

В. А. СИНИЦИН, доктор ветеринарних наук
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ ТВАРИН МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Викладені результати наукових досліджень по розробці та практичному застосуванні методу імуноферментного аналізу для діагностики особливо небезпечних хвороб свиней

Ключові слова: імуноферментний аналіз, очистка та концентрування, набори діагностикумів, класична чума свиней, трансмісивний гастроентерит свиней.

Розробка та впровадження високочутливих імунологічних експресних методів діагностики інфекційних хвороб у практичну роботу лабораторій ветеринарної медицини є однією з умов інтенсифікації тваринництва. До небезпечних захворювань, що завдають великих збитків свинарству, належать класична чума свиней, трансмісивний, рота- та ентеровірусні гастроентерити, ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена), бешиха та трихінельоз свиней. Тому актуальною проблемою ветеринарної медицини у боротьбі з хворобами свиней є своєчасна та ефективна експресна лабораторна діагностика та проведення необхідних ветеринарно-санітарних заходів [1–3].

На початку 70-х років групою авторів [4–6] розроблено метод імуноферментного аналізу (ІФА), який в зарубіжній літературі отримав назву «ELISA»-тест (Enzyme linked immunosorbent assay). Переваги методу ІФА зумовлені наступним: експресність, висока чутливість, специфічність, стабільність ферментативних кон'югатів, автоматизація проведення реакції та її обліку [8–10].

Враховуючи важливе значення розробки експресних методів діагностики інфекційних хвороб тварин, актуальним питанням сьогодення є розробка та впровадження в практичну роботу лабораторій ветеринарної медицини наборів діагностикумів для ІФА найбільш поширених інфекційних та інвазійних хвороб свиней.

Метою роботи була розробка та науково-експериментальне обґрунтування технології виготовлення діагностикумів класичної чуми свиней, хвороби Тешена, трансмісивного та ентеровірусного гастроентеритів, бешихи та трихінельозу свиней, визначення діагностичної цінності методу, створення наборів діагностикумів для імуноферментного аналізу та впровадження їх у ветеринарну практику.

Матеріали і методи. В роботі при розробці методу ІФА використовували референтні, стандартизовані штами збудників КЧС, ТГС, ЕВГС, хвороби Тешена, бешихи, трихінельозу. Хроматографічну очистку та концентрування проводили за допомогою ультрафіолетового детектора типу «Увікорд» з використанням макропористих сорбентів (МПС).

Реакцію імуноферментного аналізу проводили на полістиролових мікропланшетах (96 лунок). Результати реакції враховувались на автоматичному спектрофотометрі фірми «ФЛОУ» (Англія) та візуально.

Результати досліджень. Для одержання очищених і концентрованих вірусних препаратів для ІФА нами розроблена високотехнологічна методика адсорбційної і гель-хроматографії на макропористих сорбентах.

Одержання високого ступеня чистоти і концентрації вдалося досягти лише після ретельного вибору співвідношень між розмірами віріонів і діаметром пор сорбенту, розміру гранул, вибору оптимальних параметрів адсорбційної і гель-хроматографії. В результаті проведених досліджень розроблена трьох етапна методика очищення і концентрування вірусів КЧС, хвороби Тешена, ТГС, ЕВГС. При цьому окремо для кожної групи збудників підібрані оптимальні умови сорбції вірусів на поверхні сорбенту та умови десорбції.

Для кінцевої очистки вірусів одержаний елюат після адсорбційної хроматографії піддавали гель-хроматографічній очистці на макропористих сорбентах, модифікованих полівінілпіролідом, при цьому були відпрацьовані оптимальні умови проведення гель-хроматографії, при яких вдалося досягти чіткого відокремлення вірусної фракції від баластних білків.

Одержані хроматографічно очищені вірусні препарати ТГС, ЕВГС, КЧС, хвороби Тешена не давали неспецифічного забарвлення в реакції імуоферментного аналізу з гетерологічними сироватками, що свідчить про високу якість отриманих очищених антигенів для імуоферментного аналізу. Високий ступінь очистки підтверджений при проведенні спектрального аналізу, електронної мікроскопії, електрофорезу в ПААГ.

Очищені вірусні препарати використовували для одержання імунних сироваток.

Розроблена технологія хроматографічної очистки і концентрування вірусних препаратів увійшла основним етапом в «Нормативно-технологічну документацію по виробництву імуоферментних діагностикумів ТГС, ЕВГС, КЧС, хвороби Тешена». Спосіб одержання очищеного і концентрованого антигенного і антитільного діагностичного препарату захищений авторським свідоцтвом на винахід № 1405149.

Отримані антигенні препарати використовували для розробки методу імуоферментного аналізу для виявлення антитіл до КЧС, хвороби Тешена, ТГС, ЕВГС.

Нами встановлено, що чутливість і специфічність ІФА залежить від правильно підібраних параметрів тест-системи: сенсibiliзуючої дози антигену, рН інкубаційного буферного розчину, часу і температури адсорбції антигену на твердофазному носії. Тому кожна серія специфічних антигенів підлягала «шаховому» титруванню в ІФА, при цьому встановлено, що оптимальна концентрація антигену для адсорбції на полістиролових мікропланшетах становить 10-15 мкг/см специфічного білка при інкубації при +4° С протягом 18 год.

Для визначення кореляції титрів антитіл в ІФА і реакції нейтралізації в культурі клітин проведено порівняння результатів титрування сироваток крові з різним ступенем активності в ІФА і РН.

При проведенні паралельних досліджень польових сироваток з господарств України та держав СНД в ІФА і РН при ТГС, ЕВГС, хвороби Тешена, встановлено, що діагностичний титр в ІФА при хворобі Тешена становить 1 : 200, ТГС – 1 : 50, ЕВГС – 1 : 100.

Одержані дані досліджень сироваток в ІФА і РН підтверджені статистично при визначенні коефіцієнта кореляції. Встановлено, що коефіцієнт кореляції між логарифмом обернених величин титрів в ІФА і РН дорівнює 0,964, що свідчить про високу позитивну кореляцію між двома діагностичними методами визначення рівня титру специфічних антитіл. При вивченні чутливості ІФА і РН встановлено, що в середньому ІФА чутливіша за РН у 30 разів.

Для виявлення специфічних антитіл до збудника бешихи свиней розроблено «Набір діагностикумів для ІФА». Проведена статистична обробка та виявлена

кореляційна залежність титрів специфічних антитіл» одержаних у реакції проби росту та реакції імуноферментного аналізу.

При цьому встановлено, що титр антитіл в Пр 1:10 відповідає титру антитіл в ІФА 1:32; 1:20 – 1:64; 1:40 – 1:128; 1:80 – 1:256 та вище.

Дослідженнями встановлено, що найбільш високі та стабільні показники антитіл до збудника бешихи свиней реєстрували в зразках сироваток крові, відібраних від свиней, які були щеплені депонованою вакциною проти бешихи свиней. У сироватках крові свиней, які щеплювалися вакциною сухою (ВР-2) проти бешихи свиней та концентрованою гідроокисалюмінієвою формолвакциною проти бешихи свиней, титри специфічних антитіл були нижчими.

При контрольному зараженні через 3,5 місяці після щеплення вакциною ВР-2 захворіло 66,7 % тварин, КГОА формолвакциною – 50%, контрольних (не вакцинованих – 100 %), а щеплені депонованою вакциною не захворіли. При зараженні свиней через 5,5 місяці після щеплення депонованою вакциною всі тварини залишилися здоровими, тоді як 100 % контрольних захворіли бешихою.

Наступним етапом нашої роботи була розробка та практичне впровадження методу ІФА при діагностичних обстеженнях хворих свиней на ТГС, ЕВГС, ротавірусні інфекції.

Проведені дослідження по випробуванню прямого «Сендвіч»-методу ІФА при індикації та ідентифікації антигенів корона-, рота- та ентеровірусів показали його високу активність та специфічність. Ці результати були одержані лише після ретельного відпрацювання всіх параметрів постановки методу імуноферментного аналізу.

Нами запропонована методика виділення імуноглобулінів класу G з імунних сироваток за допомогою хроматографії на макропористих сорбентах, модифікованих полівінілпіролідом, з розміром пор 450 – 500 А. На базі одержаних специфічних імуноглобулінів виготовляли імунопероксидазні кон'югати методом перйодатного окиснення.

Розроблена нами тест-система ІФА була використана при контролі наявності антигенів та їх нагромадження при проведенні пасажування вірусних ізолятів коронавірусу ТГС шт. 1439/81, ентеровірусу шт. УНІВІ та ротавірусу шт. «К», кандидатів у вакцинні штами, при визначенні локалізації антигенів у різних органах експериментально інфікованих поросят-гнотобіотів, а також при дослідженні польових матеріалів від хворих свиней.

Нами встановлено, що в епізоотичних умовах спостерігається асоціація збудників: корона -, ентеро-, ротавірусів.

Для лабораторної діагностики КЧС розроблено «Набір діагностикумів класичної чуми свиней для ІФА»(ТУ У 46.15.045-94).

Постановку ІФА при індикації антигенів КЧС здійснювали у непрямому варіанті на полістиролових мікропланшетах на 96 лунок.

Проведено дослідження ІФА дев'яти серій вакцин проти КЧС (Суми), 4 серій вакцин «Лапест» (Польща), двох вакцин – проти чуми та чуми і бешихи свиней виробництва фірми «Біовет» (Чехія) та десяти серій вакцини ЛК-К (м. Покров, Росія). Вакцини, які мали тигр в ІФА 1:64 – 1:128, у біопробі при контрольному зараженні вакцинованих підсвинків вірусом КЧС штаму Ші-Мінь були неімуногенними і поросята загинули, вакцини з тигром в ІФА 1:512 – 1:1024 захищали свиней від зараження [8].

Методом імуноферментного аналізу проведено досліджень 372 проб патологічного матеріалу від хворих свиней з 56 господарств України, при цьому в 192 пробах виявлено антигени вірусу класичної чуми свиней.

Розроблений метод ІФА використовували для оцінки ефективності вакцинопрофілактики класичної чуми свиней. Критеріями оцінки напруги імунітету служили наступні показники: відсутність напруги імунітету – 0,0; імунітет слабкої напруги – 1:4 – 1:8; імунітет достатньої напруги – 1:16 і вище [9].

Найбільш високі показники одержали при використанні вакцин ЛК-К (Покров) і «Лапест» Польща. Установлено, що тварини з титром антитіл до вірусу КЧС 1:16-1:128 витримували контрольне зараження польовим вірусом КЧС штаму Ші-Мінь. Проведені дослідження важливі не лише при оцінці ефективності вакцинації, а й для епізоотичного нагляду, особливо при дослідженні патматеріалу від диких свиней.

У 2004 році на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів м. Київ проведено згідно «Положенню про проведення контролю та нагляду за якістю ветеринарних препаратів, субстанцій, готових кормів та кормових добавок, та засобів ветеринарної медицини, які застосовуються в Україні, що затверджено наказом Державного департаменту ветеринарної медицини № 39 від 28.05.03 р. та зареєстровано в Міністерстві юстиції України за №480/7801 від 12.06.03р., випробування вітчизняного «Набору діагностикумів класичної чуми свиней для імуноферментного аналізу» серія №7 з метою перевірки чутливості, специфічності та методики апаратного обліку. При випробуванні використовували стандартизовані позитивні сироватки до вірусу класичної чуми свиней, які були вакциновані різними вакцинами КЧС (АСВ, ЛК, ЛК-М) та відібрані на 10, 14, 15, 18, 19 добу, а також були використані негативні сироватки від невакцинованих тварин. Попередньо зразки сироваток перевірені та стандартизовані в тест-системі фірми IDEXX (США)

Чутливість «Набору діагностикумів класичної чуми свиней для імуноферментного аналізу» виробництва інституту ветеринарної медицини м. Київ, визначали у відсотках по співвідношенню позитивно реагуючих сироваток до дійсно позитивних сироваток і складала 98 %.

Специфічність визначалась у відсотках по співвідношенню негативно реагуючих сироваток до дійсно негативних сироваток і складала 100 %.

Таким чином встановлено, що вітчизняний «Набір діагностикумів КЧС для ІФА» є високочутливим та специфічним і відповідає вимогам ТУ У.

Особливе соціальне значення проведених досліджень має розробка вітчизняного набору компонентів для прижиттєвої діагностики трихінельозу.

Згідно з ветеринарною звітністю за 1971 – 1998 рр. в Україні зареєстровано близько 4000 випадків трихінельозу свиней. Враховуючи таку високу захворюваність в Україні, розроблено вітчизняний «Набір діагностикумів трихінельозу для імуноферментного аналізу» (ТУ У 46.15.235-97), який призначений для виявлення антитіл у сироватці крові свиней. Чутливість набору 96,5 – 97 % та специфічність – 100 %, що було підтверджено міжвідомчими випробуваннями, які були проведені у 1997 році [10].

Висновки: 1. В результаті проведених досліджень вперше в Україні розроблена технологія виготовлення та застосування наборів діагностикумів КЧС, хвороби Тешена, ТГС, ЕВГС, трихінельозу, бешихи свиней, грипу коней, ринопневмонії та вірусного артеріїту коней для імуноферментного аналізу, які впроваджені у діагностичну практику.

2. Набори діагностикумів для імуноферментного аналізу пройшли міжвідомчі та виробничі випробування при дослідженні патологічного матеріалу від хворих тварин.

3. Компоненти наборів стандартизовані за активністю та специфічністю, розроблена нормативно-технічна документація на виробництво та застосування тест-систем для ІФА, яка затверджена Головним управлінням ветеринарної медицини МСГП України.

Список використаної літератури:

1. *Собко А. И.* Вирусный (трансмиссивный) гастроэнтерит // Справочник по болезням свиней. – К, 1981. – С. 39 – 46.
2. *Собко А. И.* Антигенное родство, различия и доминантность вирусов животных / Анатолий Собко, Виктор Прискока // Ветеринария. – 1985. – № 3. – С. 28 – 31.
3. *Бессонов А. С.* Диагностика трихинеллеза Вильнюс. – 1975. – 380 с.
4. *Engval E.* Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) Qualitative assay of immunoglobulin G / *E. Engval, P. Perlmann* // *Immunochem.* – 1971. – Vol. 8. – P. 871 – 874.
5. *Van Weemen B. K.* Immunoassay using hapten-enzyme conjugates / *B. K. Van Weemen, A.H. Schuure* // *FEBS Lett.* – 1972. – 24. – №1. – P. 77 – 81.
6. *Синицин В. А.* Перспективи розвитку імуноферментного методу діагностики інфекційних хвороб тварин / *В. А. Синицин* // *Вет. медицина України* 1996. – № 2. – С. 18 – 19
7. *Собко А. И.* Метод імуноферментного аналізу для оцінки накопичення вірусного антигену при виробництві вакцин проти КЧС / *А. И. Собко, В. А. Прискока, В. А. Синицин* // *Збереженість молодняку с.-г. тварин – запорука розвитку тваринництва України: Тези доповідей наук.- практ. конф.* – Харків, 1994. – С. 60 – 61.
8. *Синицин В. А.* Серологічний контроль ефективності профілактики класичної чуми свиней / *В. А. Синицин* // *Тваринництво України.* – 1996. – №2. – С. 17.
9. *Синицин В. А.* Прижиттєва діагностика трихинельозу / *В. А. Синицин* // *Вет. медицина України* 1997. – № 4. – С. 16.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА / В. А. Синицин

Изложены результаты исследований по разработке и практическому использованию метода иммуноферментного анализа для диагностики особо опасных болезней свиней.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, очистка та концентрування, набори діагностикумов, класическа чума свиней, трансмиссивний гастроентерит свиней.

THE LABORATORY DIAGNOSTIC OF ANIMALS' DISEASES BY ELISA TEST / V. Sinitin

The results of the scientific researches of the development and practical application of ELISA test are presented for the diagnostic of the most emergency diseases of pigs.

Key words: ELISA test, purification and concentration, diagnostic kit, classical swine fever, transmissible gastroenteritis of swine

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **М. П. Ситюк**