



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 619:616-07/616-084:636.4

© 2016

Т.О. Бова,
С.В. Дерев'янку,
Л.М. Решотько,
кандидати
біологічних наук

Інститут
сільськогосподарської
мікробіології
та агропромислового
виробництва НААН

УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ХВОРОБИ ТЕШЕНА НА ОСНОВІ ТВЕРДОФАЗНОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Мета. Удосконалити імуноферментну тест-систему для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу хвороби Тешена в сироватках крові свиней. **Методи.** Використано вірусологічні, серологічні, імуноферментні, інструментальні та статистичні методи, запропоновані зарубіжними та вітчизняними вченими, а також власні розробки.

Результати. За використання нового виробничого штаму *Porcine teschovirus* першого серотипу Дніпровський-34 удосконалено діагностику хвороби Тешена свиней на основі твердофазного імуноферментного аналізу.

Висновки. Специфічність тест-системи становить 100%, чутливість — 95,6%.

Застосування тест-системи дає змогу встановити діагноз упродовж 7 год, що значно менше порівняно з реакцією нейтралізації.

Ключові слова: ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней, діагностична тест-система, твердофазний імуноферментний аналіз.

Ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) — одна із найнебезпечніших хвороб свиней, за гострого перебігу якої гине від 6 до 100% захворілих тварин [8]. Хвороба Тешена — це контагіозне вірусне захворювання, яке супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок. Ураження центральної нервової системи збудником призводить до розладу координації рухів, підвищення чутливості шкіри (гіперстезія), судомних скорочень м'язів тулуба, прогресуючих парезів і паралічів кінцівок у свиней. Збудником хвороби є *Porcine teschovirus* 1-го серотипу (PTV-1).

Вирішальне значення у встановленні диференційного діагнозу й забезпеченні

стійкого епізоотичного благополуччя щодо цієї хвороби має своєчасна та якісна лабораторна діагностика. Одним із методів експрес-діагностики хвороби Тешена, рекомендованих Міжнародним епізоотичним бюро, є твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА) [9]. Проте сучасні умови господарювання, зміни антигенних характеристик епізоотичних штамів у результаті еволюційної мінливості вірусів потребують удосконалення підходів до конструювання експресних засобів діагностики [2].

Мета досліджень — удосконалити імуноферментну тест-систему для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу хвороби Тешена в сироватках крові свиней на основі

епізоотичного штаму тешовірусу свиней 1-го серотипу.

Матеріали та методи досліджень. Для виробництва тест-системи використано штам Дніпровський-34 РТВ-1, який зберігається в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН [6].

Накопичення та титрування вірусів, титрування сироваток крові проводили в реакції нейтралізації (РН) у культурі клітин нирки новонародженого сирійського хом'яка (ВНК-21) загальноприйнятими методами [1].

Культуру клітин вирощували у плоских колбах і пробірках на живильному середовищі ДМЕМ з 7% фетальної бичачої сироватки крові. Титр вірусу в культурі клітин визначали методом Ріда і Менча [11].

Вірусний антиген очищували хлороформом і диференційним центрифугуванням, інактивували етиленіміном [5].

Контроль чистоти вірусу здійснювали електронномікроскопічно та спектрофотометрично. Електронну мікроскопію проводили за використання мікроскопа EM-125 K за інструментального збільшення 20 000 (негативне контрастування розчином фосфорно-вольфрамової кислоти (рН 7,4)). Спектрофотометрію проводили на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 260 та 280 нм. Співвідношення $E_{260/280}$ очищених препаратів тешовірусів має становити 1,4–1,8.

Робоче розведення вірусного препарату для сенсibiliзації планшетів визначали титруванням за загальноприйнятною методикою [3].

Для отримання імуносорбенту в лунки полістиролових планшетів вносили по 100 мкл робочого розведення вірусного антигену у фізіологічному буферному розчині (ФБР) з додаванням 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) і витримували за 4°C до повного висихання рідини. Після чого планшети герметично запаювали в поліетиленову плівку та зберігали за 4°C.

Сироватки крові свиней одержували з господарств Чернігівської області. Всі сироватки крові попередньо перевіряли в РН на наявність вірусспецифічних антитіл за загальноприйнятною методикою [1].

Імуногеном для одержання антисвинячої сироватки крові були препарати імуноглобулінів класів G з сироватки крові клінічно здорових свиней, одержані за

загальноприйнятною методикою [4]. Кролів імунізували за методикою М.С. Неверової в нашій модифікації [7]. Підшкірно антиген вводили в ділянку лопатки, внутрішньошкірно вздовж хребта у 8–10 точок. Відбір крові проводили через 7–10 днів після останньої імунізації.

Кон'югацію кролячих антисвинячих і специфічних до тешовірусів свиней 1-го серотипу Ig G з пероксидазою хрому здійснювали за методикою Р.К. Nakane і А. Kawaoi [10], у модифікації [3]. Визначення робочих характеристик одержаного кон'югату проводили в прямому варіанті ТІФА за загальноприйнятною методикою [3].

ТІФА проводили на полістиролових планшетах фірми «Sarstedt» (США). Сироватки крові свиней і кон'югат розводили у ФБР з додаванням 1% БСА. Досліджувані сироватки в розведенні 1:5 вносили по 100 мкл на лунку в 4-х повторностях, інкубували за 37°C протягом 1 год. Після промивання планшетів вносили робоче розведення антисвинячого кон'югату об'ємом 100 мкл на лунку та витримували за 37°C 1 год. Утворені комплекси після промивання ФБРТ (з твіном) виявляли за допомогою ортофенілендіаміну. Облік результатів проводили на рідері фірми «SanoFi» (Франція) за довжини хвиль 492/620 нм.

Для оцінки результатів дослідження сироваток крові свиней визначали контрольний рівень (КР, або «cut off»), який обчислювали додаванням середнього арифметичного значення оптичної густини (ОГ) негативних сироваток і 3-х середньоквадратичних відхилень. Сироватка вважалася позитивною, коли ОГ перевищувала КР на 10%.

Специфічність тест-системи визначали на панелі з 23-х негативних сироваток крові свиней, що не містили антитіл до тешовірусу свиней. Чутливість тест-системи визначали на панелі з 23-х позитивних сироваток крові свиней, що за результатами РН містили антитіла до тешовірусу 1-го серотипу.

Результати досліджень. Основними компонентами імуноферментної тест-системи є імуносорбент, позитивний та негативний контроль і пероксидазний кон'югат. Тому першим етапом нашої роботи було розробити технологію їх отримання.

Для приготування антигену використано виробничий штам РТВ-1 Дніпровський-34, накопичений у культурі клітин ВНК-21.

Інфекційний титр вірусу становив 8 Іg ТЦД₅₀/см³. Інактивація вірусу етиленіміном наставала впродовж 16–20 год, про що свідчить відсутність цитопатичної дії в культурі клітин після внесення інактивованого препарату.

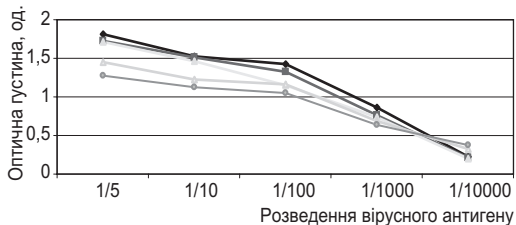
Після очищення хлороформом і диференційним центрифугуванням, під електронним мікроскопом установлено, що в очищених препаратах є поодинокі вірусні частки округлої форми діаметром 27–30 нм і/або їх скупчення чи кристали. Очищені препарати не містили дефектних вірусних часток, порожніх вірусних капсидів, структурних компонентів культур клітин.

Спектрофотометричний контроль одержаного вірусного антигену підтвердив високий ступінь очищення. Так, співвідношення E_{260/280} становило 1,4–1,8.

Під час розробки імуноферментної тест-системи важливо оптимізувати процес іммобілізації вірусного антигену на твердому носії. За результатами досліджень у непрямому варіанті ТІФА — в динаміці, через 1, 3, 6, 9 та 12 міс. зберігання за 4–8°C (рисунк) установлено, що вірус у робочому розведенні 1:150, сенсibiliзований у лунках полістиролового планшета, зберігає свою активність упродовж одного року.

Для одержання антисвинячого перекисного кон'югату використовували сироватки крові з титром 1:10240 у прямому варіанті ТІФА. Контроль чистоти виділених Іg G свідчить, що співвідношення E₂₈₀/E₂₆₀ становило 1,71, концентрація білка — 10,8 мг/см³. Титр одержаного антивидового кон'югату становив 1:10240, робоче розведення — 1:1000.

Наступний етап роботи — підтвердження робочих характеристик удосконаленої тест-системи для виявлення специфічних антитіл до збудника хвороби Тешена. Для цього створено панель позитивних і негативних сироваток крові свиней та проведено їх



Активність імуносорбенту під час зберігання:
 — 1 міс.; — 3; — 6; — 9; — 12 міс.

1. Дослідження негативних сироваток крові свиней з використанням розробленої тест-системи

№ сироватки	Середнє значення ОГ	Значення похибки (±)
1	0,147*	0,006
2	0,149*	0,009
3	0,046*	0,004
4	0,165*	0,007
5	0,113*	0,005
6	0,160*	0,006
7	0,120*	0,009
8	0,055*	0,003
9	0,064*	0,004
10	0,047*	0,005
11	0,061*	0,005
12	0,158*	0,006
13	0,079*	0,005
14	0,085*	0,008
15	0,056*	0,006
16	0,070*	0,003
17	0,092*	0,004
18	0,126*	0,003
19	0,078*	0,010
20	0,055*	0,005
21	0,058*	0,005
22	0,092*	0,004
23	0,073*	0,011
ОГ _{сер}	0,093*	0,041
Позитивний контроль	1,127	0,048
Негативний контроль	0,129	0,008

* P<0,001 щодо позитивного контролю; ОГ_{сер} — середнє значення ОГ під час дослідження негативних сироваток.

паралельне тестування в ТІФА та РН.

Панель позитивних сироваток — 23 сироватки крові свиней, які за результатами РН містять антитіла до тешовірусу свиней 1-го серотипу, з них: 16 — з титром антитіл 1:16–1:128 та 7 — з титром антитіл 1:8. Панель негативних сироваток — 23 сироватки крові свиней, які за результатами РН гарантовано не містять антитіл до тешовірусу свиней 1-го серотипу.

Для розрахунку КР, за яким можна стверджувати про наявність або відсутність антитіл у сироватках крові, досліджено 23 негативні сироватки крові свиней (табл. 1).

Мінімальне значення ОГ під час дослідження негативних сироваток крові свиней

2. Специфічність імуноферментної тест-системи для визначення антитіл до тешовірусу свиней 1-го серотипу

№ сироватки	ОГ, од. (M±m)	Титр у РН
1	0,147±0,006*	0
2	0,149±0,009*	0
3	0,046±0,004*	0
4	0,165±0,007*	0
5	0,113±0,005*	0
6	0,160±0,006*	0
7	0,120±0,009*	0
8	0,055±0,003*	0
9	0,064±0,004*	0
10	0,047±0,005*	0
11	0,061±0,005*	0
12	0,158±0,006*	0
13	0,079±0,005*	0
14	0,085±0,008*	0
15	0,056±0,006*	0
16	0,070±0,003*	0
17	0,092±0,004*	0
18	0,126±0,003*	0
19	0,078±0,010*	0
20	0,055±0,005*	0
21	0,058±0,005*	0
22	0,092±0,004*	0
23	0,073±0,011*	0
ОГ (M±m) 0,093±0,040		
Позитивний контроль	1,127±0,129	1:128
Негативний контроль	0,048±0,008	0

* P<0,001 щодо позитивного контролю.

становило 0,046, максимальне — 0,165 опт. од. Для підрахунку КР визначали середнє значення ОГ під час дослідження негативних сироваток, яке становило 0,093 за стандартного відхилення 0,041.

Враховуючи наведені вище результати, КР становив 0,215. Тому позитивним вважається результат дослідження сироватки крові свині, коли ОГ перевищує КР на 10%, тобто більше 0,237. Якщо ОГ нижче за 10%, тобто менше 0,194, сироватка крові вважається негативною до тешовірусу свиней 1-го серотипу. Якщо значення ОГ у межах 0,194<ОГ<0,237, то результат є сумнівним і підлягає повторному дослідженню.

Для визначення специфічності досліджували 23 сироватки крові, що не містили

3. Чутливість імуноферментної тест-системи для визначення антитіл до тешовірусу свиней 1-го серотипу

№ сироватки	ОГ, од. (M±m)	Титр у РН
1	1,198±0,050*	1:128
2	1,341±0,023*	1:128
3	1,331±0,009*	1:128
4	0,973±0,009*	1:64
5	0,213±0,011*	1:16
6	0,488±0,008*	1:16
7	0,667±0,016*	1:32
8	0,394±0,009*	1:8
9	0,566±0,012*	1:32
10	0,233±0,010*	1:8
11	0,318±0,006*	1:8
12	0,415±0,006*	1:8
13	0,512±0,004*	1:32
14	0,563±0,010*	1:16
15	0,490±0,006*	1:16
16	0,670±0,006*	1:32
17	0,752±0,008*	1:32
18	0,488±0,245*	1:8
19	1,240±0,005*	1:128
20	1,502±0,006*	1:128
21	0,332±0,014*	1:8
22	0,424±0,009*	1:8
23	0,956±0,006*	1:64
ОГ (M±m) 0,698±0,389		
Позитивний контроль	1,108±0,127	1:128
Негативний контроль	0,080±0,015	0

* P<0,001 щодо негативного контролю.

антитіл до тешовірусу свиней, у розробленій системі і порівнювали з титрами сироваток крові в РН (табл. 2). У жодному дослідженні негативних сироваток у нашій тест-системі не зареєстровано значень ОГ, які свідчили б про сумнівний або позитивний результат. Це на 100% підтверджує специфічність тест-системи.

Чутливість тест-системи для виявлення антитіл до тешовірусу свиней визначали порівнянням результатів дослідження 23-х сироваток крові свиней, що за результатами РН гарантовано містили антитіла до тешовірусу свиней 1-го серотипу (табл. 3). Одержані результати засвідчили про 95,6%-ву чутливість тест-системи, оскільки ОГ сироватки № 5 була меншою КР.

Висновки

Удосконалено імуноферментну тест-систему для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу хвороби Тешена в сироватках крові свиней. До складу тест-системи входять: імуносорбент — інактивованій штамп Дніпровський-34 РТВ-1, імобілізований у лунках полістиролових планшетів, позитивна сироватка крові свиней до РТВ-1 (позитивний контроль), негативна сироватка крові свиней до РТВ-1 (негативний контроль), антісвинячий пероксидазний кон'югат проти Ig G свиней — імуноспецифічні компоненти

та концентрати для приготування промивного і субстратного буферних розчинів, субстрат ортофенілдіаміну, гідроперит, стоп-реагент, кришка для планшетів — неспецифічні компоненти.

Установлено, що специфічність тест-системи становить 100%, а чутливість — 95,6%. Використання її дає змогу виявити Ig G у сироватках крові свиней протягом 6–7 год. Розроблено Інструкцію з виготовлення та контролювання якості тест-системи.

Бібліографія

1. Бова Т.О. Методичні рекомендації з вірусологічного моніторингу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней/Т.О. Бова, В.І. Сорока, С.В. Дерев'яно та ін. — Чернігів: ЧДЦНІІ, 2014. — 18 с.
2. Бузун А.И. Подтипковые различия среди штаммов и изолятов возбудителя болезни Тешена/А.И. Бузун, М.В. Бабкин//Ветеринарна медицина. — 2000. — Т. 78. — С. 23–28.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа/А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.
4. Кэтти Д. Иммуноферментный анализ/Д. Кэтти, Ч. Райкундалиа//Антитела. Методы. Кн. 2: Пер. с англ.; под ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1991. — С. 152–239.
5. Пат. 31211 Україна, МПК (2006) С12N 7/04 Спосіб інактивації вірусу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней/В.І. Сорока, С.В. Дерев'яно, Н.В. Бабіч, Т.О. Бова. — № 200714613; заявл. 24.12.2007; опубл. 25.03.2008, Бюл. № 6.
6. Пат. 57372 Україна, МПК (2011.01) С12N 7/00, А61К 39/125, А61К 39/187 (2011.01), С12R

- 1/92 (2006.01) Штамп *Porcine teschovirus* для виробництва ветеринарних імунобіологічних препаратів/С.В. Дерев'яно, Т.О. Бова, В.І. Сорока та ін. — № u201009325; заявл. 26.07.2010; опубл. 25.02.2011, Бюл. № 4.
7. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01) Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин/В.В. Волкова, Т.О. Бова, С.В. Дерев'яно. — № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8.
8. *Derbyshire J.B. Enterovirus/J.B. Derbyshire// Diseases of Swine. — Iowa: Iowa state University Press, 1999. — P. 145–150.*
9. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)//OIE. — 6th Ed. — Paris, 2008. — V. II. — P. 785–791.*
10. *Nakane P.K. Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation/P.K. Nakane, A. Kawaoi//Ibid. — 1974. — V. 22, № 10. — P. 1084–1091.*
11. *Reed L.J. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints/L.J. Reed, H. Muench//The American J. of Hygiene. — 1938. — V. 27, № 3. — P. 493–497.*

Надійшла 13.02.2015.