

На правах рукописи

КАЛИНИНА Елена Николаевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВЕЗИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ**

06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Владимир – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

**Научный
руководитель:**

Фомина Светлана Николаевна
кандидат ветеринарных наук

**Официальные
оппоненты:**

Капустина Ольга Владимировна
доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»;

Ломакина Наталья Фёдоровна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Ведущая организация: ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук

Защита состоится 15 декабря 2020 года в 14.00 на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрвец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.arriah.ru ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир.

Автореферат разослан _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Везикулярная болезнь свиней (ВБС, *Morbus vesicularis suum*) – контагиозная болезнь свиней, вызываемая вирусом семейства Picornaviridae, рода Enterovirus. К болезни восприимчивы свиньи (*Sus scrofa*) и пекариевые (*Tayassuidae*).

По клиническим симптомам ВБС не отличима от других болезней свиней с везикулярным синдромом, в том числе от ящура и серьезно препятствует международной торговле. По этой же причине в странах Евросоюза уделяется особое внимание лабораторной диагностике ВБС [Niedbalsky W., 2017; Yang M. et al., 2020]. Ряд авторов также не исключают, что болезнь может существовать в азиатских странах и в некоторых странах восточной Европы, оставаясь незамеченной в виду своей особенности протекать бессимптомно [Dekker A., 2000; Hui-Wen Huang et al., 2018]. Так как искоренение ВБС экономически не выгодно, контроль заболевания сводится к мероприятиям, направленным на недопущение заноса инфекции на территорию государств, свободных от болезни. Как правило, выявляют заболевших экспортируемых животных по наличию вирусспецифических антител. Для этого наиболее широко используется иммуноферментный анализ и реакция нейтрализации вируса [De Clercq K., 1998; Bellini S. et al., 2010].

На территории Российской Федерации ВБС не регистрировалась. В соответствии с Решением Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 г. № 317 (ред. от 02.06.2020 г.) к ввозу на таможенную территорию ЕАЭС допускаются здоровые племенные и пользовательные свиньи, происходящие с территорий, свободных от ВБС в течение последних 24 месяцев, при этом во время карантина проводятся диагностические исследования на наличие антител к вирусу ВБС.

Значительно усложняет лабораторную диагностику ВБС возможность выявления «singleton reactors» - ложно положительных результатов при обнаружении антител в сыворотке крови животных, зараженных другими энтеровирусами, из-за их перекрестной реакции в серологических методах с вирусом (антигеном) ВБС [Pannwitz G. et al., 2009; Moonen P. et al., 2000]. Для того, чтобы минимизировать долю подобных неспецифических реакций, помимо основного скринингового теста для массовых исследований,

необходимо дополнительно иметь подтверждающие тест-системы, позволяющие более подробно составить серологический профиль обследуемого животного [Yang M. et al., 2020].

В связи с вышеизложенным перед нами стояла задача разработать тест-системы для обнаружения антигена ВБС и вирусспецифических антител, а также рациональную схему их применения на практике.

Степень разработанности проблемы. Лабораторной диагностике ВБС посвящен ряд работ, как иностранных, так и отечественных авторов [Кременчугская С.Р., 1990; Bellinin S. et al., 2007; Brocchi E. et al., 2007; Луговская Н.Н и соав., 2011; Тимина А.М. и соав, 2013].

При клиническом течении болезни для диагностики и дифференциальной диагностики ВБС от болезней с везикулярным синдромом у свиней, по рекомендациям МЭБ, используют вирусвыделение в культуре клеток, обнаружение вирусного генома методом полимеразной цепной реакции, либо проводят выявление антигена вируса в патологическом материале методом ИФА с использованием МАт 5В7 [Manual of Diagnostic Tests, 2019].

Доминирующими методами при выявлении больных животных при субклиническом течении болезни являются серологические, включая вируснейтрализующий тест с использованием чувствительных клеточных культур [Niedbalsky W. et al., 2017]. За рубежом используются более современные экспрессные, высокоточные методы обнаружения антител против ВБС на основе изотипоспецифического ИФА [M. Yang et al., 2020; W. Xu et al., 2017], конкурентного «сэндвич»-ИФА с использованием МАт, принцип которого положен в основу диагностического набора PrioCHECK SVDV Ab Kit [Brocchi E. et al., 1997]. На момент начала наших исследований в лабораторной практике для обнаружения антигена вируса ВБС и вирусспецифических антител применялись реакция связывания комплемента и жидкофазный блокирующий «сэндвич»-ИФА.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования было усовершенствовать лабораторную диагностику и разработать схему мониторинговых исследований на ВБС на основе современных экспресс-методов. В связи с этим необходимо было решить следующие задачи:

- адаптировать к культурам клеток свиного происхождения и депонировать в качестве производственного для изготовления средств диагностики штамм «№2348 Италия/2008» вируса ВБС;

- получить специфические компоненты для ИФА: антиген вируса ВБС, реконвалесцентную и гипериммунную сыворотку крови свиней в разные сроки после заражения и дополнительной иммунизации штаммами «№463 Одесса/1972» и «№2348 Италия/2008» вируса ВБС;

- разработать тест-систему на основе непрямого варианта ИФА и сравнить ее по чувствительности и специфичности с конкурентным «сэндвич»-вариантом ИФА, реакцией микронеutralизации вируса ВБС в культуре клеток, коммерческим набором для обнаружения антител против вируса ВБС;

- оптимизировать на основе коммерческого препарата моноклональных антител ИФА тест-систему для обнаружения антигена вируса ВБС;

- разработать методику постановки реакции микронеutralизации вируса ВБС в культуре клеток;

- применить разработанные тест-системы и схему комплексного использования перечисленных методов в лабораторных диагностических исследованиях.

Научная новизна. Штамм «№2348 Италия/2008» вируса ВБС адаптирован к перевиваемым культурам клеток IB-RS-2 и ПСГК-30 и депонирован в качестве производственного для изготовления средств диагностики. Из штаммов «№463 Одесса/1972» и «№2348 Италия/2008» вируса ВБС получены антигены, использованные для производства компонентов диагностического набора и диагностических тест-систем.

Введена в практику мониторинговых исследований схема комплексного использования методов лабораторной диагностики для обнаружения вирусспецифических антител к вирусу ВБС, включающая в себя:

- тест-систему на основе непрямого варианта ИФА;

- тест-систему на основе конкурентного «сэндвич»-варианта ИФА с использованием МАт 5В7;

- реакцию микронеutralизации вируса ВБС в культуре клеток IB-RS-2.

Оптимизирована тест-система для обнаружения антигена вируса ВБС на основе «сэндвич»-варианта ИФА с использованием антигена вируса ВБС из штамма «№2348 Италия/2008» и МАт 5В7.

Определена необходимость постоянного применения предложенной схемы мониторинговых исследований эпизоотической ситуации в Российской Федерации по ВБС: с помощью разработанного комплекса диагностических методов с 2008 по 2020 гг. были проведены серомониторинговые исследования 161 696 проб сыворотки крови свиней, поступивших в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате проведенных исследований разработаны и применяются:

«Методические рекомендации по получению антигена вируса везикулярной болезни свиней для использования в непрямом варианте иммуноферментного анализа», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 08.02.2008 г.;

«Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу везикулярной болезни свиней в непрямом варианте иммуноферментного анализа», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 08.02.2008 г.;

«Методические рекомендации по обнаружению антигена вируса везикулярной болезни свиней в «сэндвич»-варианте ИФА с использованием моноклональных антител 5В7», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 02.12.2019 г.;

«Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу везикулярной болезни свиней в реакции микронейтрализации», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 02.12.2019 г.

На основе Н-ИФА разработан и выпускается «Набор для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней», одобренный ученым советом 11.09.2009 г.

Депонирован в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» штамм «№2348 Италия/2008» вируса везикулярной болезни свиней в качестве производственного для изготовления средств диагностики.

Методология и методы исследования. В работе применяли культуральные, вирусологические, серологические и физико-химические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

- адаптация штамма «№2348 Италия/2008» вируса ВБС к перевиваемым культурам клеток IB-RS-2 и ПСГК-30 и депонирование как производственного для изготовления средств диагностики в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ»;
- получение антигена вируса ВБС;
- получение реконвалесцентной и гипериммунной сыворотки крови естественно-восприимчивых животных в разные сроки после заражения штаммом вируса ВБС «№463 Одесса/1972» и «№2348 Италия/2008» для разработки и контроля средств диагностики, производства диагностического набора;
- тест-система на основе С-ИФА для выявления антигена вируса ВБС;
- схема мониторинговых исследований на наличие специфических антител к вирусу ВБС, включающая исследования с использованием: набора для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней; КС-ИФА и РМН вируса ВБС в культуре клеток;
- результаты серомониторинга проб сыворотки крови свиней, ввезенных на территорию Российской Федерации и поступивших на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» за период с 2008 по 2020 гг.

Степень достоверности и апробация результатов. По теме диссертационной работы опубликовано восемь научных статей, из них четыре в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России. Материалы диссертационной работы докладывались на заседаниях Ученого совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2008 по 2020 гг., на VII Междунар. научно-практ. конференции «Экология и инновации» (г. Витебск, 2008 г.), на IX Междунар. научно-практ. конференции «Рациональное природопользование» (г. Витебск, 2010 г.), на заседании Научно-технического совета Россельхознадзора 27 февраля 2020 г. Достоверность проведенных исследований подтверждена результатами комиссионных испытаний.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах, иллюстрирована 19 рисунками, 28 таблицами, содержит 6 приложений, подтверждающих достоверность выполненных работ и ее практическую значимость. Список литературы содержит 133 источника, из которых 52 отечественных и 81 зарубежных авторов.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы

Штаммы вируса ВБС. Штамм вируса ВБС «№463 Одесса/1972» из рабочей коллекции референтной лаборатории диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ» и штамм «№2348 Италия/2008», депонированный в ходе работы.

Культура клеток. СП (первично-трипсинизированная КК почки свиньи); IB-RS-2 (перевиваемая КК почки свиньи); ПСГК-30 (перевиваемая линия клеток свиного происхождения).

Животные. Клинически здоровые свиньи весом не менее 40-45 кг.

Специфические компоненты для ИФА.

- 43 образца специфической сыворотки крови, полученные от свиней, экспериментально зараженных вирусом ВБС штамм «№463 Одесса/1972»;

- 25 образцов специфической сыворотки крови, полученные от свиней, экспериментально зараженных вирусом ВБС штамм «№2348 Италия/2008»;

- 161 696 образцов «полевой» сыворотки крови от клинически здоровых свиней из свиноводческих предприятий РФ за период с 2008 по 2020 гг.;

- гетерологичные пробы сыворотки крови свиней после заражения различными возбудителями;

- образцы культуры клеток, культуральных вирусосодержащих жидкостей и концентрированного очищенного антигена вируса ВБС с разной концентрацией вирусного белка;

- пробы патологического материала от больных животных с везикулярными поражениями.

Коммерческие диагностические препараты и наборы.

- конъюгат вторичных кроличьих антител против иммуноглобулинов G свиньи с пероксидазой хрена производства «SIGMA-ALDRICH» (США);

- улавливающие МАт 5В7 против вируса ВБС и МАт 5В7, конъюгированные с пероксидазой хрена, производства «IZSLER» (Италия);
- референтный набор для выявления антител против вируса ВБС Prionics SVDV Ab Kit «Prionics Lelystad B.V.» (Нидерланды).

2.2 Методы

Адаптация вируса ВБС к культуре клеток. С целью адаптации вируса ВБС к клеточным культурам свиного происхождения проводили серию последовательных пассажей до появления 100% ЦПД.

Вирусвыделение на культуре клеток. Материалом для выделения вируса ВБС служили пробы патологического материала от больных животных: эпителий везикулярных поражений и афтозная лимфа, фекалии. Вирусвыделение проводили в КК IB-RS-2.

Определение инфекционной активности вируса. Титр инфекционной активности вируса ВБС определяли микрометодом в КК IB-RS-2 по конечной точке титрования и выражали в lg ТЦД₅₀/50 мкл.

Получение антигена вируса ВБС. Исходным материалом для получения антигена служила вируссодержащая суспензия, полученная репродукцией вируса ВБС штамма «№463 Одесса/1972» и штамма «№2348 Италия/2008» в КК IB-RS-2 с титром инфекционной активности $7,53 \pm 0,6$ lg ТЦД₅₀/50мкл и $7,73 \pm 0,6$ lg ТЦД₅₀/50мкл, соответственно. Качество антигена оценивали с помощью электрофореза в 12% ДСН-ПААГ.

Иммуноферментный анализ. Для обнаружения антигена вируса использовали С-ИФА с МАт 5В7 в качестве улавливающих и МАт 5В7, конъюгированные с ферментом, в качестве детекторных антител.

Основным скрининговым тестом для обнаружения антител к вирусу ВБС предложен Н-ИФА. Пробы сыворотки крови свиней вносили в разведении 1:40 на планшет, сенсibilизированный антигеном вируса ВБС, с последующей детекцией при помощи конъюгата вторичных кроличьих антител против IgG свиньи с ферментом.

В качестве субстратно-индикаторной смеси в ИФА использовали АБТС. Реакцию останавливали внесением 1% раствора додецилсульфата натрия. Учет результатов проводили на спектрофотометре при длине волны 405нм.

КС-ИФА использовали как подтверждающий тест согласно «Методическим рекомендациям по выявлению специфических антител к вирусу везикулярной болезни свиней в конкурентном «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител 5В7», разработанным в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [Луговская Н.Н. и соав., 2011].

Реакция микронеutralизации вируса ВБС. РМН использовали как дополнительный метод исследования проб сыворотки крови свиней на наличие антител к вирусу ВБС. При проведении РМН исследуемые и контрольный образцы сыворотки инкубировали в культуральной планшете с рабочей дозой вируса ВБС. Затем вносили КК IB-RS-2, которая выступала как индикаторная система, позволяющая установить наличие не нейтрализованного вируса. Учет результатов РМН проводили, регистрируя наличие/отсутствие характерного специфического ЦПД при помощи инвертированного микроскопа. Расчет титра проводили по формуле Кербера [Chenard G. et al., 1998].

Определение валидационных характеристик тест-систем. Для доказательства возможности применения разработанных тест-систем с целью получения достоверных результатов определяли основные валидационные характеристики согласно рекомендациям МЭБ [Jacobson R.H., 1998].

Учет и статистическая обработка результатов исследований. Компьютерный учет результатов ИФА проводили с помощью программы для регистрации, обработки, хранения результатов иммуноферментного анализа в ветеринарии "СИНКО-ИФА" (ELIZA 7, версия 1.90). Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Office Excel 2018.

2.3 Результаты исследований

Адаптация штамма «№2348 Италия/2008» вируса ВБС к культурам клеток. Для производства диагностических препаратов в ФГБУ «ВНИИЗЖ» использовали штамм «№463 Одесса/1972», полученный из ГНУ ВНИИВВиМ, выделенный при вспышке ВБС на территории Одесской области в 1972 г., принадлежащий ко II филогенетической группе единственного сероварианта вируса ВБС. С целью расширения диапазона выявления вирусспецифических антител был изучен штамм вируса ВБС, выделенный в 2008 г. в Италии, принадлежащий к IV филогенетической группе [Broschi E. et al., 1997; Borrego V. et al., 2000]. Штамм был получен из Всемирной справочной

лаборатории МЭБ по ящуру (Пербрайт, Великобритания). С целью адаптации штамма «№2348 Италия/2008» к клеточным культурам было проведено три слепых пассажа на КК СП, пять пассажей на КК ПСГК-30, восемь пассажей на КК IB-RS-2. Результаты приведены в таблице 1.

На культурах клеток ПСГК-30, как и на IB-RS-2, в конечном итоге развивалось 100% ЦПД. На первых двух пассажах для этого требовалось до 48 часов, но уже к третьему пассажиру на IB-RS-2 время полного разрушения монослоя сократилось до 18 часов, а вирус на протяжении последующих пяти пассажей имел стабильный титр инфекционной активности в интервале $7,47 \pm 0,6 \lg \text{TCID}_{50}/50 \text{ мкл}$. Не удалось добиться признаков репродукции вируса на первичной клеточной культуре СП. Для дальнейшей работы использовали культуру клеток IB-RS-2.

Таблица 1 – Адаптационные характеристики штамма «№2348 Италия/2008» вируса ВБС на культурах клеток свиного происхождения

Культура клеток	Номер пассажира	Наличие ЦПД, время проявления	Титр инфекционной активности в РМН, $\lg \text{TCID}_{50}/50 \text{ мкл}$
СП	I	отсутствовало	-
ПСГК-30	I	100% ЦПД, 48 ч	н/и [□]
IB-RS-2	I	100% ЦПД, 48 ч	н/и
СП	II	отсутствовало	-
ПСГК-30	II	100% ЦПД, 48 ч	н/и
IB-RS-2	II	100% ЦПД, 24 ч	н/и
СП	III	отсутствовало	-
ПСГК-30	III	100% ЦПД, 21 ч	н/и
IB-RS-2	III	100% ЦПД, 18 ч	$7,8 \pm 0,6$
ПСГК-30	IV	100% ЦПД, 18 ч	н/и
IB-RS-2	IV	100% ЦПД, 18 ч	$7,8 \pm 0,6$
ПСГК-30	V	100% ЦПД, 18 ч	н/и
IB-RS-2	V	100% ЦПД, 18 ч	$7,73 \pm 0,6$
IB-RS-2	VI	100% ЦПД, 18 ч	$6,98 \pm 0,6$
IB-RS-2	VII	100% ЦПД, 18 ч	$7,73 \pm 0,6$
IB-RS-2	VIII	100% ЦПД, 18 ч	$6,75 \pm 0,6$

□ - исследование не проводилось

Получение антигена вируса ВБС. На первом этапе очистки вирусосодержащей суспензии применяли прием «замораживание-оттаивание», способствовавший более полному выходу вируса, с последующим осаждением клеточного детрита при $1\ 500\ g$ в течение 30 минут. На втором этапе проводили концентрирование вируса ВБС полиэтиленгликолем (мол. м. 6000Д) с дополнительной очисткой трихлорметаном и последующим осаждением вируса через 20%-й раствор сахарозы при $110\ 000\ g$ в течение трех часов.

Анализ пептидного состава в ДСН-ПААГ показал наличие белков с мол. м. в диапазоне от 25 до 35 кД, что соответствует мол. м. структурных белков VP1-VP3 вируса. Примесь клеточных белков оставалась незначительной даже при концентрировании исходной вирусосодержащей суспензии в 350 раз. Оптимальным способом инактивации полученного препарата концентрированного вируса ВБС был признан способ термоинактивирования на водяной бане в течение 60 минут при $(56,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ непосредственно перед использованием в ИФА. Хранили не инактивированный препарат при температуре минус $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$. Авирулентность антигенного препарата проверяли методом трехкратного слепого пассирования в КК IB-RS-2.

Получение реконвалесцентной и гипериммунной сывороток крови свиней против вируса ВБС. Сыворотку крови естественно-восприимчивых животных получали экспериментально, заражая поросят интрадермально штаммами «№463 Одесса/1972» и «№2348 Италия/2008» вируса ВБС. На 21 день после инфицирования, заболевших животных дополнительно иммунизировали. Активность сывороточных образцов указана в таблице 2.

Таблица 2 – Активность образцов сыворотки крови свиней, полученных в разные сроки после заражения и иммунизации штаммами вируса ВБС в различных тест-системах n=3

Штамм вируса ВБС	Сутки после заражения	Образцы сыворотки крови свиней с диапазоном активности в:			
		Н-ИФА	КС-ИФА	PrioCHECK SVDV	PMH
«№2348 Италия/2008»	0	< 1:40	< 1:10	< 1:5	1:16
	4	< 1:40 - 1:60	< 1:10 - 1:20	1:10 - 1:20	1:64 - 1:128
	7	1:160 - 1:480	1:120 - 1:960	1:80 - 1:960	1:384 - 1:512
	11	1:480 - 1:960	1:120 - 1:640	1:120 - 1:960	1:512 - 1:768
	15	1:320 - 1:480	1:120 - 1:480	1:60 - 1:640	1:384 - 1:512
	21	1:240 - 1:480	1:60 - 1:120	1:30 - 1:320	1:256 - 1:512
	25 (4 ДПИ*)	1:480 - 1:960	1:240 - 1:480	1:80 - 1:320	1:1024 - 1:3072
	29 (8 ДПИ)	1:5120 - 1:10240	1:1920 - 1:3840	1:960 - 1:1280	1:6144 - 1:8192
31 (10 ДПИ)	1:15360	1:3840 - 1:5120	1:5120 - 1:7680	1: 6144 - 1:8192	
«№463 Одесса/1972»	28 (7ДПИ)	1:40960	-	>1:15360	>1:15360

В итоге был получен патологический материал в виде афт, а также 68 образцов сыворотки крови свиней, отобранных в разные сроки после заражения и дополнительной иммунизации.

Оптимизация постановки «сэндвич»-ИФА для обнаружения антигена вируса ВБС. Оптимизирована методика постановки С-ИФА, рекомендованная МЭБ для дифференциальной диагностики ВБС и ящура, на основе коммерческого препарата МАт 5В7 и контрольного антигена из штамма вируса ВБС «№2348 Италия/2008».

Методика обладает 100%-ой специфичностью, чувствительностью и точностью метода и может быть использована для обнаружения антигена вируса ВБС, а также для оценки качества антигенного препарата, получаемого для серологических реакций.

Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА. Рабочее разведение компонентов Н-ИФА определяли с использованием положительного, отрицательного контролей и реконвалесцентной сыворотки крови свиньи, отобранной на 4 ДПЗ вирусом ВБС.

Оптимальным считали наибольшее разведение компонентов, при котором отношение значения ОП положительного контроля (S) к значению ОП отрицательного контроля (N) было наибольшим, при этом сыворотка, отобранная на 4 ДПЗ, демонстрировала положительный результат. Одновременно тестировались варианты буферного раствора (указаны в таблице 3) для блокирования иммунологического планшета, а также для разведения испытуемых сывороток и конъюгата антивидовых антител.

Вариант постановки теста с блокированием планшета 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в сочетании с использованием трис-буферного раствора с твином, дополненного 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФС КРС) и рабочим разведением 1:40 для контрольных и исследуемых сывороток, оказался оптимальным и использовался в последующем для постановки реакции.

Сокращение времени инкубирования каждой стадии реакции до 30 минут при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ существенно не влияло на результаты исследований, при этом снижало время проведения анализа.

При расчете позитивно-негативного порога реакции тестировали 3395 проб сыворотки крови от клинически здоровых свиней и 50 проб, полученных от животных, экспериментально зараженных вирусом ВБС (рисунок 1). Было установлено, что сыворотку следует считать отрицательной, если ПП < 10%; положительной, если ПП \geq 20%. Результаты, полученные в диапазоне от 10 до 20%, следует считать сомнительными. Пробы, демонстрировавшие значения ПП в этих пределах исследовались дополнительно.

Таблица 3 – Влияние различных вариантов буферных растворов на значения оптических плотностей образца контрольной сыворотки, полученной на 4 день после заражения вирусом ВБС, в разведении 1:40
n \geq 3

Раствор для		ОП К ⁺⁺	ОП К ⁻	ПП, % сыворотки на 4 ДПЗ	S/N
блокирования пустых мест на сорбенте	разведения исслед. сыворотки и конъюгата				
без блока	5% ФС КРС	1,055±0,025	0,176±0,023	8,99(отриц)	5,99±0,02
	10% ФС КРС	1,369±0,042	0,230±0,027	11,94(сомн)	5,95±0,02
	20% ФС КРС	1,233±0,034	0,219±0,013	17,06 (сомн)	5,63±0,02
	5% НС лошади	1,277±0,018	0,198±0,002	9,18 (отриц)	6,45±0,01
1% БСА	5% ФС КРС	1,154±0,012	0,197±0,009	12,96(сомн)	5,85±0,01
	10% ФС КРС	1,267±0,011	0,195±0,007	19,40(сомн)	6,49±0,01
	20% ФС КРС	1,142±0,036	0,411±0,015	0,14 (отриц)	2,78±0,02
	5% НС лошади	1,168±0,031	0,222±0,014	6,55 (отриц)	5,26±0,02
5% БСА	5% ФС КРС	1,062±0,021	0,155±0,017	17,09(сомн)	6,85±0,02
	10% ФС КРС	1,401±0,010	0,192±0,008	20,07 (полож)	7,29±0,01
	20% ФС КРС	0,926±0,091	0,277±0,032	10,94 (сомн)	3,25±0,03
	5% НС лошади	1,000±0,013	0,147±0,011	15,59 (сомн)	6,80±0,01
5% НС лошади	5% ФС КРС	1,408±0,030	0,259±0,021	16,80 (сомн)	5,43±0,02
	10% ФС КРС	1,141±0,015	0,191±0,004	21,26(полож)	5,97±0,01
	20% ФС КРС	1,201±0,051	0,390±0,024	3,53 (отриц)	3,36±0,02

Примечание: ОП К⁺⁺ - значение оптической плотности сильно положительного контроля; ОП К⁻ - значение оптической плотности отрицательного контроля; S/N – отношение значения оптической плотности положительного контроля к значению оптической плотности отрицательного контроля; НС лошади – нормальная сыворотка крови лошади

Для предложенного Н-ИФА были рассчитаны значения основных валидационных характеристик: DSn – 96,8%, DSp – 87,9%, Ac – 92,2%. Значение стандартного отклонения при оценке воспроизводимости метода не превышало 6,9% для положительных и 2,6% для отрицательных проб.



Рисунок 1 – Распределение значений ПП для проб сыворотки крови свиней, содержащих и не содержащих антитела к вирусу ВБС

Значения относительной чувствительности и специфичности Н-ИФА относительно ЖБС-ИФА, КС-ИФА и РМН, составили: $Se - 93,1\%$, $Sr - 85,7\%$ (рисунок 2).



Рисунок 2 – Значения показателей относительной чувствительности и специфичности для ИФА и РМН

Разработанный Н-ИФА в сравнении с используемым ранее ЖБС-ИФА имеет ряд преимуществ: простую схему постановки, что в несколько раз сокращает продолжительность проведения анализа и минимизирует вероятность ошибки исполнителем. Минимальный компонентный состав Н-ИФА значительно сокращает время и упрощает процедуру получения специфических компонентов, что делает его ценным инструментом при массовом скрининге большого количества проб. На основании метода определения антител к вирусу ВБС в Н-ИФА был разработан диагностический «Набор для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней». Набор прошел комиссионные испытания, был одобрен ученым советом и утвержден директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 11.09.2009 г. Межведомственные комиссионные испытания набора проведены 06.07.2010 г.

Разработка реакции микронеutralизации вируса ВБС в культуре клеток IB-RS-2. По рекомендациям МЭБ, реакция микронеutralизации вируса является доказательным методом обнаружения вирусспецифических антител к вирусу ВБС. Для проведения РМН использовали вирус ВБС, штамм «№2348 Италия/2008» с титром инфекционной активности $6,8 \pm 0,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/50 \text{ мкл}$ и культуру клеток IB-RS-2 с концентрацией $(0,8-1,0) \times 10^6/\text{см}^3$.

Реакция РМН ставилась против 100 ТЦД_{50} . В качестве контрольного образца использовали сыворотку крови свиньи с титром в РМН 1:256 ($8 \log_2$), полученную на 21 ДПЗ в опыте с заражением свиней вирусом ВБС, штамм «№2348 Италия/2008». Опытным путем было установлено, что планшет необходимо инкубировать не менее 60-72 ч. в CO_2 -инкубаторе с содержанием 5% углекислого газа.

При определении позитивно-негативного порога реакции исследовали 199 проб сыворотки крови свиней от клинически здоровых животных и от свиней, переболевших ящуром. В качестве положительных образцов использовали 17 проб сыворотки крови поросят, инфицированных штаммом «№2348 Италия/2008» вируса ВБС (рисунок 3).

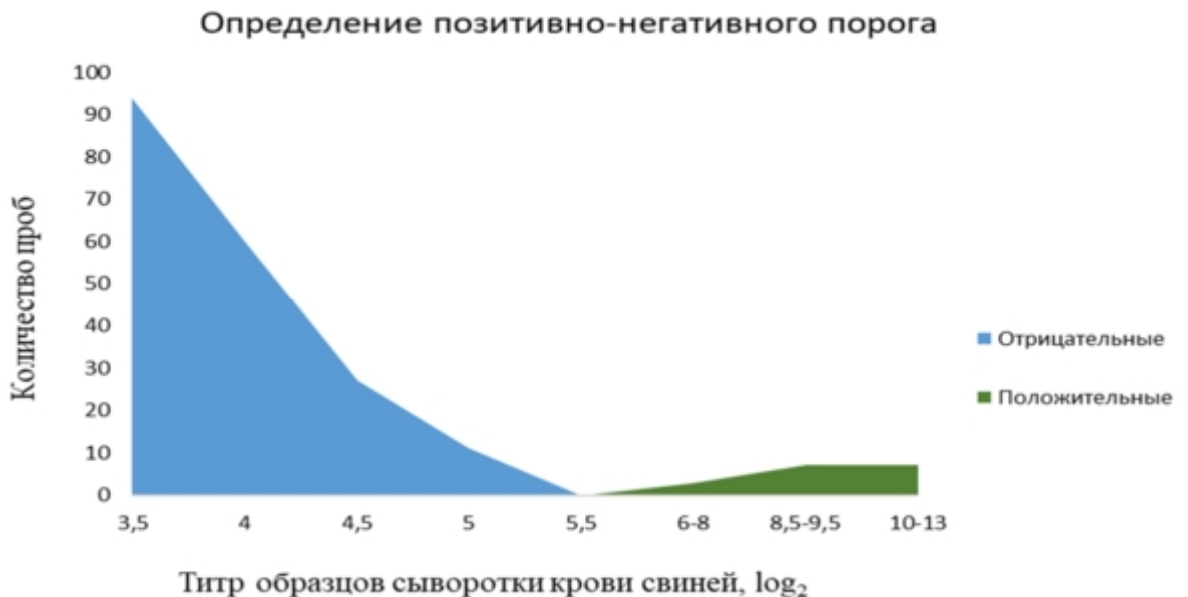


Рисунок 3 – Количественное распределение образцов сыворотки крови свиней в зависимости от титра в РМН

Для РМН были определены значения показателей валидационных характеристик: $DSn - 100\%$, $DSp - 99,6\%$, $Ac - 99,6\%$, свидетельствовавшие об эффективности данного метода при обнаружении антител к вирусу ВБС. В результате исследования было установлено значение порогового титра 1:48 ($5,5 \log_2$) и критерии интерпретации результатов:

при титре $<1:48$ образец не содержит антител к вирусу ВБС;

при титре $\geq 1:48$ образец квалифицируется как положительный, содержащий вируснейтрализующие антитела против вируса ВБС.

Схема мониторинговых исследований на наличие антител к вирусу ВБС. При выборе варианта ИФА, подходящего для мониторинга ВБС, наиболее быстрым, легко осуществимым и воспроизводимым являлся Н-ИФА. Он имел ряд преимуществ перед ЖБС-ИФА: простую схему постановки, в 10 раз сократив продолжительность проведения и минимальный компонентный состав, значительно сокративший время и упростивший процедуру получения специфических компонентов реакции. Результаты скрининга проб в данной тест-системе хорошо согласовывались с результатами ЖБС-ИФА, РМН, КС-ИФА и референтного теста Ceditest SVDV Ab (рисунок 4), что позволило включить Н-ИФА в схему мониторинговых исследований на ВБС.

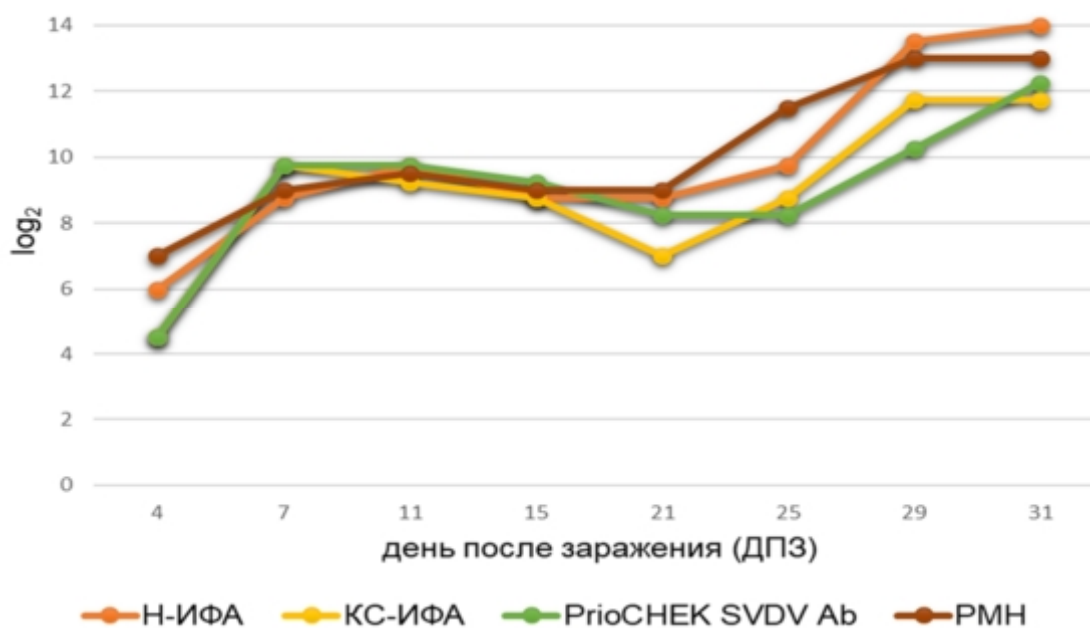


Рисунок 4 – Титры проб сыворотки крови свиней в РМН и ИФА, после заражения штаммом «№2348 Италия/2008» вируса ВБС

Этапы схемы мониторинговых исследований:

1. первичный скрининг проб сыворотки крови свиней в Н-ИФА;
2. повторное исследование проб, интерпретированных как «положительные» или «сомнительные», в КС-ИФА;
3. подтверждение результатов в РМН вируса ВБС для проб, повторно демонстрировавших «положительные» результаты в КС-ИФА;
4. при получении «положительных» результатов во всех трех тест-системах – повторные исследования проб сыворотки крови через две-три недели: в хозяйства отправлялся запрос о повторном предоставлении биоматериала (сыворотки крови от конкретных животных либо образцов фекалий) для повторных исследований.

Результат мониторинга проб сыворотки крови свиней, импортированных на территорию хозяйств РФ за период с 2008 по 2020 гг. С 2008 по 2020 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» было исследовано более 160 тысяч проб из 34 субъектов Российской Федерации от животных, ввезенных из стран Европы и Северной Америки. Динамика поступления проб и результаты исследования приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследований проб сыворотки крови свиней на ВБС с использованием мониторинговой схемы в период с 2008 по 2020 гг.

Год	Общее количество проб, шт	Сомнительные и ложно положительные результаты, полученные при исследовании в:			Результаты РМН при повторном отборе биоматериала
		Н-ИФА	КС-ИФА	РМН	
2008	20995	128 (0,60) □	79 (0,37)	12 (0,05)	0 Выделен PEV9
2009	6691	54 (0,80)	10 (0,15)	0	н/и
2010	6136	127 (2,06)	37 (0,60)	2 (0,03)	0
2011	22912	314 (1,37)	43 (0,18)	3 (0,01)	0
2012	52987	1497 (2,82)	84 (0,16)	20 (0,04)	0
2013	17625	205 (1,16)	0	н/и	н/и
2014	3902	96 (2,46)	0	н/и	н/и
2015	3250	39 (1,20)	2 (0,06)	0	н/и
2016	4887	88 (1,80)	0	н/и	н/и
2017	5924	254 (4,28)	0	н/и	н/и
2018	5708	167 (2,92)	1 (0,01)	0	н/и
2019	4062	176 (4,30)	10 (0,24)	0	н/и
I полугодие 2020	6617	34(0,51)	10 (0,15)	0	н/и
Всего	161696	3179 (1,96)	276 (0,17)	37 (0,02)	0

Примечание: □ - в скобках указан процент от общего числа исследованных за год проб
н/и - исследование не проводилось

Как видно из таблицы, процент сомнительных и ложно положительных результатов, полученных изначально в Н-ИФА, колебался в разные годы не превышал 1,96% от общего числа исследованных образцов. В КС-ИФА этот показатель на порядок меньше и не превышал 0,17%. В РМН количество ложно положительных проб в среднем составило 0,02% от общего числа.

Количество ложноположительных результатов, получаемых в КС-ИФА с моноклональными антителами 5В7 и в РМН, по литературным данным, колеблется в диапазоне от 0,11 до 0,45 % [De Clercq K., 1998], что, по мнению автора, обусловлено явлением «singleton reactors» [Pannwitz G. et al., 2009] и связано с выявлением антител к другим энтеровирусам, перекрестно реагирующих с вирусом ВБС.

При повторном исследовании биоматериала, отобранного через две-три недели от тех же животных, получили отрицательные результаты, за исключением двух случаев повторного обнаружения антител в сыворотке крови свиней, перекрестно реагирующих в РМН с вирусом ВБС, но уже в значительно более низких титрах, наблюдавшихся в 2008 и 2010 годах. От данных животных

был выделен в 2008 г. энтеровирус свиней 9 серотипа (PEV9), в 2010 г. вирус выделить не удалось.

Внедрение в практику ИФА в качестве основного скринингового теста, а КС-ИФА и РМН в качестве подтверждающих, позволило значительно повысить качество и эффективность мониторинга и лабораторной диагностики ВБС. Кроме этого, предложенная схема тестирования сыворотки крови свиней на наличие антител к вирусу ВБС успешно применялась для исследований при участии референтной лаборатории диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», начиная с 2009 г., в международных квалификационных испытаниях, организуемых Европейским сообществом референтных лабораторий по ящуру и везикулярной болезни свиней и Всемирной референтной лабораторией МЭБ по ящуру (Пербрайт, Великобритания).

В сывороточных образцах, при помощи предложенных тест-систем на основе ИФА и РМН, успешно выявляли антитела к штаммам вируса ВБС, принадлежащим к разным генетическим линиям, начиная с шестого дня после заражения. Антигены вируса ВБС неинфекционной панели и антигены, полученные после вирусвыделения инфекционной панели, успешно выявляли при помощи предложенного С-ИФА с использованием МАт 5В7.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования:

1. Вирус ВБС, штамм «№2348 Италия/2008» адаптирован к перевиваемым КК IB-RS-2 и ПСГК-30 и депонирован как производственный для средств диагностики. Из штамма получен вирусосодержащий культуральный материал с активностью, определенной микрометодом в КК IB-RS-2 в диапазоне от 6,98 до 7,8 lg ТЦД₅₀/50 мкл.

2. На основе штаммов «№463 Одесса/1972» и «№2348 Италия/2008» вируса ВБС получены очищенные, концентрированные антигены с контролем качества электрофорезом в ПААГ для использования в ИФА и иммунизации естественно-восприимчивых животных.

3. С использованием афтозной суспензии и культурального вирусного концентрата вируса ВБС штаммов «№463 Одесса/1972» и

«№2348 Италия/2008», проведены опыты по заражению естественно-восприимчивых животных, в результате которых получены:

- афтозный материал, заложенный на хранение в рабочую коллекцию штаммов микроорганизмов референтной лаборатории диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

- реконвалесцентная и гипериммунная сыворотка крови свиней в разные сроки после заражения и иммунизации. Полученная сыворотка используется в качестве положительных контролей в применяемых внутри лаборатории тест-системах и для серийного производства диагностического набора.

4. Получены компоненты и оптимизированы условия постановки «сэндвич»-варианта ИФА, позволяющего идентифицировать антиген вируса ВБС в культуральном и биологическом вирусосодержащем материале.

5. Разработана тест-система на основе непрямого варианта ИФА для обнаружения антител к вирусу ВБС в сыворотке крови свиней. Для реакции установлен позитивно-негативный порог в 10%, рассчитана диагностическая чувствительность – 96,8%, относительная чувствительность – 93,1%, диагностическая специфичность – 87,9%, относительная специфичность – 85,7%, точности метода – 92,2%. На основе предложенной тест-системы разработан «Набор для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней», одобренный ученым советом ФГУ «ВНИИЗЖ» 11.09.2009 г.

6. Разработана тест-система для обнаружения вируснейтрализующих антител к вирусу ВБС в РМН вируса в культуре клеток. Определены показатели диагностической чувствительности – 100%, диагностической специфичности – 99,6% и точности метода – 99,6%.

7. На основе схемы диагностических исследований, включающей комплексное использование «Набора для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней» для первичного скрининга и подтверждающих тест-систем: КС-ИФА и РМН, за период с 2008 по 2020 гг. исследовано 161 696 проб сыворотки крови ввозимого на территорию РФ свинополовья на наличие антител к вирусу ВБС. Серопозитивных животных выявлено не было.

4 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГНУ ВНИИВВиМ – государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

ДПЗ – день после заражения

ДСН-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия

ЖБС-ИФА – жидкофазный блокирующий «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа

КК – культура клеток

КС-ИФА – конкурентный «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа

КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» – коллекция штаммов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»

МАт – моноклональные антитела

мол. м. – молекулярная масса

МЭБ – Международное эпизоотическое бюро

Н-ИФА – непрямой вариант иммуноферментного анализа

ОП – оптическая плотность

ПП – процент позитивности

РМН – реакция микронеутрализации на культуре клеток

С-ИФА – «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа

ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза

ЦПД – цитопатическое действие

Ac – точность метода

DSn – диагностическая чувствительность

DSp – диагностическая специфичность

Se – относительная чувствительность

Sp – относительная специфичность

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка и применение непрямого варианта иммуноферментного анализа для серомониторинга везикулярной болезни свиней / Н.Н. Луговская, **Е.Н. Харитонова**, С.Р. Кременчугская [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2009. – Т.7 – С. 101-114.

2. Дифференциальное обнаружение антигенов вирусов ящура типа О и везикулярной болезни свиней в иммуноферментном анализе / Н.Н. Луговская, **Е.Н. Харитонова**, С.Р. Кременчугская [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных, 2010 – Т. 8 – С. 25-31.

3. Обнаружение антигена вируса ящура типа О в блокирующем варианте иммуноферментного анализа с использованием специфических иммуноглобулинов кролика / **Е.Н. Харитонова**, Н.Н. Луговская, С.Р. Кременчугская [и др.] // Ветеринария и кормление, 2010. – № 6. – С. 33-36.

4. Сравнение разных вариантов иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу везикулярной болезни свиней в сыворотках крови от экспериментально зараженных животных / Н.Н. Луговская, **Е.Н. Харитонова**, В.В. Никифоров [и др.] // Вопросы вирусологии, 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 44-47.

5. Разработка непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу везикулярной болезни свиней при проведении мониторинговых исследований / Н.Н. Луговская, **Е.Н. Харитонова**, М.В. Жильцова [и др.] // Вопросы вирусологии, 2010. – Т. 55. – № 4. – С. 41-44.

6. **Харитонова, Е.Н.** Тестирование гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к вирусу ящура типа О / Е.Н. Харитонова, Н.Н. Луговская, В.В. Борисов // Ветеринария и кормление, 2010. – № 6. – С. 24-26.

7. Валидация методики определения уровня противоящурных антител в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа // Н.Н. Луговская, **Е.Н. Калинина**, К.С. Малкова [и др.] // Ветеринария сегодня, 2015. – № 3 (14). – С. 22-29.

8. Анализ результатов международных сличительных испытаний ФАО/МЭБ по диагностике ящура и везикулярной болезни свиней / С.Р. Кременчугская, Т.К. Майорова, **Е.Н. Калинина** [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных, 2018. – Т. 16: 60 лет ФГБУ "ВНИИЗЖ". – С. 282-292.

Подписано в печать 12 октября 2020 г.
Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.
Тираж 80 экз
Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»