

РОЗРОБКА ІФА ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БЛЮТАНГУ ЖУЙНИХ

Д. Л. Мартиненко, Д. Ю. Рибальченко, Ю. В. Бреус, Д. М. Король, Р. М. Чумак,
С. Д. Мельничук, В. Г. Спиридонов

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Розроблена тест-система «Блютанг-АТ» для непрямого імуноферментного аналізу специфічних антитіл проти вірусу блютанга жуйних із використанням рекомбінантного антигену VP7, одержаного біотехнологічними методами в рослинах тютюну (*Nicotiana tabacum*). Показано, що тест-система «Блютанг-АТ», характеризується високими показниками чутливості, специфічності та відтворюваності. Тест-система «Блютанг-АТ» рекомендована до використання державною ветеринарною службою України для моніторингу та контролю за розповсюдженням блютанга жуйних територією України.

Ключові слова: ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ВІРУС БЛЮТАНГА ЖУЙНИХ, РЕКОМБІНАНТНИЙ АНТИГЕНИ, АНТИТІЛА

Блютанг або катаральна лихоманка овець — вірусне інфекційне захворювання диких та домашніх жуйних, що передається кровосисними комахами роду *Culicoides*. Блютанг вперше описаний в 19 сторіччі у овець в Південній Африці, але протягом 20 сторіччя блютанг широко розповсюдився в країнах тропічних та субтропічних регіонів та займає географічний ареал між широтами 40° на північ та 35° на південь. Але в останні роки, в зв'язку з глобальним потеплінням ареал розповсюдження блютанга розширився на північ (перетнув 50° паралель північної широти) та спалахи на блютанг фіксуються в країнах Східної Європи [1].

У наслідок летального перебігу інфекції міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ) включило блютанг в список А (потенційно небезпечних інфекцій, що мають економічний вплив), це передбачає постійний моніторинг за розповсюдженням інфекції, особливо під час переміщення тварин при міжнародній торгівлі. Раннє виявлення заражених тварин та їхнє видалення, може значно знизити наслідки хвороби за рахунок скорочення вірусного навантаження, а також, за рахунок стримування поширення хвороби через експорт потенційно інфікованих тварин. Останнє, може бути дуже серйозною проблемою, оскільки перебіг інфекції без будь яких проявів клінічних ознак та може тривати до 100 днів [2].

Для моніторингу та контролю за розповсюдженням блютанга використовують серологічні методи діагностики оскільки, вірус специфічні антитіла з'являються вже через 7-14 днів після зараження і, як правило, вони є довготривалі. Основними серологічними методами діагностики блютанга, рекомендованими міжнародним епізоотичним бюро (МЕБ) є реакція імунодифузії в агарі (РІД) та імуноферментний аналіз (ІФА) [3, 4].

Метою нашої роботи було розробити імуноферментний аналіз для серологічної діагностики блютанга із використанням вірус-специфічного антигену VP7 вірусу блютанга, виділеного з трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* та оцінити його діагностичний потенціал при проведенні імуноферментного аналізу з референс зразками інфікованої на блютанг крові овець.

Матеріали і методи

Панель з референсних зразків сироватки та плазми крові овець експериментально інфікованих 6 та 8 серотипами вірусу блютанга (n=19), люб'язно надані Dr. Bernd Hoffmann, Friedrich-Loeffler Institute of Diagnostic Virology (Німеччина). В якості негативних зразків

використовували сироватки крові овець та корів (n=89), отримані від тварин з господарств Київської області.

Рекомбінантний вірус-специфічний антиген VP7 було виділено та охарактеризовано в попередній роботі [5]. Для адсорбції отриманого антигену використовували полістиролові планшети (Sarstedt). Антиген розводили до концентрації 10 мкг/мл у карбонат-бікарбонатному буфері та залишали для сорбції на 12 годин при +4 °С. Після чого відмивали планшети 1 раз фосфатно-сольовим розчином з 0,05 % Твин-20. Досліджувані сироватки вносили у розведенні 1:20 на відповідному буфері та інкубували 60 хв при +37 °С. Після чого відмивали 4 рази фосфатно-сольовим розчином з 0,05 % Твин-20 та вносили імуноферментний кон'югат (білок G-пероксидаза хрому) [6] та інкубували протягом ще 30 хв. Після чого відмивали 4 рази вищезгаданим буферним розчином, вносили хромоген-субстратну суміш (ТМБ) та інкубували протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 М розчину сірчаної кислоти.

Показники оптичної густини (OD) вимірювали на спектрофотометрі Labsystems при довжині хвилі 450 нм.

Результати й обговорення

Вірус блютанга (BTV) належить до роду *Orbivirus* родини *Reoviridae*, що включає 24 різних серотипів BTV 1-24. Вірус блютанга має невеличкий (90 нм у діаметрі) ікосаедральний капсид, що містить сегментований геном з 10 сегментів дволанцюгової РНК. Кожен з сегментів кодує різні вірусні протеїни. Внутрішній шар капсиду складається з 5 структурних протеїнів: 3 мінорних (VP1, VP4, VP6) та 2 мажорних (VP3, VP7). Зовнішній шар капсиду складається з 2 мажорних вірусних протеїнів (VP2, VP5). При чому, саме VP2 антиген обумовлює серотипову різноманітність вірусу блютангу, а VP7 антиген, обумовлює серогрупову специфічність [1, 2]. Саме тому ми обрали VP7 як антиген для серологічної діагностики блютанга жуйних. У попередній роботі отримали трансгенні рослини тютюну, що експресують повноцінний рекомбінантний вірус-специфічний антиген VP7 (рис. 1). У роботі розробили діагностичну тест-систему «Блютанг-АТ» для серологічної діагностики блютанга жуйних.



Рис. 1. Трансформовані рослини *N. Tabacum* (лінія BTV 11) T₂ покоління, адаптовані до умов вирощування у ґрунті

На сьогодні не зафіксовано випадків блютанга в Україні, але слід враховувати епідемічну ситуацію у західній Європі де в минулому році було зафіксовано спалахи на блютанг у таких благополучних з епізоотичної ситуації країнах, як Франція, Німеччина та Польща. В Європі було зафіксовано 6 та 8 серотипи вірусу блютанга. Саме тому провели валідацію тест-системи «Блютанг-АТ» із використанням панелі позитивних референсних

зразків великої рогатої худоби (ВРХ) та дрібної рогатої худоби (ДРХ) експериментально інфікованих 6 та 8 серотипами вірусу блютанга. Характеристика позитивних зразків представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика панелі позитивних на блютанг референс зразків

№	Назва	Характеристика сироватки		
		Вид тварини	Серотип вірусу блютанга	Доба після зараження
1	ВTV8-R1	ВРХ	8	52
2	ВTV8 01-06	ВРХ	8	245
3	ВTV8 02-07	ВРХ	8	38
4	R1	ВРХ	6	52
5	R2	ВРХ	8	52
6	R3	ВРХ	8	52
7	R4	ВРХ	8	52
8	R5	ВРХ	8	52
9	R6	ВРХ	6	52
10	R7	ВРХ	6	52
11	R8	ВРХ	6	52
12	S1	ДРХ	6	52
13	S2	ДРХ	8	52
14	S3	ДРХ	8	52
15	S4	ДРХ	8	52
16	S5	ДРХ	8	52
17	S6	ДРХ	6	52
18	S7	ДРХ	6	52
19	S8	ДРХ	6	52

Для визначення показників специфічності та відтворюваності розробленої тест-системи ми проаналізували в ІФА 19 позитивних сироваток та 89 — негативних, у трьох повторях. При цьому середні показники оптичної густини (OD_{450}) позитивних зразків дорівнювали $1,150 \pm 0,488$, у той час як середні показники негативних зразків дорівнювали $0,035 \pm 0,012$ (рис. 2).

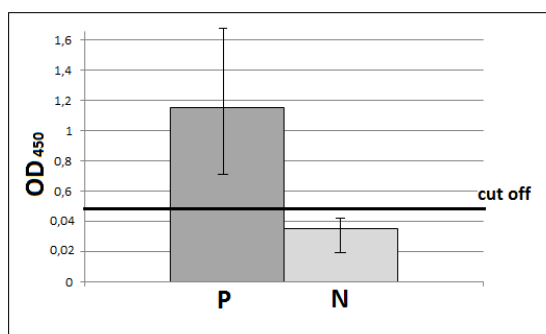


Рис. 2. Результати перевірки позитивних (P) та негативних (N) зразків у ІФА із використанням діагностичної тест-системи «Блютанг-АТ». Показано діапазон одержаних значень оптичної густини зразків та граничне значення

Було розраховано граничне значення (cut off) для даної тест-системи, який дорівнював 0,07.

З метою перевірки чутливості розробленої тест-системи провели аналіз серійних розведень трьох позитивних зразків (табл. 2).

Визначення показників чутливості тест-системи «Блютанг-АТ»

Номер зразка	Показники оптичної густини розведення зразків							
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
1	1,742	1,477	1,273	1,168	0,808	0,707	0,411	0,234
2	1,664	1,422	1,122	0,812	0,441	0,226	0,125	0,068
3	1,788	1,511	1,295	1,032	0,703	0,363	0,197	0,116

Отримані дані підтверджують високу чутливість розробленої тест-системи, на це вказує той факт, що сигнал позитивних сироваток 1, 2 та 3, навіть при розведенні у 1280 разів, знаходиться вище граничного значення cut off (рис. 3).

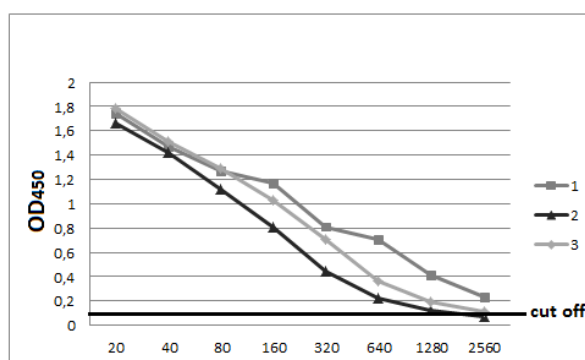


Рис. 3. Визначення чутливості тест-системи «Блютанг-АТ» із використанням серійних розведень (10^{-1}) трьох позитивних контрольних сироваток

Висновки

Проведенні дослідження показали, що діагностична тест-система «Блютанг-АТ», характеризується високими показниками чутливості, специфічності та відтворюваності. Дана тест-система «Блютанг-АТ» рекомендована до використання державною ветеринарною службою України для моніторингу та контролю за розповсюдженням блютанга жуйних територією України.

Перспективи подальших досліджень. Пропонується провести моніторинг приграничних районів Західної України на предмет виявлення специфічних антитіл проти вірусу блютанга у ВРХ та ДРХ. Крім цього, розробити діагностичну тест-систему на основі полімеразної реакції в реальному часі для контролю переносу вірусу блютанга кровосисними комахами роду *Culicoides*.

*D. Martynenko, D. Rybalchenko, Y. Breus, D. Korol, R. Chumak,
S. Melnychuk, V. Spyrydonov*

DEVELOPMENT OF ELISA FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF THE RUMINANTS' BLUETONGUE

Summary

The developed kit «Bluetongue-AB» for indirect ELISA of specific antibodies against the bluetongue virus of the ruminants using recombinant antigen VP7, derived biotech methods in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). It was shown that ELISA kit «Bluetongue-AB», characterized by high rates of sensitivity, specificity and reproducibility. The «Bluetongue-AB» kit is

recommended for use by the State veterinary service of Ukraine to monitor and control the spread of ruminants' bluetongue through Ukraine.

*Д. Л. Мартыненко, Д. Ю. Рыбальченко, Ю. В. Бреус, Д. Н. Король,
Р. М. Чумак, С. Д. Мельничук, В. Г. Спиридонов*

РАЗРАБОТКА ИФА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БЛЮТАНГА ЖВАЧНЫХ

А н н о т а ц и я

Разработана тест-система «Блютанг-АТ» для непрямого иммуноферментного анализа специфических антител против вируса блютанга жвачных с использованием рекомбинантного антигена VP7, который был полученный ранее биотехнологическими методами в растениях табака (*Nicotiana tabacum*). Показано, что тест-система «Блютанг-АТ», характеризуется высокими показателями чувствительности, специфичности и воспроизводительности. Тест-система «Блютанг-АТ» рекомендована к использованию государственной ветеринарной службой Украины для мониторинга и контроля над распространением блютанга жвачных по территории Украины.

1. *Schwartz-Cornil I.* Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity / I. Schwartz-Cornil, P. Mertens, V. Contreras, B. Hemati et al. // *Vet. Res.* — 2008. — V. 39, № 46. — P. 2–16.
2. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* — OIE 6th Ed., 2008. — V. 1, 2. — P. 1343.
3. *Afshar A.* Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue: evaluation of group-specific monoclonal antibodies and expressed VP7 antigen / A. Afshar, B. Eaton, P. Wright, J. Pearson et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 1992. — V. 4. — P. 231–237.
4. *Hamblin C.* Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques / C. Hamblin // *Vet. Ital.* — 2004. — V. 40, № 4. — P. 538–545.
5. *Спиридонов В. Г.* Одержання антигену VP7 вірусу блютангу жуйних у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* / В. Г. Спиридонов, К. С. Ситник, М. Ф. Парій та ін. // *Біотехнологія.* — 2011 — Т. 4, № 2. — С. 73–79.
6. *Спиридонов В. Г.* Бактеріальний синтез IgG-зв'язувального домену білка G *Streptococcus* sp., та перспективи його використання в імунологічній практиці / В. Г. Спиридонов, Д. Ю. Рыбальченко, Р. М. Чумак та ін. // *Мікробіологічний журнал.* — 2006. — Т. 68, № 5. — С. 31–35.

Рецензент: доктор ветеринарних наук, завідувач кафедри мікробіології Скібіцький В. Г., Національний університет біоресурсів і природокористування України.