

УДК 619:615.37.012

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИФА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Люлькова Л.С., Еремец В.И., Самуйленко А.Я., Мальшова М.А.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Щелково, Московская обл.,

Ямникова С.С.

ГУ Научно-исследовательский институт вирусологии РАМН им. Д.И. Иванковского

Хламидиозы – группа контагиозных болезней человека, млекопитающих и птиц, вызываемых антигенно-родственными и морфологически аналогичными микроорганизмами – хламидиями. По классификации Международных микробиологических обществ (1980 г.) возбудитель отнесен к бактериям семейства *Chlamydiaceae*, рода *Chlamydia*, разделенного на 4 вида: *C. psittaci*; *C. trachomatis*; *C. pecorum*; *C. Pneumonia*. Антигены хламидий классифицируются на группо-, видо-, подвидо-, типоспецифические [4]. Все возбудители рода хламидий имеют общий антиген LPS (липополисахарид, состоящий из полисахарида и липида А), который локализуется внутри клеточной основной мембраны и выявляется в течение всего цикла развития. Наличие такого антигена в структуре возбудителя позволяет широко использовать серологические методы для диагностики хламидиоза. Особенность хламидийной инфекции значительно усложняет эпизоотологический надзор за ней, что связано с часто встречающейся хронической формой со стертой клинической картиной или латентным течением заболевания. Именно поэтому в системе мер борьбы с хламидийной инфекцией наиболее актуальной признана диагностика заболевания, с учетом результатов которой возможна организация ветеринарно-санитарных мероприятий по профилактике и искоренению заболевания [5]. Диагноз на хламидиоз ставят на основании анализа эпизоотической обстановки, совокупности клинических и патологических признаков болезни и результатов лабораторных исследований. Традиционным и достаточно специфичным методом лабораторной диагностики хламидиоза является реакция связывания комплемента (РСК), в основе которой лежит активация системы комплемента. РСК до настоящего времени является одним из основных методов при диагностике инфекций, вызываемых *C. psittaci*, *C. pecorum* [1]. При высокой специфичности и чувствительности РСК не всегда является эффективным методом диагностики, особенно при исследовании хламидий слабо вирулентных вариантов. В настоящее время наряду с традиционными серологическими методами диагностики используются методы иммуноферментного анализа (ИФА), основанные на применении ферментов в качестве маркеров антигенов или антител [1, 3]. Такие маркеры делают иммунологический анализ универсальным, поскольку фермент, присутствующий в минимальных количествах, позволяет выявить и количественно определить специфические антитела или антиген в высоких разведениях. В связи с этим методы ИФА значительно превосходят по чувствительности и воспроизводимости общепринятые методы серологической диагностики [2, 3]. ИФА можно применять как для количественного, так и для качественного (по изменению окраски) анализа исследуемых образцов. Визуальный учет результатов ИФА позволяет использовать его для диагностики заболеваний в обычных лабораториях без специального оборудования. Иммуноферментный анализ для иммунодиагностики бактериальных и вирусных инфекций включен в число обязательных методов экспресс-диагностики, рекомендуемых ВОЗ при острых заболеваниях [3].

Цель проведенных исследований. Разработать тест-системы твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для диагностики хламидиоза овец и крупного рогатого скота.

Материалы и методы. В работе использовали хламидии штаммов «Лори» из коллекции микроорганизмов Института вирусологии им. Д.И. Иванковского и «Улетово-96-ВНИТИБП», депонированного в коллекции микроорганизмов ВГНКИ. Хламидии культивировали в желточных мешках 7-суточных куриных эмбрионов и культуре клеток L929 и McCoу. Максимальное накопление хламидий определено на третьи сутки и составляло от 10^5 до 10^7 глуоресцирующих включений. Антиген получали по технологии, основанной на эфирно-ацетоновой экстракции, изложенной в Технологическом регламенте института на изготовление «Наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК». Специфическую хламидийную сыворотку получали путем иммунизации овец по схеме, также изложенной в Технологическом регламенте. Специфическая хламидийная сыворотка КРС была получена из Удмуртской республиканской ветеринарной лаборатории. Для проведения ELISA применяли антивидовые иммунопероксидазные конъюгаты анти-IgG (барана)-ПХ и анти-IgG (быка) –ПХ и полистироловые микропланшеты. Учет результатов ферментативной реакции проводили на спектрофотометре Micro-ELISAReaderMR-580 непосредственно в лунках микроплат при длине волны 490 nm после остановки ферментативной реакции путем добавления 50 мкл 1N раствора H_2SO_4 .

Результаты исследований. С целью отработки параметров и условий проведения непрямого ELISA определяли:

- концентрацию (разведения) хламидийного антигена для адсорбции на поверхность микроплат. Антиген адсорбировали в разведениях от 1:80 до 1:1280;
- pH и молярность адсорбционного буферного раствора (исследовали буферные системы с pH от 5,0 до 9,6);
- концентрацию (разведения) антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов;
- время, температуру инкубации на каждом этапе проведения анализа.

Специфические сыворотки использовали в разведениях от 1:100 до 1:6400-12800, контрольные (отрицательные) – в разведениях от 1:100 до 1:400. Исследуемые сыворотки считали положительными, если $D_{490}(Op)$ в 2 и более раз превосходила среднее значение $D_{490}(K)$ контрольной (отрицательной) сыворотки в том же разведении. За титр сыворотки принимали ее максимальное разведение, при котором $D_{490}(Op)$ в 2 и более раз превосходила $D_{490}(K)$ среднего значения контрольной (отрицательной) сыворотки. Известно, что на эффективность связывания биологических молекул полистиролом оказывает влияние pH и молярность адсорбционного буферного раствора. Для определения оптимального значения pH адсорбцию антигена проводили в ацетатной, фосфатной и Na-бикарбонатной буферной системах с pH 5,0 -5,2; 7,2 -7,4; 9,4- 9,6. Результаты исследований оценивали по значениям D_{490} , полученным при раститровке хламидийной и контрольной (отрицательной) сывороток на специфический антиген. Показано, что максимальное значение $D_{490} = D_{490}(Op) - D_{490}(K)$ было определено при адсорбции антигена в 0,05 M Na бикарбонатной буферной системе при значениях pH = 9,4-9,6 и было равно более 1,4 оп.ед. Влияние времени и температуры инкубации на адсорбционные свойства антигена изучали при продолжительности адсорбции от 6 до 24 часов при $t=(4-6)^\circ C$ или 1 часа при $t=(36-38)^\circ C$. Определяли концентрацию антигена, оптимальную для адсорбции на планшеты. Для этого лиофилизированный препарат регидратировали в 1 см³ физиологического раство-

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

ра, рН 7,2-7,4, и из полученного раствора делали двукратные разведения на 0,05 М Na- бикарбонатном буферном растворе, рН 9,4-9,6, начиная от 1:80 до 1: 1280. Специфические хламидийные и контрольные (отрицательные) сыворотки овец и КРС использовали в разведении 1:100. Установлено, что величина D_{490} в диапазоне разведений антигена 1:80 – 1:640 для хламидийных сывороток составляла 0,8-1,2 оп.ед., а при разведениях более 1:640 начинала снижаться до 0,5-0,7 оп.ед. Величина D_{490} для контрольных (отрицательных) сывороток во всех диапазонах антигена составляла 0,04-0,18 оп. ед. Таким образом, оптимальным разведением хламидийного антигена для адсорбции на полистироловые планшеты, обеспечивающим достоверное различие результатов, является 1:320-1:640, при этом фоновые значения D_{490} для контрольных (отрицательных) сывороток не превышает 0,20 оп. ед. Концентрацию (в расчете на ПХ) анти – IgG(баран) – ПХ и анти-IgG(быка) – ПХ определяли методом растрировки на контрольные хламидийную и отрицательную сыворотки, связанные с адсорбированным в лунки планшет хламидийным антигеном. Рабочая концентрация конъюгата анти-IgG(баран) - ПХ составила 250 нг/см³, для конъюгата анти- IgG(бык) – ПХ – 400 нг/см³, при этом D_{490} имела, соответственно, значения 1,4 оп.ед.и 1,2 оп.ед., а $D_{490}(K)$ – менее 0,18оп.ед. При спектрофотометрическом измерении результатов для разграничения определений «положительная» и «отрицательная» исследовали сыворотки экспериментально инфицированных хламидийным антигеном (n=20) и заведомо здоровых (n=20) овец и КРС. Предварительно сыворотки были проверены в РСК. Установлено, что положительные в РСК сыворотки овец при исследовании в непрямом ELISA имели значения D_{490} от 0,275 до 1,65, сыворотки КРС – от 0,250 до 1,43, а отрицательные – от 0,05 до 0,185. Специфические хламидийные антитела в сыворотках крови иммунизированных животных были определены на 10 – 12 дни после последнего введения антигена.

Исследовали в непрямом ELISA 2900 проб сывороток крови овец 1300 проб сывороток крови крупного рогатого скота из хозяйств, неблагополучных по хламидиозу. Специфические хламидийные антитела были определены у 65,5 % и у 52,9 % крупного рогатого скота. Параллельно сыворотки были проверены в РСК. Установлена корреляция результатов ($r = 92$; $p \leq 0,05$) ИФА и РСК, однако РСК была менее чувствительна при исследовании слабopоложительных сывороток. Отсутствие реакции с сыворотками клинически здоровых овец и крупного рогатого скота, производителей лечебных и гипериммунных сывороток свидетельствует о высокой специфичности разработанных тест-систем.

Выводы. В результате проведенных исследований отработаны параметры и условия проведения непрямого ELISA для определения хламидийных антител в сыворотках крови овец и крупного рогатого скота. Были проведены комиссионные испытания, результаты которых показали, что разработанные тест-системы ELISA для индикации специфических к хламидиям антител в сыворотках крови имеют высокую чувствительность и специфичность и могут быть рекомендованы для экспресс-диагностики и массового скрининга овец и крупного рогатого скота.

Список литературы

1. Инфекционная патология животных; т.5, Хламидиозы.//Под ред. А.Я. Самуйленко, В.Н.Сюрина, Е.С. Воронина, – М. – 2003, – С. 58-65.
2. Anderson, I.E., Herring, A.J., Jones, G.E., Low, J.C., Greig, A./ Development and evaluation of indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera//Vet.Microb. – 1995. – 43. P. 1-12.
3. Charan, S., Gautam, O.P./Application of enzyme-linked immunosorbent assay in Veterinary medicine: a bibliography// Vet. Res. Commun. 1984. – v.8. P. 255-267.
4. Everett, D.G. / Chlamydia and Chlamydiales: more than meet eye// Vet.microb. – 2000. – 75. – P. 108-126.
5. Guichon, A., Inzana, T.J., Scimeca, J.M., Zajiac, A./ Laboratory diagnosis of zoonotic infection: chlamydial, fungal, viral and parasitic infections obtained from companion and laboratory animals.//Cumulative Techniques and procedures in Clinical microb. –1996. – №5. – P. 1-23.

WORKING OUT OF TEST SYSTEM IFA FOR DIAGNOSTICS OF THE CHLAMIDYA INFECTION

Lyl'kova L.S., Yeremets V.I., Samuylenko A.J., Malysheva M.A.

All-Russian Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo, Moscow Region

Yamnikova S.S.

Scientific-Research Institute of Virology of RAMS named after D.I. Ivanovsky

Researches on working out of test system indirect are conducted with the help of microplate of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for indication Chlamydia antibodies in whey of blood sheep and KRS. Parameters and conditions of carrying out of the analysis are defined: concentration a specific antigen for adsorption, morality and pH adsorption a buffer solution, time and incubation temperature at each stage analysis. Commission test have show that test system had the high sensitivity and specificity. Correlation of results is established ELISA and RSK. Test systems of indirect ELISA for indication of specific antibodies are recommended for diagnostics of a chlamydiosis and mass screening of sheep and KRS.

УДК 619:616.98:579.852.11:615.371

ИЗГОТОВЛЕНИЕ СИБИРЕЯЗВЕННОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВОСИБИРЕЯЗВЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ

Лягоскин И. В., Архипова Г. Ф., Васина Н.К., Селянинов Ю.О.

*Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, Россельхозакадемии
г. Покров, Владимирская область*

С момента создания первых противосибиреязвенных вакцин и до настоящего времени ученые многих стран занимаются вопросом разработки метода, позволяющего объективно оценивать напряженность индуцируемого иммунитета. В значительной степени это обусловлено необходимостью контроля существующих и вновь разрабатываемых вакцин, а также тем, что, несмотря на хорошо отлаженную систему противоэпизоотических мероприятий, даже в экономически развитых странах все еще имеют место спорадические случаи заболевания животных сибирской язвы.

Особенности возбудителя, а также широкое распространение данной болезни в прошлом, указывают на то, что вакцинация сельскохозяйственных животных против сибирской язвы является единственным эффективным способом предупреждения возникновения эпизоотических вспышек этого инфекционного заболевания на территории РФ. Поэтому в РФ вакцинация животных против сибирской язвы является обязательной и проводится ежегодно.