

На правах рукописи

Губенко Олеся Григорьевна

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГ**

03.02.02 «Вирусология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2020

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

Научный руководитель: **Кононов Александр Владимирович**
кандидат ветеринарных наук

Официальные оппоненты: **Сухинин Александр Александрович**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный
университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ
ВО СПбГУВМ);

Живодеров Сергей Петрович
кандидат ветеринарных наук, заведующий
научно-экспериментальным отделом ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ
ФИЦВиМ).

Ведущая организация ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский и технологический институт
биологической промышленности» (ВНИТИБП)

Защита состоится 15 декабря 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрьевоц.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.ariah.ru

Автореферат разослан _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова
Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Вирус болезни Шмалленберг (БШ) (SBV) был выявлен в Германии (недалеко от города Шмалленберг) в ноябре 2011 года и с этого времени широко распространился среди стран ЕС - Германии, Голландии, Бельгии, Англии, Франции, Люксембургу, Италии, Дании, Швейцарии, Швеции, Польше и т.д.

Возбудителем болезни является вирус БШ, принадлежащий к семейству буньявирусы (Bunyaviridae), роду ортобуньявирусы (Orthobunyavirus). Анализ вирусных геномных последовательностей выявил сходство данного возбудителя с представителями серологической группы Simbu - Акабане, Айно и Шамонда, что позволило его отнести к серогруппе Симбу (Simbu serogroup)[Goller, K.V. et al.].

К заболеванию восприимчив крупный рогатый скот, овцы, козы, дикие жвачные (косули, лани, благородные олени) независимо от возрастных характеристик [De Regge, N. et al.].

Заболевание характеризуется желудочно-кишечными расстройствами, повышением температуры тела, высокой частотой абортов, мертворождений и смертностью среди новорожденных. Тяжелее заболевание протекает у овец и коз и характеризуется большим процентом гибели, истощением, поражением репродуктивных органов [De Regge, N. et al.].

Главным биологическим переносчиком вируса БШ являются мокрецы рода *Culicoides* (семейство *Ceratopogonidae*), одни из самых мелких кровососущих двукрылых насекомых комплекса «гну» [Глухова В.М.]. Распространение возбудителя тесно связано с количеством мошек, которое обычно достигает максимума в конце лета / начале осени (август / сентябрь) и резко падает, как только начинаются заморозки.

Проблема распространения БШ обусловлена тем, что Европейские ветеринарные службы практически не предпринимают никаких мер по купированию заболевания и не проводят профилактических ветеринарных мероприятий. Вследствие того, что БШ не регистрируется в МЭБ, оценить реальную картину распространения БШ не представляется возможным.

В России заболевание начали регистрировать с 2012 г. в Красноярском и Краснодарском крае, Московской, Псковской, Владимирской и Тверской областях.

За 2016-2018 гг. в литературе появлялись многочисленные данные о случаях повторного выявления антител к вирусу БШ в странах ЕС – Великобритании, Ирландии, Бельгии. Также выявлено массовое распространение данного возбудителя среди КРС в Эфиопии, Китае, и в популяции лошадей в Республике Иран.

Диагностику болезни проводят на основании комплекса методов, включающих в себя выявление вирусного генома методом ПЦР в реальном времени [Bilk et al.], а также выделение в культуре клеток насекомых (КС), золотистого хомячка (ВНК), почек обезьяны (Vero) или при интрацеребральном заражении мышей-сосунов как родственного вирус болезни Акабане. Для серологической диагностики применяют иммуноферментный анализ (ИФА), реакции непрямой иммунофлюоресценции и вируснейтрализации.

В настоящее время широкое распространение в лабораторной диагностике получил метод иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность и специфичность. Быстрота получения результатов, воспроизводимость и автоматизированный учет результатов реакции делают этот метод наиболее эффективным, удобным, экономичным для массовых серологических исследований.

Зарубежной коммерческой фирмой IDVET (Франция) предложены тест-системы на основе непрямого и конкурентного варианта ИФА для определения антител к вирусу БШ в сыворотках крови восприимчивых животных.

В связи с тем, что импортные наборы не всегда доступны и являются дорогостоящими, актуальным является создание отечественных тест-систем для выявления антител к вирусу БШ иммуноферментным методом, чтобы проводить надзор за распространением вируса БШ.

Кроме того, важными остаются проблемы поиска и подбора нового производственного штамма возбудителя, оптимизации методов его культивирования с целью получения вирусного антигена для дальнейшей разработки отечественных диагностических тест-систем.

В связи с этим, актуальной задачей также стала разработка тест-системы на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА с целью контроля вирусного антигена на различных этапах его получения и в дальнейшем для технологического контроля при производстве вакцины против вируса БШ.

1.2 Степень разработанности проблемы. Проблеме появления и распространения вируса БШ посвящены многочисленные отечественные и зарубежные работы.

Выявление вирусного генома проводят методом ПЦР в реальном времени [Bilk, S. et al.], а также выделение в культуре клеток насекомых (КС), золотистого хомячка (ВНК), почек обезьяны (Vero).

Зарубежной коммерческой фирмой IDVET (Франция) предложены тест-системы на основе непрямого и конкурентного варианта ИФА для определения антител к вирусу БШ в сыворотках крови восприимчивых животных.

Исходя из литературных данных, в РФ отсутствует серологический метод диагностики вируса БШ, что говорит о необходимости его разработки.

1.3 Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлась разработка диагностических тест-систем на основе полученного штамма вируса БШ для выявления антигена и антител к нему в сыворотках крови животных при проведении серологических исследований в ИФА.

Для решения поставленной цели необходимо было выполнить следующие задачи:

- 1) Адаптировать вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4» к перевиваемым линиям культур клеток;
- 2) Подобрать оптимальные условия культивирования вируса болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», обеспечивающие стабильное накопление вирусосодержащего материала;
- 3) Получить препараты антигена вируса БШ и специфические сыворотки лабораторных животных;
- 4) Разработать тест-систему на основе непрямого «сэндвич» - варианта ИФА для выявления антигена вируса БШ;
- 5) Разработать тест-систему на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу БШ в сыворотках крови восприимчивых животных.
- 6) Применить разработанные тест-системы в лабораторной диагностике.

1.4 Научная новизна результатов исследований. Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», выбранный в качестве диагностического, адаптирован к

перевиваемым линиям культур клеток, оптимизированы параметры его культивирования.

Разработаны отечественные тест-системы на основе иммуноферментного анализа с применением в качестве антигена штамма «ВН80/11-4» вируса болезни Шмалленберг:

Тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена.

Тест-система на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител в сыворотках крови восприимчивых животных.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы. Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», выбранный в качестве диагностического при разработке тест-систем на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса БШ и конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу БШ, адаптирован к перевиваемым линиям культур клеток.

Выделенный на территории Калининградской области изолят вируса БШ депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» как штамм «ВБШ/Калининград/2016» и может быть использован при разработке диагностических препаратов и их контроля при диагностике БШ КРС.

В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации разработаны, комиссионно проверены, утверждены на ученом совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие методические рекомендации:

1. Методические рекомендации по очистке и концентрированию антигена вируса болезни Шмалленберг;
2. Методические рекомендации по выявлению антигена вируса болезни Шмалленберг в твердофазном непрямом «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа;
3. Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в конкурентном варианте иммуноферментного анализа.

1.6 Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно восприимчивых животных. В работе использовали вирусологические (вирусовыделение, титрование вируса, РМН) молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция, секвенирование), серологические (непрямой и конкурентный вариант ИФА), а также физико-химические (составление растворов заданной молярности, центрифугирование, электрофорез) методы.

1.7 Основные положения, выносимые на защиту:

1. Адаптация вируса болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4» к перевиваемым линиям культур клеток и выбор оптимальных условий культивирования;
2. Получение препаратов антигена вируса болезни Шмалленберг;
3. Тест-система на основе «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена;
4. Тест-система на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител;
5. Результаты серологического исследования сывороток крови КРС, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с использованием разработанной тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА.

1.8 Личный вклад соискателя. Исследования по теме диссертационной работы (планирование и выполнение основных работ экспериментов, обобщение полученных результатов) проведены автором самостоятельно. Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы оказывали: к.б.н. Бьядовская О.П., к.б.н. Кононова С.В., к.б.н. Спрыгин А.В., к.б.н. Манин Б.Л., за что автор выражает им глубокую признательность.

Исследования по диссертационной работе были выполнены в период с 2015 по 2018 гг. в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

1.9 Апробация результатов работы. Результаты исследований по теме диссертации были опубликованы и доложены в материалах 4-й Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» с докладом - «Определение основных характеристик метода ИФА для выявления антител к вирусу болезни Шмалленберга в сыворотке крови крупного и мелкого рогатого скота» (Владимир, 2016), в материалах IX Всероссийской научно-практической конференции с докладом – «Разработка иммуноферментных методов диагностики вируса болезни Шмалленберг» (Москва, 2017).

1.10 Публикации результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для докторских и кандидатских диссертаций.

1.11 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические предложения и список литературы, который состоит из 127 источников, в том числе 30 работ на русском языке. Работа иллюстрирована 19 таблицами, 25 рисунками и дополнена приложением документов, подтверждающих внедрение результатов работы в ветеринарную практику.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

Вирусы. В работе использовали:

– штамм ВН80/11-4 вируса болезни Шмалленберг, полученный из Института Фридриха Леффлера (FLI, Германия, 2012г.), адаптированный к культуре клеток ВНК-СТ с титром инфекционной активности $3,0 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$;

– штамм вируса болезни Шмалленберг – «ВБШ/Калининград/2016», выделенный из проб биологического материала от КРС в Калининградской области в 2016 г.

Культуры клеток. Вирусологические исследования выполняли с использованием перевиваемых линий следующих культур клеток: ВНК-21/13 (перевиваемая линия культуры клеток почки сирийского хомяка); ПС (перевиваемая линия культуры клеток почки сайги); Vero (перевиваемая линия культуры клеток почки африканской зеленой мартышки); ПО (перевиваемая линия культуры клеток почка овцы); Mark-145 (перевиваемая линия культуры клеток почки африканской зеленой мартышки). Культуры клеток в виде готового монослоя получали из отдела культивирования клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Животные. Для получения специфических гипериммунных сывороток использовали клинически здоровых лабораторных животных: кроликов, массой 2 – 2,5 кг и морских свинок, массой 0,4 – 0,5 кг.

Специфические компоненты для проведения ИФА.

- очищенные инактивированные препараты антигена вируса БШ;
- специфическая гипериммунная сыворотка кролика и морской свинки;
- антивидовой конъюгат - иммуноглобулины против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (ИЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва или «Sigma»);
- исследуемые и контрольные препараты – полевые сыворотки крови КРС, МРС, поступившие в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из различных регионов РФ. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали референтные сыворотки (IDVET);
- гетерологичные сыворотки (вируса вирусной диареи КРС, вируса инфекционного ринотрахеита КРС, вируса парагриппа-3 КРС и вируса блютанга).

2.2 Методы

Выделение вируса БШ в культуре клеток. Материалом для исследований при выделении вируса БШ в культуре клеток являлась стабилизированная кровь.

Клетки крови осаждали центрифугированием в течение 10-15 минут при 1500 g, затем ресуспендировали забуферным физраствором (ЗФР) pH 7,2-7,4 и пересаждали, процедуру повторяли трижды. Отмытую клеточную фракцию ресуспендировали в стерильном ЗФР, доводя объем до первоначального. В полученных пробах разрушали клетки ультразвуковой вибрацией на приборе Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Германия) при амплитуде 16-18 мкм двукратно по 30 секунд с перерывом 60 секунд и использовали в качестве материала для выделения вируса в культуре клеток Vero.

Культивирование вируса БШ, получение и титрование вирусосодержащего материала. Для получения культурального вирусосодержащего материала монослойную культуру клеток ВНК-21/13, ПС Vero (24-48-часовой монослой культуры, выращенный в стационарных условиях) заражали вирусом БШ штамм ВН80/11-4 в дозе 0,002 ТЦД₅₀/кл. Вирус вносили после удаления ростовой среды, инкубировали в термостате при температуре (37±1)°С в течение 1 ч, а затем вносили поддерживающую среду ПСП (или аналог). Сбор вируса производили при проявлении ЦПД на 70-80% площади монослоя. Полученный вирус хранили при температуре не ниже минус (80±1)°С.

Определение инфекционной активности вируса проводили методом титрования, используя серию десятикратных разведений вирусосодержащего материала в 96-луночных культуральных планшетах с использованием монослойной культуры клеток Vero. Учет титрования проводили по цитопатогенному действию вируса в течение 96-120 ч. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Получение препаратов антигена. Очистку и концентрирование вирусосодержащего материала проводили в три этапа: низкоскоростное центрифугирование при 4000 g, далее центрифугирование при 32500 g и ультрацентрифугирование через слой 30% сахарозы при 140000 g в течение 2,5 ч.

Электрофорез. Для оценки степени чистоты и гомогенности концентрированного препарата вируса использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (Laemmli, 1970 г.).

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в препаратах антигена вируса БШ измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (10, 5, 2,5 и 1,25 мкг белка).

ПЦР-РВ. Нуклеиновую кислоту вируса БШ выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва). Постановку ПЦР-РВ с помощью набора Viral RNA kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции изготовителя. Для выявления генома вируса БШ использовали праймеры, амплифицирующие участок S-сегмента генома. ПЦР проводили согласно методике, разработанной Bilk et al. (2012 г.).

Иммунизация животных. Стерильный масляный адьювант Montanide ISA-70 смешивали в соотношении 1:1 с препаратом антигена вируса БШ штамм ВН80/11-4.

Кроликов иммунизировали в дозе 2 см³ трехкратно, морских свинок в дозе 1,0 см³ по общепринятой схеме, через 7, 14, 21 день инъекцию повторяли, меняя при этом место введения эмульсии.

Через 10-15 дней после окончания гипериммунизации доноров обескровливали и получали сыворотку крови, которую исследовали на активность и специфичность в РМН и ИФА.

Постановка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Реакцию ставили методом последовательных разведений, начиная с разведения 1:2, внося по 50 мкл соответствующих разведений антигена в лунки полистиролового планшета с предварительно адсорбированными в них улавливающими антителами. Далее связавшийся антиген выявляли с помощью детекторных антител. Все компоненты реакции добавляли в объеме 50 мкл, инкубировали при температуре 37±1°C. Для иммобилизации улавливающих антител использовали 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ). Тестируемые и контрольные пробы, детекторные антитела, антивидовой конъюгат разводили в буфере трис-НСl с 0,15 М NaCl, содержащим 0,05% Твин-20 и 0,1% обезжиренного сухого молока («Merck», Германия). Этот же буфер, но без добавления обезжиренного сухого молока, применяли для межэтапных промывок. В качестве субстрата использовали готовый раствор АВТС («MP Biomedicals, Inc», Франция). Реакцию останавливали добавлением 1% раствора додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм на ИФА-ридере «Sunrise» (Tecan, Австрия).

Титром антигена в испытуемом образце считали его последнее разведение, в котором величина оптической плотности (ОП) двукратно превышала ОП отрицательного контроля.

Постановка конкурентного варианта ИФА (К-ИФА). Лунки планшета сенсibilизировали антигеном, разведенным на карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) в концентрации 6,25-12,5 мкг/мл или 310-630 нг на лунку в объеме 50 мкл и инкубировали при 4±1°C в течение 18-20 ч. Затем содержимое лунок планшета удаляли. Для блокирования мест неспецифического связывания на твердофазном сорбенте вносили по 50 мкл блокирующего буфера ТБР с добавлением 1% обезжиренного сухого молока в лунки планшета и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37±1°C. После отмывания планшета отмывочным буфером ТБР-Т тестируемые и контрольные (отрицательные и положительные) сыворотки крови КРС, разведенные 1:2 вместе с сывороткой кролика в разведении 1:4000 на буфере ТБР-Т с добавлением 0,1% обезжиренного сухого молока вносили в объеме по 50 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37±1°C. Повторяли отмывку планшета, вносили конъюгат (антитела против IgG кролика) в рабочем разведении 1:2000 инкубировали в тех же условиях.

После отмывки вносили по 50 мкл субстрата АБТС, через 10-15 мин реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия (ДСН) и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

Вычисляли среднее значение оптической плотности (ОП) положительной и отрицательной контрольных сывороток и ОП лунок, не содержащих сыворотку -100% контроль ингибиции (КИ).

Реакцию учитывали, если разница между средними значениями ОП положительного и отрицательного контролей больше 0,25 о.е.

Вычисляли процент ингибиции (ПИ) тестируемых сывороток по формуле:

$ПП = (ОП \text{ сыв.} / ОП \text{ КИ}) \times 100\%$, где

ОП сыв – среднее значение тестируемой сыворотки,

ОП КИ – среднее значение контроля ингибиции.

Результат считался положительным, если ПИ меньше 45%, отрицательным, если ПИ больше 60%, от 45% до 60% - сомнительный результат.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки данных ИФА и построения графиков использовали компьютерную программу Statistika 10.0, (Stat.Soft, Inc., США) и программу Microsoft Office Excel 2016.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Адаптация вируса БШ штамм «ВН80/11-4» к культурам клеток.

Источником для получения препаратов антигена вируса БШ послужил референтный штамм «ВН80/11-4», полученный из Института Фридриха Леффлера (FLI, Германия, 2012 г.).

С целью адаптации вируса БШ штамм «ВН80/11-4» к культурам клеток было проведено по 5 последовательных пассажей в перевиваемых клеточных линиях ВНК-21/13, РС, Vero, ПО, Mark-145.

При заражении монослоя вирусом БШ динамика цитопатических изменений во всех культурах клеток была различна. Так в культуре клеток ВНК-21/13 на первом пассаже уже через 24 ч наблюдали округление клеток, в дальнейшем происходила их агрегация. К 48 ч культивирования практически большая часть клеток отслаивалась от стекла. С увеличением количества пассажей проявление ЦПД становилось более выраженным. К третьему пассажу наблюдали полное разрушение монослоя уже через 24 ч культивирования (рис. 1-2).

В культуре клеток Vero на первом – втором пассаже через 48-72 ч после инокуляции вируса, отмечали образование псевдосинцития (слияние наружных мембран клеток), но в дальнейшем происходило округление клеток и слияние их в конгломераты. С увеличением количества пассажей время работы вируса сократилось до 48 ч (рис. 3-4).

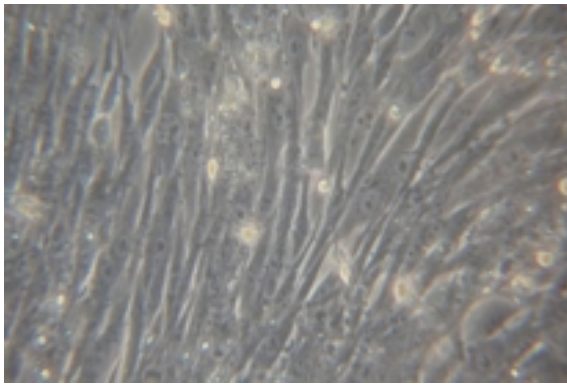


Рисунок 1 - Монослой 2-х суточный незараженной культуры клеток ВНК-21/13 (окуляр x10; объектив x40)

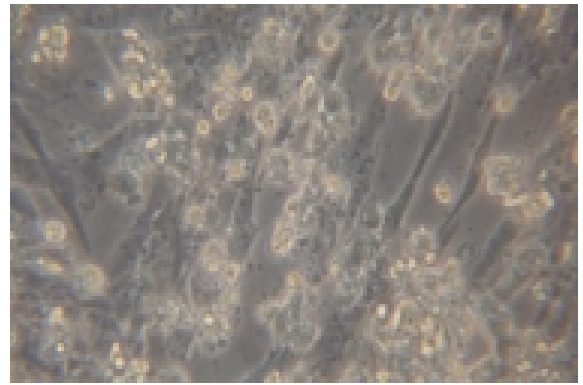


Рисунок 2 - Клетки монослоя культуры клеток ВНК-21/13, после инфицирования вирусом БШ через 24 ч (окуляр x10; объектив x40)

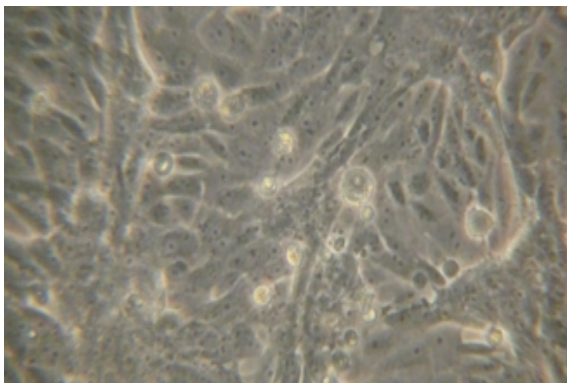


Рисунок 3 - Монослой 2-х суточный незараженной культуры клеток Vero (окуляр x10; объектив x40)

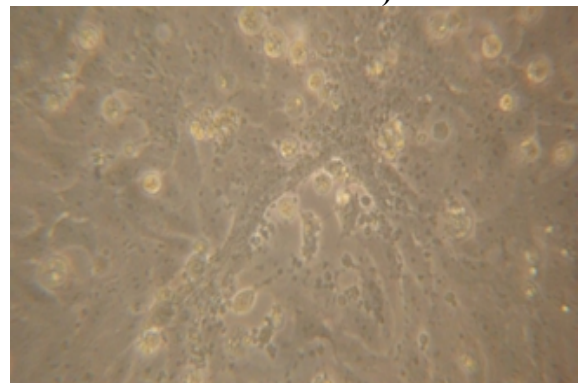


Рисунок 4 - Клетки монослоя культуры клеток Vero, после инфицирования вирусом БШ через 48 ч (окуляр x10; объектив x40)

Проявление ЦПД в культуре клеток ПС, характеризовалось образованием агрегатов поражённых вирусом клеток. К 72 ч культивирования большая часть клеток отслаивалась от стекла и деградировала до детрита, а не разрушенные поражённые клетки собирались в крупные конгломераты. Проведение каждого последующего пассажа приводило к усилению проявления ЦПД и сокращению времени работы вируса до 48 ч (рис. 5-6).

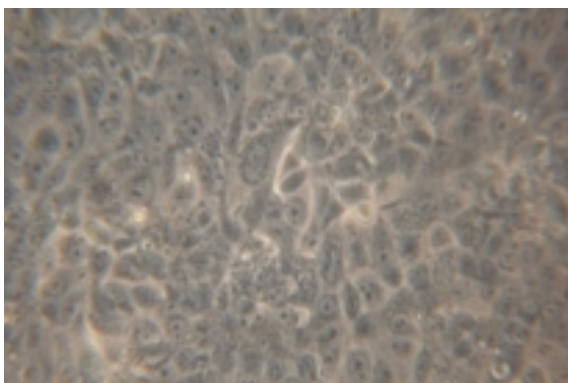


Рисунок 5 - Монослой 2-х суточный незараженной культуры клеток ПС (окуляр x10; объектив x40)

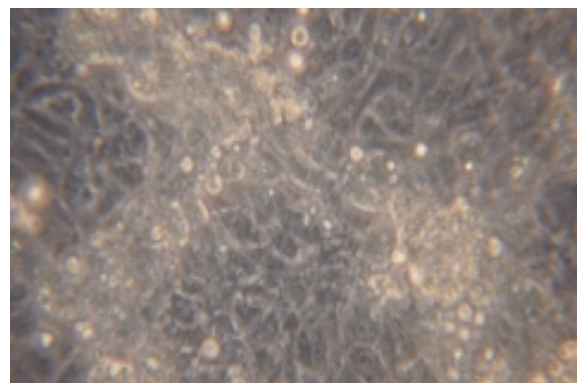


Рисунок 6 - Клетки монослоя культуры клеток ПС, после инфицирования вирусом БШ через 48 ч (окуляр x10; объектив x40)

В культуре клеток ПО и Mark-145 ЦПД вируса было менее выраженным. На 4-5 пассаже изменения монослоя клеток не наблюдали, состояние клеточного монослоя было аналогично незараженным клеткам.

При определении титра инфекционной активности методом микротитрования в культуре клеток Vero было установлено, что наибольшее накопление вируса БШ происходило в культуре клеток ВНК-21/13 и ПС. Титр вируса $4,77 \pm 0,14 - 4,88 \pm 0,22 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $4,80 \pm 0,14 - 4,81 \pm 0,03 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Культура клеток Vero была выбрана для проведения серологических исследований, в частности для постановки реакции микронеutralизации.

С целью оптимизации условий культивирования вируса в культурах клеток определяли оптимальную дозу заражения и время культивирования. Было установлено, что оптимальной дозой заражения вирусом БШ культур клеток ВНК-21/13 и ПС является $0,002 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$, время культивирования вируса 48-72 ч.

Данные результаты позволили использовать вирус БШ, репродуцированный в культурах клеток ВНК-21/13 и ПС, для получения антигена.

Разработка тест-системы на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА.

Разработка тест-системы на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА включала следующие этапы:

1. Процедура получения препаратов антигена вируса БШ;
2. Получение специфических к вирусу БШ гипериммунных сывороток крови кроликов и морских свинок;
3. Определение рабочих разведений улавливающих и детекторных антител;
4. Аprobация разработанной тест-системы при исследовании различных препаратов антигена вируса БШ

Получение препаратов антигена вируса БШ. Для очистки предварительно инактивированную 0,05% бета-пропиолактоном культуральную жидкость, содержащую вирус БШ, трижды замораживали и оттаивали, очищали от балластных белков и фрагментов клеток низкоскоростным центрифугированием при 4000 g (ROTANTA 460 R Hettich, Германия), далее полученную надосадочную жидкость центрифугировали при 32500 g с применением ротора JA-18 (Beckman Coulter, США). Образовавшийся после центрифугирования осадок растворяли в TNE-буфере и подвергали дальнейшему центрифугированию через слой 30% сахарозы при 140000 g в течение 2,5 ч с использованием ротора SW-28 (Beckman Coulter, США). Образовавшуюся надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в TNE-буфере в соотношении 10:1 и использовали в дальнейшем для разработки диагностических тест-систем на основе ИФА.

Для оценки специфичности препарата антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), что подтвердило наличие генома вируса БШ в препаратах.

Для оценки степени чистоты и гомогенности препаратов антигена использовали электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (Laemmli, 1970 г.).

На электрофореграмме вирусных белков выявлены полосы, соответствующие фракциям белков вируса БШ – G - 70kD, N - 42kD, NS - 26 kD, которые кодируются средней (M) и малой (S) молекулами РНК соответственно (рис.7). Таким образом, предлагаемый способ очистки являлся эффективным для вируса БШ.

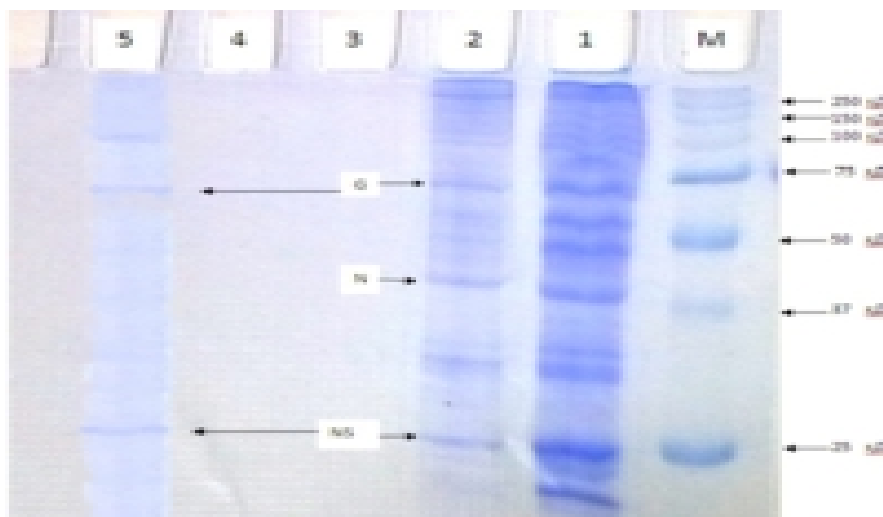


Рисунок 7 - Электрофореграмма вирусных белков:

М – белковый маркер, 1, 2, 5 – препараты очищенного антигена вируса БШ, 3, 4 – препараты 100х концентрата нормальной культуры ПС и ВНК-21/13.

Концентрация белка в препаратах антигена вируса БШ, измеренная по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина при длине волны 595 нм в исходном материале составила 9,01 мг/мл, после очистки – 0,25-0,5 мг/мл.

Получение специфических к вирусу БШ гипериммунных сывороток крови кроликов и морских свинок. С целью дальнейшей разработки тест-системы ИФА для диагностики БШ были получены специфические гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок.

Для этого антигеном вируса БШ трехкратно (с интервалом 7 дней) иммунизировали кроликов и морских свинок. Пробы сывороток крови отбирали до иммунизации, через 7,10 и 21 после первой иммунизации и исследовали в ИФА и РМН на наличие антител к вирусу БШ. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Активность сывороток крови кроликов и морских свинок, иммунизированных штаммом ВН80/11-4 вируса БШ, в РМН и ИФА

специфическая сыворотка	Уровень антител к вирусу БШ, разведение / log ₂					
	I иммунизация		II иммунизация		III иммунизация	
	ИФА	РМН	ИФА	РМН	ИФА	РМН
морской свинки	1:5000/ 12,2	1:32 - 1:64/ 5,0-6,0	1:10000/ 13,2	1:64 - 1:128/ 6,0-7,0	1:20000/ 14,2	1:512/ 9,0
кролика	1:8000/ 12,9	1:32 - 1:64/ 5,0-6,0	1:16000/ 13,9	1:64 - 1:256/ 6,0-8,0	1:32000/ 14,9	1:512-1:1024/ 9,0-10,0

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что уже на 7 день после первой иммунизации антигеном вируса БШ, в сыворотках крови кроликов и морских свинок образовывались специфические антитела в разведении от 12,2 log₂ до 12,9 log₂ в ИФА и от 5,0 log₂ до 6,0 log₂ в РМН. Активность полученных сывороток через 21 день после начала иммунизации достигла уровня 14,9 log₂ в ИФА и 10,0 log₂ в РМН.

Таким образом, проведенные исследования показали, что предложенная схема иммунизации доноров позволяла получить сыворотки с высоким содержанием

специфических антител. Высокие титры гипериммунных специфических сывороток крови кроликов и морских свинок свидетельствовали о достаточно хорошей антигенной активности полученных препаратов вируса БШ.

Определение рабочего разведения детекторных антител и антивидового конъюгата. Оптимальное разведение детекторных антител и антивидового конъюгата определяли путем постановки прямого варианта ИФА. В вертикальные ряды лунок планшета для ИФА вносили по 50 мкл серийных двукратных разведений специфической гипериммунной сыворотки морской свинки (детекторные антитела) в разведении с 1:200 до 1:25600 на КББ. Инкубировали в течение 18-20 ч при температуре $4\pm 1^\circ\text{C}$.

За рабочее разведение каждого из титруемых компонентов (детекторные антитела и антивидовой конъюгат) принимали последнее разведение каждого из них, обеспечивающее ОП 1,0-1,5 ед.

Таким образом, рабочее разведение детекторных антител и антивидового конъюгата, определенное в прямом варианте ИФА, составило 1:4000 и 1:1500 соответственно.

Определение рабочего разведения улавливающих антител. Определение рабочего разведения улавливающих антител (специфическая сыворотка кролика) проводили путем постановки непрямого «сэндвич»-варианта ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки), используя серийные разведения тестируемых антител и антиген содержащего культурального препарата с использованием детекторных антител морской свинки и антивидового конъюгата в рабочих разведениях.

За рабочее разведение улавливающих антител принимали последнее разведение, обеспечивающее ОП 1,0-1,5 ед., которое составило 1:7000.

Реакция с нормальной неинфицированной культурой клеток не превышала фоновый уровень.

Тестирование различных препаратов антигена вируса БШ с помощью разработанной тест-системы. С использованием разработанной методики проведено исследование 50 вирусосодержащих образцов, а также препаратов антигена на различных этапах очистки и концентрирования, проб биоматериала, полученного от здорового и подозреваемого на БШ скота. Все полученные препараты антигена были исследованы в ИФА и подтверждены в ПЦР-РВ. Для подтверждения результатов ИФА исследуемые материалы тестировали методом титрования в культуре клеток Vero. Результаты частично представлены в таблице 2, из которых видно, что разработанная тест-система ИФА позволяла выявлять вирус БШ, начиная с минимального титра - 1:4.

Специфичность метода непрямого «сэндвич»-варианта ИФА проверяли с использованием антигенов, полученных на гетерологичные штаммы (ротавируса, вируса инфекционного ринотрахеита, вируса вирусной диареи и вируса парагриппа-3 КРС). При определении специфичности реакции было показано, что активность улавливающих антител к вирусу БШ с гетерологичными антигенами не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной неинфицированной культурой клеток).

Таблица 2 - Исследование культуральных антигенов вируса БШ, а также антигена на различных этапах очистки методом ИФА, титрования и в ПЦР-РВ (n=3)

№ пробы	Характеристика исследуемого материала	Титр инфекц. акт-ти (lg ТЦД ₅₀ /см ³)	Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА		ПЦР-РВ
			Активность (титр)	Результат	
1	Вирусодержащая суспензия (5 пассаж в КК ВНК-21/13)	4,5±0,17	1:128	полож.	полож.
2	Вирусодержащая суспензия (5 пассаж в КК Vero)	3,5±0,09	1:64	полож.	полож.
3	Вирусодержащая суспензия (5 пассаж в КК ПС)	3,5±0,12	1:64	полож.	полож.
4	Вирусодержащая суспензия (6 пассаж в КК ПС)	4,0±0,14	1:128	полож.	полож.
5	Вирусодержащая суспензия после инактивации (6 пассаж в КК ПС)	н/и	1:128	полож.	полож.
6	концентрат антигена вируса БШ (x100)	н/и	1:512	полож.	полож.
7	элюаты №1-№4	н/и	1:16-1:32	полож.	полож.
8	биоматериал (стабилизированная кровь от клинически здорового КРС)	н/и	<1:4	отр.	отр.
9	биоматериал (стабилизированная кровь от подозреваемого в заболевании КРС)	н/и	1:4	полож.	полож.
10	нормальная культура Vero	отр.	<1:4	отр.	н/и*
11	нормальная культура почки сайги (ПС)	отр.	<1:4	отр.	н/и
12	Антиген вируса вирусной диареи (ВД) КРС	отр.	<1:4	отр.	н/и
13	Антиген вируса парагриппа-3 (ПГ-3) КРС	отр.	<1:4	отр.	н/и

Примечания (№ проб п/п):

Проба 7 – вирусодержащие суспензии (элюаты), полученные при очистке и концентрировании культуральной жидкости, содержащей вирус БШ;

Проба 9 – стабилизированная кровь, положительная к вирусу БШ (полученная от импортного скота, завезенного на территорию Калининградской области);

Пробы 12-13 – антигены, полученные на гетерологичные штаммы;

*н/и – не исследовали.

Разработка тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА (К-ИФА). Для разработки К-ИФА необходимо было:

1. Подобрать оптимальные условия постановки реакции;
2. Определить рабочее разведение специфической гипериммунной сыворотки кролика, антигена и конъюгата;
3. Определить допустимые значения оптических плотностей контрольных сывороток;
4. Определить позитивно-негативный порог разработанной тест-системы;
5. Исследовать пробы сывороток крови от восприимчивых животных с помощью разработанной тест-системы.

Подбор оптимальных условий постановки. Первым этапом разработки было исследование по подбору состава и концентрации различных буферных растворов для приготовления специфических иммунореагентов.

Антиген, разведенный в буфере КББ, адсорбировали на поверхности полистиролового планшета в течение 16-18 ч при $4\pm 1^\circ\text{C}$. Для последующих стадий ИФА использовали иммунореагенты, разведенные на буфере ТБР-Т. Режим инкубации специфических компонентов составил: $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 ч.

Следующей задачей исследований был подбор доступных и недорогих иммунологически индифферентных реагентов ко всем биологически активным компонентам тест-системы. С этой целью необходимо использование «блокирующего раствора», содержащего «инертный белок».

В наших исследованиях были проверены 1%, 3% раствор сухого молока («Merck»), 1%, 3% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Sigma») и 1%, 3% сыворотка крови лошади («Биолот», Санкт-Петербург). Результаты влияния блокирующих растворов на результаты реакции представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Влияние блокирующих растворов на результаты К-ИФА

(n=3)

Блокирующий раствор	Концентрации	ОП контрольных сывороток КРС		P/N*
		Отрицательная (N)	Положительная (P)	
Обезжиренное сухое молоко	1%	0,200±0,03	0,970±0,12	4,85±0,04
	3%	0,245±0,05	0,857±0,14	3,49±0,03
Сыворотка крови лошади	1%	0,389±0,09	0,892±0,11	2,29±0,01
	3%	0,345±0,08	0,854±0,12	2,47±0,02
Бычий сывороточный альбумин	1%	0,346±0,07	0,922±0,13	2,66±0,02
	3%	0,295±0,06	0,848±0,12	2,87±0,01

Примечание: P/N* - отношение оптической плотности положительной сыворотки к оптической плотности отрицательной сыворотки.

Представленные в таблице 3 данные показывают, что при использовании различных блокирующих растворов значения ОП отрицательных контрольных сывороток были практически одинаковыми, а средние значения ОП положительных контрольных сывороток крови КРС были выше при использовании 1% раствора обезжиренного сухого молока на буфере ТБР (P/N =4,85). Поэтому для блокирования свободных центров связывания лунок планшетов был выбран 1% раствор обезжиренного сухого молока

Определение оптимального разведения антивидового конъюгата. Одним из важных этапов в разработке ИФА является подбор оптимальной концентрации конъюгата. Для этого проводили разведение конъюгата в диапазоне от 1:100 до 1:3200 с применением отрицательной и положительной контрольной сыворотки в разведении 1:2. Критерием выбора считали наибольшее разведение конъюгата, при котором уровень неспецифической реакции его с отрицательной сывороткой был наиболее низким.

Полученные результаты в виде распределения показателей P/N в зависимости от разведения конъюгата показали, что наибольшее значение P/N (5,9) соответствовало разведению конъюгата 1:2000, которое и использовали в дальнейшей работе.

Определение оптимального разведения антигена и гипериммунной сыворотки кролика. Следующим этапом в разработке К-ИФА был подбор оптимального разведения концентрации гипериммунной сыворотки кролика и антигена, которое определяли путем постановки непрямого варианта ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки), используя серийные разведения тестируемых антител и антиген содержащего культурального препарата с использованием антивидового конъюгата, взятого в рабочем разведении.

За рабочее разведение каждого из титруемых компонентов (сыворотка кролика и антиген) принимали последнее разведение, обеспечивающее ОП 0,8-1,0 ед. Реакция с нормальной сывороткой кролика не должна была превышать фоновый уровень.

Исходя из полученных данных, рабочее разведение антигена вируса БШ, в котором значение P/N было наибольшим (5,5) составило 1:40. Это разведение и использовали в дальнейшей работе.

Определенное в ходе реакции рабочее разведение гипериммунной сыворотки кролика, которую использовали в качестве конкурентных антител, составило - 1:4000.

Определение допустимых значений оптических плотностей контрольных сывороток. При постановке реакции ИФА методом одного разведения необходимо было определить допустимые величины оптической плотности для контрольных положительных и отрицательных сывороток. Для этого определения данной величины были проанализированы соответствующие значения оптической плотности положительной (РС_х) контрольной сыворотки и контроля ингибиции (бессывороточного контроля) - (КИ_х).

Данные, полученные в ходе исследований, показали, что допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток должны быть следующие: для контроля ингибиции не ниже 0,745, для положительного контроля не выше 0,343, минимальная разница оптической плотности положительного контроля и контроля ингибиции не менее 0,40.

Определение позитивно-негативного порога. Важным этапом разработки и оптимизации ИФА является установление пороговых значений для интерпретации результатов реакции при постановке ИФА методом одного разведения. Позитивно-негативный порог реакции (ПНП) – это величина, различающая и разграничивающая неспецифический (отрицательный) и специфический (положительный) результат, полученный в реакции. С этой целью провели исследование 90 отрицательных сывороток крови от клинически здорового КРС, показавших отрицательный результат при тестировании набором IDVET (ФРАНЦИЯ). В качестве положительного и отрицательного контроля были взяты референтные контрольные сыворотки фирмы IDVET.

ПНП определяли путем расчета средних значений отношения (S/N) оптической плотности исследуемой сыворотки (S) к оптической плотности контроля ингибиции (КИ_х) для разведения 1:2 и стандартного отклонения (σ). Получили среднее значение S/N отрицательных сывороток равное 0,725 и стандартное отклонение - 0,103. Разница среднего значения S/N и двух стандартных отклонений определяли нижнюю границу отрицательных значений, а разница среднего значения S/N и трёх стандартных отклонений – верхнюю границу положительных значений.

Качественную оценку результатов определяли по значению величины процента ингибиции (ПИ): $PI = \frac{S}{N} \times 100\%$, при следующих пороговых значениях: результат

считался положительным: если ПИ меньше 45%, отрицательным, если ПИ больше 60%, интервал 45% - 60% - сомнительный результат.

Подтверждением правильности полученных показателей являлся представленный на рисунке 8 график частоты распределения 90 исследованных отрицательных и 229 положительных сывороток крови по значению ПИ.

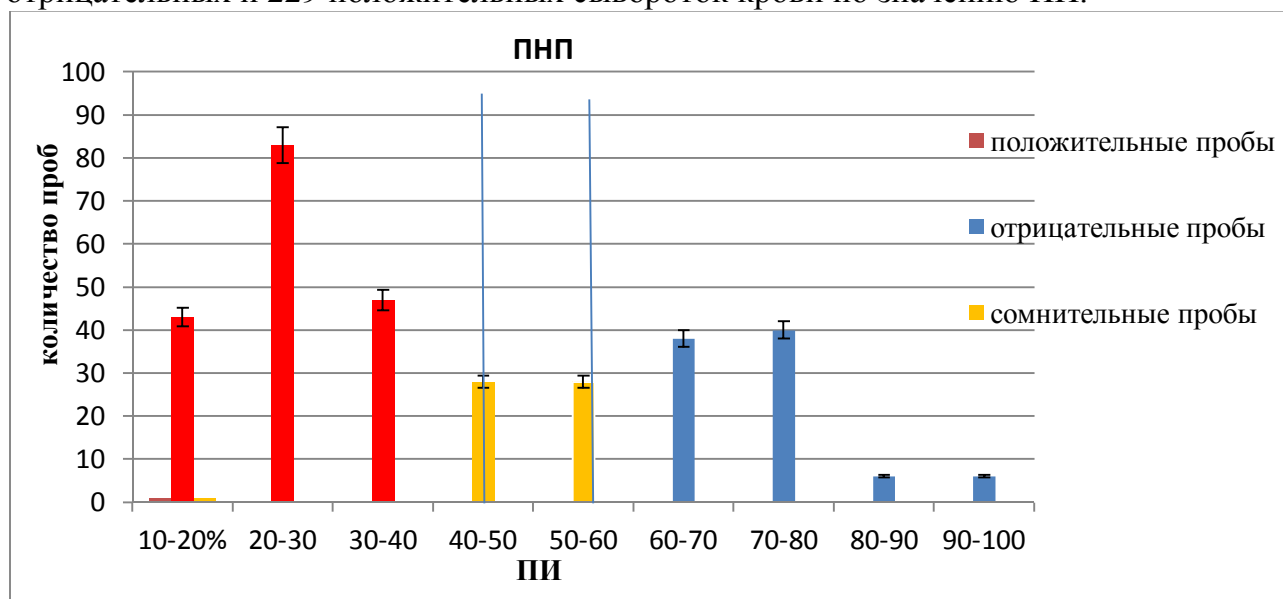


Рисунок 8 - Распределение проб сывороток крови по значению ПИ

Было установлено, что большинство отрицательных сывороток (n=77) имело значение ПИ в диапазоне от 60 до 80%, а основная часть положительных сывороток (n=193) имели значение ПИ в диапазоне 20-40%, 56 сывороток, определенных в коммерческом тесте как «сомнительные» имели значение ПИ в разработанном тесте в пределах от 50 до 60%, т.е. также показали «сомнительный» результат.

Исследование проб сывороток крови КРС с помощью разработанной тест-системы на основе К-ИФА. С использованием разработанной тест-системы проведено исследование 272 образцов сывороток крови от восприимчивых к вирусу БШ животных (КРС, МРС, диких жвачных – лань, муфлон, благородный олень), поступивших из различных регионов РФ. Результаты исследования сывороток крови в разработанной тест-системе полностью совпали с результатами, полученными при исследовании в коммерческом наборе IDVET (Франция). Данные исследований частично представлены в таблице 4.

Специфичность тест-системы проверяли с использованием референтных гетерологичных сывороток (к вирусу вирусной диареи КРС, вирусу инфекционного ринотрахеита КРС, вирусу парагриппа-3 КРС и вирусу блютанга) было показано, что активность антигена вируса БШ с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной сывороткой крови КРС).

Таблица 4 - Результаты исследований проб сывороток крови КРС с помощью разработанной тест-системы К-ИФА

Характеристика сыворотки	Результат IDVET	Результат в К-ИФА (% S/N)*		Совпадение Результатов +/-	
		1 повторность	2 повторность		
Сыворотки крови КРС, содержащие антитела к вирусу БШ в низких титрах	52% - сомнит.	50% - сомнит.	53% - сомнит.	+	
	55% - сомнит.	53% - сомнит.	53% - сомнит.	+	
	57% - сомнит.	56% - сомнит.	59% - сомнит.	+	
Сыворотки крови, не содержащие антител к вирусу БШ	80% - отриц.	76% - отриц.	81% - отриц.	+	
	77% - отриц.	79% - отриц.	81% - отриц.	+	
	75% - отриц.	78% - отриц.	70% - отриц.	+	
Сыворотки крови, содержащие антитела к вирусу БШ	КРС	33% - полож.	34% - полож.	38% - полож.	+
		25% - полож.	27% - полож.	28% - полож.	+
	МРС	36% - полож.	38% - полож.	37% - полож.	+
		21% - полож.	23% - полож.	24% - полож.	+
	европейский муфлон	25% - полож.	27% - полож.	25% - полож.	+
		34% - полож.	36% - полож.	34% - полож.	+
	европейская лань	22% - полож.	26% - полож.	25% - полож.	+
		36% - полож.	34% - полож.	35% - полож.	+
	благородный олень	21% - полож.	24% - полож.	23% - полож.	+
		33% - полож.	30% - полож.	32% - полож.	+
референтная пол. сыворотка («IDVET»)	22% - полож.	24% - полож.	34% - полож.	+	
референтная отр. сыворотка («IDVET»)	82% - отриц.	79% - отриц.	78% - отриц.	+	

Примечание: * - Результаты ИФА по отношению (S/N) в процентах:

- > 60% – отрицательно,
- < 45% – положительно,
- 45- 60% - сомнительно.

Определение основных валидационных характеристик разработанной иммуноферментной тест-системы на основе К-ИФА.

Определение относительной чувствительности, относительной специфичности и точности. С целью оценки относительной специфичности и чувствительности проводили сравнение результатов, полученных с применением разработанной тест-системы и при использовании коммерческого набора IDVET (Франция) с применением таблицы сопряженности 2×2, в которой наглядно представлены результаты исследования 272 сывороток крови КРС с помощью двух тест-систем.

Из 272 исследованных сывороток крови КРС, по результатам тестирования в разработанном наборе К-ИФА, 171 были положительными, 95 отрицательными. По результатам тестирования сывороток крови в иммуноферментном наборе IDVET эти значения составили 175 положительных, 97 отрицательных (табл.5).

Таблица 5 - Оценка относительной чувствительности и специфичности разработанной иммуноферментной тест-системы

IDVET	К-ИФА «ВНИИЗЖ»		
	положит	отр	всего
Положительных проб	171/ a	4/ c	175/ (a+c)
Отрицательных проб	2/ d	95/ b	97/ (d+b)
Всего проб	173	99	n=272

a – истинно положительные результаты

c – ложноотрицательные результаты

b – истинно отрицательные результаты

d – ложноположительные результаты.

Таким образом, рассчитанная с помощью матрицы сопряженности относительная чувствительность разработанной тест-системы при тестировании сывороток крови КРС относительно коммерческого иммуноферментного набора IDVET составила - 96%. Относительная специфичность разработанной тест-системы составила 97%.

По данным из таблицы 5 была определена точность разработанной тест-системы, которая показывала долю «правильных срабатываний теста» среди всех исследованных проб и является совокупным показателем информативности теста.

Значение точности составило - 97%, что свидетельствовало о хорошей согласованности метода с коммерческим набором.

Степень согласованности или *к-критерий*, составил – 0,95, который показал высокую (от 0,81 до 1,00) согласованность результатов исследований с диагностическим статусом образцов.

Определение воспроизводимости. Критерием воспроизводимости метода является величина коэффициента вариации (CV%), рассчитываемого как отношение среднеквадратического отклонения (σ) к среднему значению оптической плотности (OP_{cp}).

Для оценки воспроизводимости разработанной тест-системы использовали отрицательную и положительную контрольные сыворотки крови КРС, которые проверяли в 20 повторностях на двух различных планшетах с антигеном вируса БШ.

Полученные выборки значений ОП позволили рассчитать соответствующие средние величины, стандартное отклонение и 95% доверительный интервал оптических значений контролей.

В результате были получены статистически достоверные (95% достоверности) значения коэффициента вариации, который для положительной сыворотки составил 5,3%, для отрицательной сыворотки - 5,6%, что меньше допустимой величины в 10%.

Применение разработанной тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА.

Исследования сывороток крови КРС, полученных из регионов РФ на наличие антител к вирусу БШ. С 2015 по 2018 гг. с помощью разработанной тест-системы было протестировано 8933 пробы сывороток крови от местного (аборигенного) скота из регионов РФ (Нижегородской, Псковской, Калининградской, Тюменской, Воронежской) и от импортного скота, завезенного из стран ЕС (Дания, Польша, Венгрия, Швеция, Германия, Франция) на территорию РФ, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках выполнения государственного эпизоотологического

мониторинга. В 3525 пробах сывороток крови были обнаружены антитела к вирусу БШ, что составило 39,4% от общего количества исследованных проб.

На основе полученных данных была построена диаграмма, показывающая процент серопозитивных проб сывороток крови, полученных от местного и импортного скота (рис. 9).

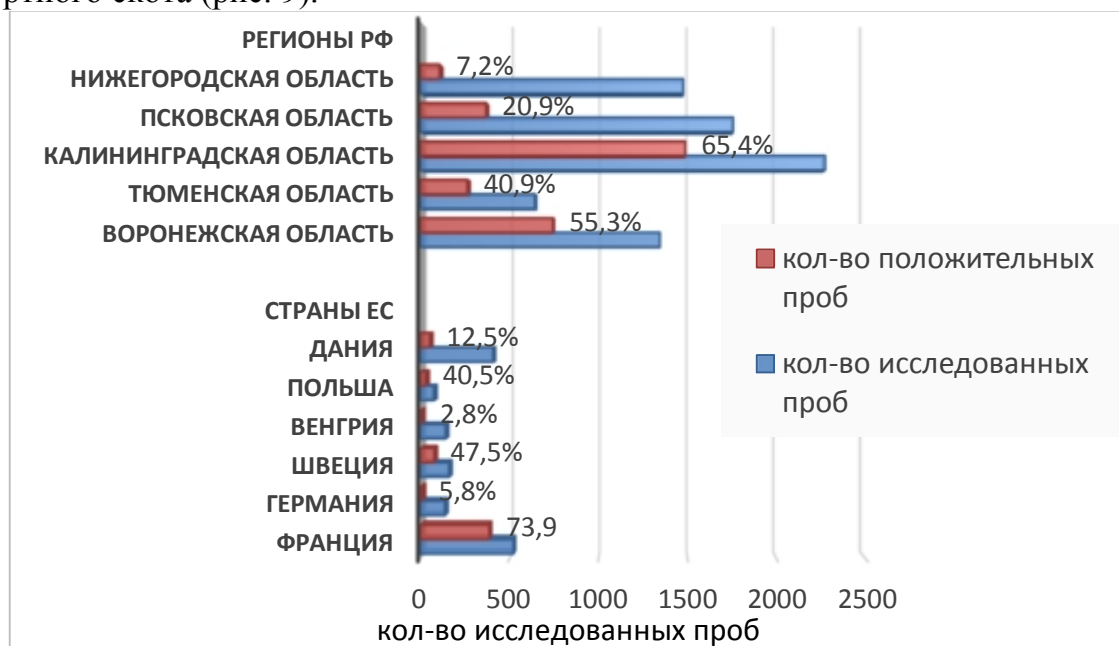


Рисунок 9 - Процент серопозитивных проб сывороток крови к вирусу БШ у местного (аборигенного) и импортного скота

На диаграмме видно, что наибольшее количество серопозитивных аборигенных животных выявлено в Калининградской, Псковской и Воронежской областях, в районах, граничащих со странами ЕС.

Кроме того, большое количество антител к вирусу БШ было выявлено у импортных животных, поступивших из таких стран ЕС, как Франция, Швеция, Дания, Польша.

Выявление сероконверсии при исследовании парных проб сывороток крови КРС из Калининградской и Псковской областей. С целью изучения сероконверсии в период с 2015 по 2016 гг. были проведены исследования парных проб сывороток крови, отбор которых проводился весной и осенью от местного (аборигенного) поголовья КРС Калининградской и Псковской областей (табл. 6).

Таблица 6 - Сероконверсия среди местного скота на территории Калининградской и Псковской областей за 2015-2016 гг.

№ п/п	Область	Районы	Период отбора			
			весна 2015 г.	осень 2015 г.	весна 2016 г.	осень 2016 г.
1	Калининградская область	Славский	0/36	2/36	0/36	7/36
		Неманский	0/36	1/36	н/и*	н/и
		Багратионовский	0/36	7/36	0/36	10/36
		Нестеровский	0/36	0/36	0/36	0/36
		Правдинский	0/36	0/36	0/72	17/72
		Краснознаменский	н/и	н/и	0/36	9/36
		Озерский	н/и	н/и	0/36	0/36

2	Псковская область	Красногородский	0/32	2/32	0/36	0/36
		Себежский	0/55	2/55	0/36	12/36
		Палкинский	0/55	1/55	н/и	н/и
		Усвятский	н/и	н/и	0/36	2/36
		Куньинский	н/и	н/и	0/36	0/36
		Дедовичский	н/и	н/и	0/36	0/36

Примечание:

* н/и - не исследовали;

кол-во положительных к вирусу БШ проб / общее кол-во проб.

Было установлено, что при весенне-осеннем исследовании парных проб сывороток крови от животных из Калининградской области в 2015 г. сероконверсия наблюдалась у 10 животных, а в 2016 г. – у 43 животных. При исследовании проб сывороток крови от КРС из Псковской области сероконверсия отмечена у 5 животных в 2015 г. и 14 животных в 2016 г.

Выделение изолята вируса БШ из проб биоматериала в культуре клеток. С помощью тест-системы на основе непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа в 2016 году в одной из проб биологического материала, полученного от КРС из Калининградской области, был выявлен антиген вируса БШ в титре 1:4, что послужило основанием для ее исследования методом вирусыведения в культуре клеток Vero.

ЦПД вируса БШ проявлялось, начиная с третьего пассажа, вызывая характерные цитопатические изменения более 50% клеток, проявляющиеся образованием псевдосинцития (слияние наружных мембран клеток), а в дальнейшем происходило округление клеток и слияние их в конгломераты. С увеличением количества пассажей время работы вируса сократилось до 72 ч.

Было установлено, что инфекционная активность штамма «ВБШ/Калининград/2016» вируса БШ в процессе адаптации к культуре клеток Vero постепенно увеличивалась и к 5-му пассажу составляла $3,5 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$.

Проведенный филогенетический анализ показал, что изолят «ВБШ/Калининград/2016» обладает 100 % гомологией с референтными нуклеотидными последовательностями изолятов/штаммов, депонированных в международной базе данных GenBank.

В итоге выделенный изолят вируса БШ был депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в качестве диагностического штамма под регистрационным номером (ссылкой) – «ВБШ/Калининград/2016» (диагностический) (справка о депонировании №83/-деп./17-23 от 18.08.2017г.) и предложен для изготовления препаратов и тест-систем для диагностики БШ.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4» адаптирован к перевиваемым линиям культур клеток ВНК-21/13, ПС и Vero, что позволило получить вирусосодержащий материал с инфекционной активностью в культуре клеток от 4,0 до 4,8 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$, при времени культивирования 48-72 ч и дозе заражения 0,002 $\text{TCID}_{50}/\text{кл}$;

2. На основе штамма «ВН80/11-4» вируса болезни Шмалленберг получены препараты антигена с концентрацией белка - 0,25-0,5 мг/мл и специфические

гипериммунные сыворотки от лабораторных животных с активностью от $5,0 \log_2$ до $14,9 \log_2$;

3. Разработан непрямой «сэндвич»-вариант ИФА, позволяющий выявлять антиген вируса БШ в вирусосодержащем материале в титре не менее 1:4. Показана возможность использования разработанной тест-системы при выявлении антигена вируса БШ в пробах биологического материала;

4. Разработана тест-система на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу БШ в сыворотках крови КРС/МРС/диких жвачных животных. Установлен позитивно-негативный порог реакции - 45% - 60%, определены основные валидационные характеристики: чувствительность (96%) и специфичность (97%) относительно коммерческого набора IDVET (Франция), точность (97%), воспроизводимость (5,3 - 5,6%), что позволяет использовать ее для диагностики БШ;

5. Проведена апробация разработанной тест-системы при исследовании 8933 проб сывороток крови, поступивших из субъектов РФ на наличие антител к вирусу БШ, показавшее, что 39,6% местного скота и 38,5% импортного скота являлись серопозитивными;

6. Выделен вирус болезни Шмалленберг штамм «ВБШ/Калининград/2016» на территории РФ, который изучен, охарактеризован и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» для дальнейшего использования при разработке средств диагностики.

4.2 Практические предложения

На основе проведенных исследований адаптирован к перевиваемым линиям культур клеток вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», оптимизированы параметры культивирования данного штамма и на его основе разработаны непрямой «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса БШ и конкурентный вариант ИФА для выявления антител к вирусу БШ.

В результате проведенных исследований изучен, охарактеризован и депонирован диагностический штамм «ВБШ/Калининград/2016», который был депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») под регистрационным номером (ссылкой) – «ВБШ/Калининград/2016» (диагностический) (справка о депонировании №83/-деп./17-23 от 18.08.2017г.) и может быть в дальнейшем использован при разработке диагностических препаратов и их контроля при диагностики БШ КРС.

В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации разработаны, комиссионно проверены, утверждены на ученом совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие методические рекомендации:

4. Методические рекомендации по очистке и концентрированию антигена вируса болезни Шмалленберг;

5. Методические рекомендации по выявлению антигена вируса болезни Шмалленберг в твердофазном непрямом «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа;

6. Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в конкурентном варианте иммуноферментного анализа.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Разработанная тест-система на основе конкурентного варианта ИФА будет в дальнейшем использована для выявления антител к вирусу БШ в сыворотках крови КРС, МРС, диких жвачных.

Разработанная тест-система на основе «сэндвич»-варианта ИФА может быть использована для выявления антигена в биоматериале от КРС, а также для контроля качества антигенного сырья, используемого при производстве диагностических наборов.

Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВБШ/Калининград/2016» может послужить основой для дальнейшего совершенствования средств диагностики данного заболевания.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Адаптация вируса болезни Шмалленберга к перевиваемым клеточным культурам / С.В. Кононова, А.А. Нестеров, В.В. Думова, Манин Б.Л., Кононов А.В., Бабин Ю.Ю., Губенко О.Г. // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 2. – С. 17-20.

2. Получение специфических компонентов иммуноферментной тест-системы для выявления антигена вируса болезни Шмалленберга / О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, С.В. Кононова, Бабин Ю.Ю., Солоухина Н.А., Кононов А.В. // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 2. – С. 52-55.

3. Выделение вируса болезни Шмалленберга у импортируемого скота на территории Российской Федерации / О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, А.В. Спрыгин, С.В. Кононова, А.В. Пискунов, А.В. Кононов // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т.54.№6. –С.1247-1256.

4. Прогноз по болезни Шмалленберг в Российской Федерации на 2015 год / А.В. Кононов, О.П. Бьядовская, О.Г. Губенко, Е.Е. Зимина, А.К. Караулов // Отчет по государственному заданию. Государственная работа "Совершенствование методов контроля карантинных и экономически значимых инфекционных болезней животных" за 2014 / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2015. – 424-436. – Инв. № 370.

5. Губенко, О.Г. Определение основных характеристик метода ИФА для выявления антител к вирусу болезни Шмалленберга в сыворотке крови крупного и мелкого рогатого скота / О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, С.В. Кононова // Достижения молодых ученых - в вет. практику: материалы 4-й Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию аспирантуры ФГБУ "ВНИИЗЖ". – Владимир, 2016. – С. 184-191.

6. Губенко, О.Г. Разработка иммуноферментных методов диагностики вируса болезни Шмалленберг / О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, С.В. Кононова // Молекулярная диагностика - 2017: IX Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием, Москва, 2017 г.: сб. тр. – Тамбов, 2017. – Т. 2. – С. 387-388.

Подписано в печать ____ 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» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)