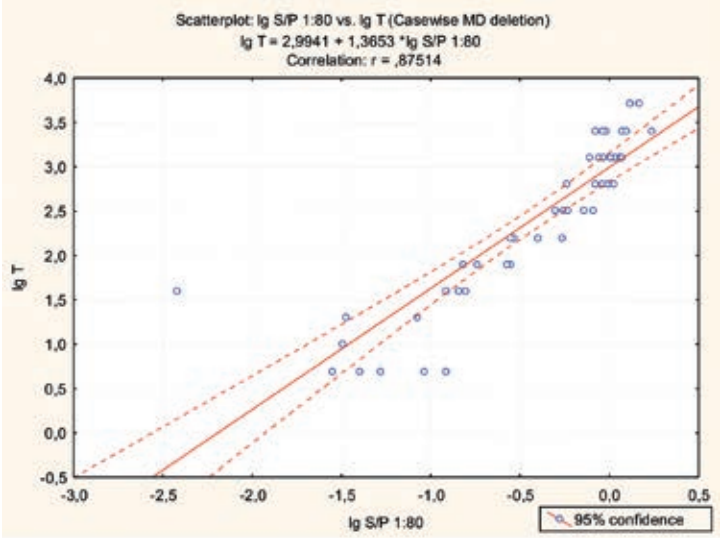

Таблица 3
Оценка сходимости ЗАВ-ИФА

Характеристика сыворотки	Минимальное значение ОП (x_{min})	Максимальное значение ОП (x_{max})	Среднее значение ОП ($\bar{x}$)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент вариации (c), %
Положительная сыворотка	0,881	1,239	1,019	0,088	8,6

Таблица 4
Результаты исследований в ЗАВ-ИФА сывороток крови свиней, экспериментально зараженных вирусом ящура

Дни после инфицирования	Результаты ЗАВ-ИФА (положительных/исследовано)			
	тип А	тип О	тип Азия-1	Всего
0	0/4	0/11	0/4	0/19
6	2/4	4/10	1/4	7/18
7	3/4	6/11	4/4	13/19
8	4/4	8/11	4/4	16/19
9	4/4	11/11	4/4	19/19
10	4/4	11/11	4/4	19/19
11	4/4	11/11	4/4	19/19
12	4/4	11/11	4/4	19/19

такие «ранние» сыворотки не учитываются. Поскольку все сыворотки, отобранные на 9–12-й ДПИ, показали в ЗАВ-ИФА положительный результат, можно утверждать, что диагностическая чувствительность метода в условиях экспериментального заражения свиней составляет 100%.

Оценка реакции при проведении рутинных диагностических исследований. Согласно международным требованиям валидация диагностического метода не должна ограничиваться серией экспериментов, оценка метода проводится все время, пока он применяется в исследованиях.

В 2014–2017 гг. ЗАВ-ИФА применялась для исследований полевых сывороток крови свиней, полученных из хозяйств РФ. При проведении этих исследований применялась та же схема, что и при исследовании сывороток крови от КРС и МРС [2]. Сначала пробы исследовали методом ЗАВ-ИФА, служившим скрининговой тест-системой. Затем все сыворотки, показавшие положительный результат, дополнительно тестировали в подтверждающей тест-системе PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

В 2014 г. в Приморском крае РФ было зарегистрировано несколько вспышек ящура типа О у свиней [1]. Для подтверждения диагноза на ящур из одного хозяйства в ФГБУ «ВНИИЗЖ» помимо афтозного материала поступили сыворотки крови свиней. С помощью ЗАВ-ИФА в пробах обнаружены антитела к неструктурным белкам вируса ящура, в подтверждающей тест-системе эти пробы также были положительными. Таким образом, серологические методы подтвердили факт переболевания ящуром свиней в данном хозяйстве.

В период с 2015 по 2017 г. на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура было исследовано 4833 сыворотки крови свиней из различных регионов РФ, благополучных по ящуру. В ЗАВ-ИФА 4802 пробы показали отрицательный результат, а 31 проба – положительный результат. При перепроверке в тест-системе PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария) положительные результаты не подтвердились и, следовательно, были интерпретированы как ложные. Таким образом, при проведении рутинных исследований диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА составляла 99,4%. Этот показатель близок к значению диагностической специфичности, установленному на этапе разработки метода (100%).

Таким образом, в процессе рутинных диагностических исследований подтвердились характеристики ЗАВ-ИФА (высокая чувствительность и специфичность), установленные на этапе разработки метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней разработана тест-система ЗАВ-ИФА. Валидация показала, что ЗАВ-ИФА способна с высокой специфичностью и чувствительностью выявлять антитела к вирусу ящура в сыворотке крови инфицированных животных. Результаты рутинных диагностических исследований подтвердили высокую специфичность и чувствительность ЗАВ-ИФА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мищенко А. В., Мищенко В. А., Караулов А. К. Ящур свиней в Приморском крае // Ветеринария. – 2015. – № 8. – С. 15–17.

2. Разработка и валидация тест-системы ЗАВ-ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота / А. С. Яковлева, А. В. Каньшина, А. В. Щербаков, Е. С. Орлова // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 4 (15). – С. 36–42.

3. Рекомбинантные неструктурные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота / А. С. Яковлева, А. В. Щербаков, А. В. Каньшина [и др.] // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 165–171.

4. Решение об установлении статусов регионов Российской Федерации по заразным болезням животных и условиях перемещения подконтрольных Госветнадзору товаров. – URL: http://www.fsvps.ru/fsvps/regional (дата обращения: 13.03.18).

5. An overview on ELISA techniques for FMD / L. N. Ma, J. Zhang, H. T. Chen [et al.] // Virol. J. – 2011. – Vol. 8:419. – URL: https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-419 (дата обращения: 13.03.18).

6. Foot-and-mouth disease. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal_health_in_the_world/docs/pdf/disease_cards/foot_and_mouth_disease.pdf (дата обращения: 13.03.18).

7. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases // Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals / OIE. – 2018. – Chap. 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (дата обращения: 15.03.18).

Поступила 20.04.18
Принята в печать 10.08.18