

## ОПТИМІЗАЦІЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ ТЕШОВІРУСІВ СВИНЕЙ

**Бова Т.О., Дерев'янка С.В., Сорока В.І.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

*Представлені результати оптимізації прямого сендвіч-варіанту твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА) для індикації тешовірусів свиней (ТВС) – збудників енцефаломієлітів свиней. Одержані та охарактеризовані біологічні реактиви, оптимізовані умови проведення проміжних етапів реакції. В даному варіанті виявляються штами, які належать до 1-го серотипу ТВС.*

Ключові слова: *Porcine teschovirus, поліклональні антитіла, пероксидазний кон'югат, твердофазний імуноферментний аналіз.*

Тешо-, ентеровіруси свиней розповсюджені в природі і в багатьох випадках є причиною захворюваності домашніх тварин. Зокрема, ентеровіруси є збудниками енцефаломієліту [1-3], пневмонії [4], гастроентериту [5], везикулярної хвороби та патології репродуктивної системи [6], тощо у свиней. Серед них найбільших збитків свинарській галузі завдає ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней, яка характеризується високою контагіозністю і симптомами ураження нервової системи [2]. Згідно з рішенням Міжнародного комітету з таксономії вірусів, було рекласифіковано збудника цієї хвороби [7]: родина *Picornaviridae*, рід *Teschovirus*, вид *Porcine Teschovirus*. До цього виду належать тешовіруси свиней (ТВС) 10-ти серотипів: ТВС-1 – ТВС-7, ТВС-11 – ТВС-13.

Тешеноподібні енцефаліти можуть викликатися представниками кількох серотипів, а не тільки ТВС-1 як вважалося раніше [6,8].

За вітчизняними методиками тешовірусні енцефаломієліти діагностуються шляхом ізоляції вірусу в культурі клітин з наступним типуванням його в реакції нейтралізації [1,2]. Але оскільки цей метод трудомісткий і довготривалий, є необхідність розробити нові експресні методи, які б за специфічністю і чутливістю не поступалися існуючим. Одним з таких методів є твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА). Серед багатьох варіантів цього методу для виявлення антигенів найбільш придатні сендвіч-варіанти [9,10].

У зв'язку з вищевикладеним метою нашої роботи було одержати високоспецифічні реактиви та оптимізувати етапи сендвіч-варіанту ТІФА

для індикації тешовірусів – збудників енцефаломієлітів свиней.

**Матеріали і методи.** *Антигени.* Використовувались референтні штами 10-ти серотипів за останньою міжнародною класифікацією [7]: тешовірусів свиней Teschen 199 (1-й серотип), O3b (2-й), O2b (3-й), PS 36 (4-й), F 26 (5-й), PS 37 (6-й), F 43 (7-й), UKG 173/74 (11-й), VIR 2899/84 (12-й) та штам ентеровірусів свиней V13 (8-й серотип), які були люб’язно надані професором Мальте Даубером (Німеччина), а також штами Чернігівський-2372, Березнянський-652, Перечинський-642, виділені співробітниками лабораторії вірусології тварин нашого інституту. Всі штами пройшли адаптацію до культури клітин СНЕВ шляхом триразового пасажування. Інфекційна активність штамів становила 6,5-8,5 ІгТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Штам Чернігівський-2372 пройшов дворазове пасажування через мозок поросяти з наступною адаптацією до перещеплюваних ліній культур клітин нирки ембріона свині (СНЕВ) та нирки новонародженого хом’ячка (ВНК-21). Інфекційна активність культурального вірусу становила 8,0-8,5 ІгТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

*Антитіла.* Гіперімунну кролячу сироватку крові на очищений вірусний препарат штаму Чернігівський-2372 [11] одержували за схемою В.П. Романенка [12] в нашій модифікації, яка полягала у заміні ад’юванта на MONTANIDE ISA 25 (фірми “SEPPIC”, Франція). В подальшому використовували сироватки з титром вірусспецифічних антитіл не менше 1:512 в реакції нейтралізації біологічної активності вірусу (РН) та 1:2048 в непрямому варіанті ТІФА. Імуноглобуліни класу G (Ig G) із сироватки крові одержували шляхом висолювання сульфатом амонію, з наступним їх очищенням на ДЕАЕ-целюлозі [9]. Одну частину препарату антитіл використовували для кон’югації з пероксидазою хрину, іншу – для сенсibilізації планшетів.

*Пероксидазний кон’югат.* Кон’югацію кролячих Ig G з пероксидазою хрину здійснювали за методикою Nakane P.K. і Kawaoi A. [13]. Визначення робочих характеристик одержаного кон’югату проводили в прямому варіанті ТІФА за стандартною методикою [10]. Позитивним контролем (гомологічним антигеном) для визначення робочого розведення та титру був очищений препарат штаму Чернігівський-2372. Специфічність і фонові реакції одержаного кон’югата перевіряли з використанням бичачого сироваткового альбуміну (БСА), білків культур клітин СНЕВ та ВНК-21 (гетерологічні антигени).

*Сендвіч-варіант ТІФА.* Для сенсibilізації планшетів застосовували робоче розведення специфічних антитіл в 0,05 М карбонатному буферному розчині з рН 9,5 протягом 16-18 годин. Вірусомісні суспензії

досліджуваних штамів та контрольні вносили у подвійних розведеннях (1:5-1:160). Позитивним контролем був штам Чернігівський-2372, негативним – суспензія культури клітин СНЕВ. Як основний буферний розчин для розведення вірусних антигенів та кон'югату використовували 0,01 М натрій-калій-фосфатний буфер (ФБР). Для зменшення фонового рівня досліджували необхідність добавок – стабілізаторів (знежирене молоко, (СЗМ), яєчний альбумін (ЯА) та БСА) [9,10,14] та сечовини [14]. Результати реєстрували на ридері фірми “Sanofi” (Франція) при довжині хвилі 492 нм. Визначали співвідношення оптичної густини позитивного контролю (ОГ+) та дослідних зразків до оптичної густини негативного контролю (ОГ-).

**Результати та їх обговорення.** При розробці будь-якого варіанту ТІФА насамперед необхідно було одержати біологічні компоненти реакції, в першу чергу, високоспецифічні антитіла та кон'югат. Одержані нами поліклональні антитіла при перевірці в непрямому варіанті ТІФА виявилися високоспецифічними. В робочому розведенні (1:2500) з білками культур клітин СНЕВ та ВНК-21 в реакцію не вступали.

Подальшим етапом нашої роботи було одержання пероксидазного кон'югату періодатним методом. Одержаний кон'югат перевіряли в прямому варіанті твердофазного імуоферментного аналізу. Гомологічним антигеном також був очищений препарат штаму Чернігівський-2372, гетерологічними антигенами, як і в попередньому досліді слугували білки культури клітин СНЕВ та ВНК-21, а також БСА (рис.1).

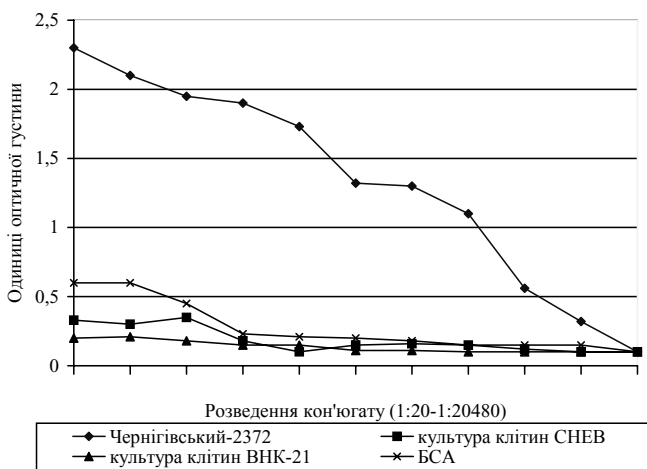


Рис. 1. Титрування пероксидазного кон'югату в прямому варіанті ТІФА.

Встановлено, що кон'югат має титр 1:10240, робоче розведення його становило 1:2560.

З літературних джерел відомо, що БСА проявляє стабілізуючу дію на зв'язування антигена з антитілом і дещо підвищує титр антитіл [14]. Щодо сухого знежиреного молока, то крім казеїну та альбуміну, які також здатні виступати стабілізаторами, до його складу входить багато олігосахаридів, які здійснюють стабілізуючий ефект на структурну організацію білків та міжбілкові взаємодії. Цим зумовлене їх традиційне використання як добавок до буферних розчинів при проведенні ТІФА. Тому при оптимізації постановки сендвіч-варіанту ТІФА особливу увагу ми звертали на підбір добавок до буферних розчинів для розведення реагентів та час інкубації антигену із сенсифікованими поліклональними антитілами.

З табл. 1 видно, що при внесенні БСА у ФБР різниця між показниками позитивного і негативного контролів була найнижчою. Всі досліджувані концентрації бичачого сироваткового альбуміну очікуваних результатів не дали, чутливість методу не підвищилася. Щодо яєчного альбуміну, то стабілізуюча дія спостерігалася в разі внесенні його в буфер в кількості 5 мкг/мл: збільшилось співвідношення показників оптичної густини позитивного і негативного контролів. При інших концентраціях спостерігалось підвищення обох досліджуваних показників. При додаванні сухого знежиреного молока співвідношення ОГ+/ОГ- зросло зі збільшенням кількості реагенту в буфері.

Отже, найкращими стабілізаторами виявилися яєчний альбумін, концентрація якого в буфері була 5 мкг/мл, та сухе знежирене молоко в концентрації 120 мкг/мл. Але у зв'язку з обмеженою розчинністю сухого молока одержаний розчин необхідно освітлювати центрифугуванням, що дещо ускладнює процедуру, тому в подальших дослідах використовували яєчний альбумін.

*Таблиця 1. Вплив стабілізуючих речовин буферного розчину на показники оптичної густини при реєстрації результатів ТІФА*

Контролі	Стабілізатори, мкг/мл								
	БСА			ЯА			СЗМ		
	2	5	10	2	5	10	30	60	120
Чернігівський-2372	0,678	1,064	0,892	1,038	1,101	1,148	1,175	1,111	1,189
СНЕВ	0,169	0,148	0,151	0,154	0,110	0,141	0,129	0,113	0,119
<b>ОГ+/ОГ-</b>	<b>4,01</b>	<b>7,19</b>	<b>5,91</b>	<b>6,74</b>	<b>10,01</b>	<b>8,14</b>	<b>9,11</b>	<b>9,83</b>	<b>9,99</b>

Для зменшення неспецифічної взаємодії між білками іноді використовують також сечовину як речовину, що активно руйнує водневі зв'язки [14]. Результати впливу сечовини на результати сендвіч-варіанту ТІФА представлені в табл. 2.

*Таблиця 2. Вплив концентрації сечовини в ФБР для розведення антигенів та кон'югату на результати ТІФА*

Досліджувані антигени	Вміст сечовини, мкг/мл			
	без сечовини	15	30	60
O2b	0,373	0,363	0,221	0,268
<b>O2b/ОГ-</b>	<b>2,03</b>	<b>2,61</b>	<b>2,01</b>	<b>2,221</b>
F43	0,214	0,209	0,166	0,183
<b>F43/ОГ-</b>	<b>1,17</b>	<b>1,5</b>	<b>1,51</b>	<b>1,51</b>
ОГ+	0,699	0,824	1,101	0,787
ОГ-	0,183	0,139	0,110	0,121
<b>ОГ+/ОГ-</b>	<b>3,82</b>	<b>5,93</b>	<b>10,01</b>	<b>6,51</b>

Судячи з величини співвідношення ОГ+/ОГ-, найкращий результат ми отримали при додаванні до буферного розчину 30 мг/мл сечовини, тому надалі використовували саме цю концентрацію.

Для кращої взаємодії антигену із сенсibiliзованими антитілами важливо було визначити оптимальний час їх взаємодії. В табл. 3 наведені дані залежності результатів ТІФА від часу інкубації антигену. Показано, що найоптимальнішим часом є 60 хв. Збільшення тривалості інкубації до істотних змін не призводить, а зменшення до 30 хв. є недостатнім для взаємодії антигену з антитілом.

*Таблиця 3. Результати ТІФА при зміні часу інкубації вірусного антигену*

Контролі	Показники оптичної густини		
	30 хв.	60 хв.	120 хв.
Штам Чернігівський-2372	0,443	1,101	1,223
СНЕВ	0,087	0,110	0,124
<b>ОГ+/ОГ-</b>	<b>5,09</b>	<b>10,01</b>	<b>9,86</b>

Таким чином, оптимальними умовами проведення сендвіч-варіанту ТІФА є сенсibiliзація мікропланшетів специфічними антитілами в 0,05 М карбонатному буферному розчині протягом 16-18 год. при 4°C, а також взаємодія антитіл з досліджуваними антигенами протягом 1 год. при 37°C. Для розведення вірусних антигенів та кон'югатів до фосфатного

буферного розчину слід додавати 5 мкг/мл яєчного альбуміну та 30 мг/мл сечовини. Робоче розведення антитіл і кон'югату має становити 1:2500.

Завершальним етапом нашої роботи було виявлення в розробленому сендвіч-варіанті ТІФА тешо-, ентеровірусів свиней різних серотипів. Встановлено, що в цьому варіанті тешовіруси свиней 1-го серотипу суттєво відрізнялися від представників інших серотипів (табл. 4). Так, відношення величини оптичної густини цих зразків до величини негативного контролю становило 3,0 і більше, тоді як для штамів 2-7 серотипів ця величина коливалася в межах від 1,5 до 2,0. У штамів 11-го, 12-го серотипів тешовірусів і 8-го серотипу ентеровірусів різниця між цими показниками та в порівнянні з негативним контролем була незначною.

**Таблиця 4. Результати сендвіч-варіанту ТІФА при виявленні тешовірусів свиней різних серотипів та ентеровірусу свиней**

Штам	Серотип	Оптична густина	ОГ/ОГ-
Березнянський-652	1	0,367	3,06
Перечинський-642	1	0,999	9,09
Чернігівський-2372 ( <i>позитивний контроль</i> )	1	1,101	10,01
Teschen 199	1	0,944	8,58
O3b	2	0,229	2,09
O2b	3	0,221	2,01
PS 36	4	0,212	1,93
F 26	5	0,196	1,78
PS 37	6	0,190	1,73
F 43	7	0,166	1,51
UKG 173/74	11	0,116	1,06
VIR 2899/84	12	0,117	1,07
V13	8	0,115	1,05
СНЕВ ( <i>негативний контроль</i> )		0,110	1

Таким чином, запропонований сендвіч-варіант ТІФА дозволяє ідентифікувати збудника тешовірусного енцефаломієліту першого серотипу в культуральній суспензії, що значно спрощує процедуру його виявлення і дає можливість досліджувати значно більшу кількість проб за менший проміжок часу. Для ідентифікації тешо- та ентеровірусів на рівні серотипу в ТІФА необхідні подальші дослідження і такі маркери, як моноклональні антитіла.

1. Диагностика болезни Тешена свиней / Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Полевик Е.И. и др. // Ветеринария. – 1988. – № 11. – С. 65.

2. Романенко В.Ф., Сорока В.И., Прусс О.Г. Рекомендации по диагностике и мерам борьбы с энзоотическим энцефаломиелитом (болезнью Тешена) свиней. – Чернігів, 1999. – 16 с.

3. Романенко В.Ф., Сорока В.И. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней // Тр. Междунар. научн. конф. “Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы”. – Харьков: ИЭКВМ УААН, 1995. – С. 92-95.

4. Романенко В.Ф., Бокун А.А., Бабич Н.В., Пинчук И.Н. Проблема диагностики пневмонии свиней энтеровирусной этиологии // Ветеринария. – 1992. – № 4. – С. 25-27.

5. Выделение и идентификация вирусов, возбудителей гастроэнтеритов свиней / Старчеус А.П., Вабищевич Ф.С., Полулях В.И. и др. // Тр. Междунар. научн. конф. “Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы”. – Харьков: ИЭКВМ УААН, 1995. – С. 193-194.

6. Сюрин В.Н., Самойленко В.Н., Соловьёв Б.В. Вирусные болезни животных – М.: “ВНИТИБП”, 1998. – С. 501-507.

7. King A.M.Q., Brown F., Christian et al. Picornaviridae. // “Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses”/ Eds Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. – Academic Press, New-York (USA), 2000. – P. 657-673.

8. Knowles N.J. Laboratory identification of porcine enteroviruses // International Symp. on Porcine Picornavirus Infections. – Greifswald, 1994. – P. 1-3.

9. Егоров А.М, Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.

10. Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ // Антитела. Методы.: Пер. с англ. / Под ред. Д. Кэтти. – М.: “Мир”, 1991. – Т. 2. – С. 152-239.

11. Бова Т.О., Сорока В.И., Дерев’янок С.В., Бабіч Н.В. Очищення вірусного антигену для імунохімічних реакцій // Ветеринарна медицина. – 2002. – Вип. 80. – С. 87-90.

12. Романенко В.Ф. Получение гипериммунных сывороток к энтеровирусам свиней // Тр. ВГНКИ вет. препаратов. – 1975. – Т.22. – С. 93-95.

13. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase labelled antibody. A new meth-

od of conjugation // Ibid. – 1974. – Vol. 22, № 10. – P. 1084-1091.

14. Purcifull D.E., Batchelor D.L. Immunodiffusion test with sodium dodecyl sulphate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions // Agr. Exp. Station. – 1977. – Bull. 788. – 68 p.

УДК 619:578.835.11:616-078

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ТЕШОВИРУСОВ СВИНЕЙ**

**Бова Т.А., Деревянко С.В., Сорока В.И.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Представлены результаты оптимизации прямого сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) для индикации тешовирусов свиней – возбудителей энцефаломиелицитов. Получены и охарактеризованы биологические компоненты, подобраны условия проведения промежуточных этапов реакции. В данном варианте ТИФА можно выявить штаммы, относящиеся к 1-му серотипу тешовирусов свиней.*

*Ключевые слова: Porcine teschovirus, поликлональные антитела, пероксидазный конъюгат, твердофазный иммуноферментный анализ.*

## **OPTIMIZATION OF ELISA FOR IDENTIFICATION OF PORCINE TESCHOVIRUS**

**Bova, T.A., Derevyanko S.V., Soroka V.I.**

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*Results at optimization of enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA) for detection of porcine teshoviruses (PTV) has been presented. Biological components for ELISA were made up and conditions all stages of analysis were optimized. Strains of serotypes PTV-1 were diagnosed by using of test-system.*

*Key words: porcine teschovirus, polyclonal antibodies, conjugate of peroxidase, enzyme-linked immunoenzyme analysis.*