

РЕЗУЛЬТАТИ АПРОБАЦІЇ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСУ G ДО ВІРУСУ ХВОРОБИ ТЕШЕНА В СИРОВАТКАХ КРОВІ СВИНЕЙ

Бова Т.О., Сорока В.І.

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

Представлено результати апробації імуноферментної тест-системи для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу хвороби Тешена свиней у сироватках крові. Розроблена тест-система дає можливість визначати імунний статус тварин, а також ефективність застосування вакцин у господарствах.

Ключові слова: *тешовірус, антитіла, тест-система, твердофазний імуноферментний аналіз*

Ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней – це високо контагіозне захворювання, яке призводить до ураження центральної нервової системи з ознаками гіперестезії шкіри, клоніко-тонічних судом, паралічами передніх і задніх кінцівок. Найчастіше хвороба уражує поросят 2-6 місячного віку [1, 2]. У вогнищі інфекції загибель хворих тварин може досягати 75-90%, що завдає значних економічних збитків галузі свинарства [3].

Збудником хвороби Тешена є вірус першого серотипу, який належить до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine Teschovirus* [4]. Вірус розмножується в кишечнику тварини, а після вірусемії уражує клітини центральної нервової системи, що й призводить до розвитку хвороби Тешена. Латентний період інфікування та перебіг хвороби супроводжується утворенням антитіл і нестерильного імунітету [2, 5].

Для специфічної профілактики хвороби Тешена використовуються живі та інактивовані вакцини. В Інституті сільськогосподарської мікробіології на основі аттенуйованого штаму “Перечинський-642” розроблена жива вакцина проти хвороби Тешена свиней [1 6], яка створює специфічний імунітет у тварин на період до 12-ти місяців. За літературними даними, специфічні антитіла утворюються через два тижні після застосування інактивованої вакцини і захищають щеплених тварин

протягом 11 місяців [7].

Ефективність боротьби з хворобою Тешена значною мірою залежить від своєчасно встановленого діагнозу. Для виявлення специфічних антитіл у сироватках крові свиней використовується реакція нейтралізації, яка й донині є основним тестом [7, 8]. Разом з тим цей метод трудомісткий, потребує використання культури клітин, дорогих живильних середовищ. Тривалість постановки діагнозу – до 30 діб. Крім того, постійно існує небезпека контамінації культури клітин сторонньою мікрофлорою. Тому розробка нових чутливих, специфічних та експресних методів діагностики є актуальною. Одним з таких методів є твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА) [9, 10].

У зв'язку з наведеним вище була проведена апробація розробленої нами тест-системи для виявлення імуноглобулінів класу G, специфічних до вірусу хвороби Тешена, у сироватках крові тварин, вакцинованих та з ураженням центральної нервової системи.

Матеріали і методи. Використовували експериментальний зразок імуноферментної тест-системи, розробленої в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН. Твердофазний імуноферментний аналіз проводили на полістиролових планшетах фірми “Sarstedt” в непрямому варіанті. Як антиген використовували інактивованій очищений препарат тешовірусу штаму “Чернігівський-2372”, приготовлений, як описано раніше [11, 12]. В лунки планшету вносили 100 мкл антигенвмісного матеріалу в 0,05 М карбонатно-бікарбонатному буферному розчині, рН 9,5. Інкубували планшети при 4°C 16-18 годин. Неадсорбований матеріал відмивали 0,01 М натрій-калій фосфатним буферним розчином (ФБР) з Tween-20 (ФБРТ), рН 7,2. Блокування активних центрів на планшеті проводили сухим молоком у ФБР (100 мкг/мл) в робочому об'ємі 200 мкл на лунку при 37°C протягом години. Сироватки крові і кон'югат розводили в ФБР з додаванням 30 мкг/мл сухого молока. Досліджувані сироватки в розведенні 1:5 вносили по 100 мкл на лунку в 4-х повтореннях або робили подвійні розведення з 1:4 до 1:2048. Інкубували при 37°C протягом години. Після промивання планшетів вносили антисвинячий кон'югат в робочому розведенні об'ємом 100 мкл на лунку й витримували при 37°C одну годину. Утворені комплекси після промивання ФБРТ виявляли за допомогою ортофенілдіаміну. Реакцію зупиняли

1,25 М сірчаною кислотою. Облік результатів проводили на рідері фірми “Sanofi” при довжинах хвиль 450/620 нм. Граничне значення, згідно з яким результат вважається позитивним, дорівнювало 0,200 оптичної одиниці.

Досліджували сироватки крові вакцинованих, клінічно здорових, а також експериментально заражених свиней. Було використано 18 поросят віком 2,5 місяця, завезених з ДСП, в якому хвороба Тешена свиней не реєструвалася. Проводили інтрацеребральне зараження поросят мозковими суспензіями тешовірусів свиней першого серотипу, штамів “Чернігівський-2372” та “Дніпровський-32” в розведеннях 10^{-1} – 10^{-4} . Проби крові відбирали кожні 7 днів протягом 5-ти тижнів.

Всі зразки сироватки крові перевіряли в реакції віруснейтралізації на культурі клітин СНЕВ за загальноприйнятою методикою [7].

Результати та їх обговорення. За результатами реакції нейтралізації й імуноферментного аналізу в сироватках крові клінічно здорових свиней специфічних антитіл не виявлено.

Досліджували динаміку утворення антитіл в сироватках крові поросят до штамів тешовірусів свиней першого серотипу в умовах експерименту (табл. 1).

Із 16 експериментально заражених поросят 10 голів мали характерні клінічні ознаки хвороби Тешена: гіперестезію шкіри, клоніко-тонічні судоми, тремор м'язів, парез кінцівок. Тварини, що захворіли, загинули на 10-28-у добу. Решта поросят залишилися клінічно здоровими.

При дослідженні сироваток крові в реакції нейтралізації встановлено, що вірусспецифічні антитіла утворилися у трьох тварин.

У поросяти № 452 через тиждень після зараження вірулентним штамом “Дніпровський-32” в розведенні 10^{-1} виявлений в сироватці крові титр антитіл становив 1:8. Через два тижні титр специфічних антитіл зріс до 1:16, але при подальшому дослідженні сироваток крові від цього поросяти не виявляли антитіл, специфічних до вірусу хвороби Тешена.

У поросяти № 4521 через 7 днів після зараження виявлені вірусспецифічні антитіла також з титром 1:8, але через два тижні і на момент його загибелі антитіл в сироватці крові цього поросяти виявлено не було.

У сироватці крові поросяти № 4524, яке було заражене віру-

совмісною суспензією штаму “Дніпровський-32” в розведенні 10^{-4} , але через два тижні після зараження виявлені антитіла з титром 1:32. Через 5 тижнів по завершенні досліджу титр антитіл становив 1:4.

Під час експерименту антитіла до вірулентного штаму “Чернігівський-2372” у поросят не утворилися. Менш вірулентний штам “Дніпровський-32” стимулював імунну систему поросят, внаслідок чого протягом всього експерименту у сироватках крові тварин виявлялися вірусспецифічні антитіла. У відповідь на інфекцію першими в сироватці крові з’являються антитіла, які належать до імуноглобулінів класу М. Згодом їх концентрація зменшується і з’являються імуноглобуліни іншого класу – G, які зберігаються в сироватці крові протягом тривалого часу. Можливо, саме цим можна пояснити той факт, що вірусспецифічні антитіла (класу G) ТІФА виявляє лише через п’ять тижнів після зараження.

Іншакартина спостерігається при вивченні поствакцинального імунітету свиней.

У сироватках крові вакцинованих живою вакциною свиней специфічні антитіла виявляються в реакції віруснейтралізації через 1-4 місяці після вакцинації з титром 1:64-1:128, через 6 місяців після вакцинації титри знижуються до 1:32, а через 8-10 місяців – до 1:4. (табл. 2).

Після вакцинації інактивованою вакциною в реакції віруснейтралізації у свиней виявлені антитіла з титром 1:128 та 1:8, у двох сироватках специфічних антитіл не виявлено.

При використанні розробленої нами імуноферментної тест-системи показник титру антитіл був вищим порівняно з виявленим у реакції віруснейтралізації.

Так, в сироватках крові вакцинованих живою вакциною тварин титри антитіл, виявлені в реакції ТІФА, становили 1:64 – 1: 512. При дослідженні сироваток крові в одному розведенні оптична густина продуктів імуноферментної реакції становила від 0,465 до 1,594, а слабо позитивних сироваток – 0,221-0,341, що перевищувало нижній граничний рівень тест-системи. Титри антитіл в сироватках крові вакцинованих інактивованою вакциною становили 1:32 та 1:1024, причому оптична густина продуктів реакції при реєстрації результатів аналізу в останньому випадку була максимальною і дорівнювала 1,598 та 1,671.

Таблиця 2. Результати паралельного визначення рівня антитіл у сироватках крові свиней в реакції нейтралізації (НР) і твердофазному імуоферментному аналізі (ТІФА) при використанні розробленої нами тест-системи

Вік тварини, місяців	Вакцина	Час після вакцинації, місяці	Виявлений рівень антитіл		
			РН	ТІФА	
				титрування	ОГ**
4	жива*	2	1:128	1:512	1,253
4	—”—	2	1:128	1:512	1,322
6	—”—	3	1:128	1:256	0,911
6	—”—	4	1:128	1:512	1,400
4	—”—	2	1:128	1:512	1,494
3	—”—	1	1:128	1:128	1,286
3	—”—	1	1:128	1:256	1,594
4	—”—	2	1:128	1:256	0,858
4	—”—	1	1:64	1:128	0,512
6	—”—	3	1:64	1:128	0,679
8	—”—	6	1:32	1:64	0,465
9	—”—	6	1:32	1:64	0,467
11	—”—	9	1:8	1:32	0,341
12	—”—	10	1:4	1:16	0,264
11	—”—	8	1:4	1:16	0,221
4	інактивована	2	1:128	1:1024	1,598
4	—”—	2	0	0	0,106
4	—”—	2	0	0	0,120
5	—”—	3	1:128	1:1024	1,671
6	—”—	4	1:8	1:32	0,298

Примітка: * – жива вакцина виробництва лабораторії вірусології тварин Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН;

** – оптична густина продуктів імуоферментної реакції при реєстрації результатів аналізу сироваток крові свиней в одному розведенні

Таким чином, апробація розробленої імуоферментної тест-системи для виявлення імуноглобулінів класу G до вірусу хвороби Тешена в сироватках крові свиней показала її ефективність. Результати паралельного титрування сироваток крові в реакції нейтралізації і твердофазному імуоферментному

аналізі збігаються. Але розроблена тест-система дає можливість зменшити час дослідження сироваток крові з 10-30 діб до 5 годин у порівнянні з реакцією нейтралізації. Розроблена тест-система дозволяє визначати імунний статус тварин, а також ефективність застосування вакцин у господарствах.

1. Вакцина проти хвороби Тешена свиней: А.с. 1040657 СССР, А 61К 39/125/ Романенко В.Ф., Прусс О.Г. (СССР). – № 2838704/30-15; Заявл. 15.11.79. – 13 с.

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

3. Романенко В.Ф., Сорока В.И. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней // Междунар. научн. конф. “Общая эпизоотология: иммунология, экология и методологические проблемы” (20-22 сентября 1995 г.). – Харьков, 1995. – С. 92-95.

4. 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. – New-York, San Diego, 2000. – P. 657-673.

5. Сергеев В.А. Вирусные вакцины. – К.: Урожай, 1993. – С. 315-316.

6. Штамм *Enterovirus suis* “Перечинский-642” для изготовления вакцины против болезни Тешена свиней: А.с. 997299 СССР А 61 К 39/125/ Романенко В.Ф., Прусс О.Г. (СССР). – № 2816628/30-15; Заявл. 31.08.79.

7. Романенко В.Ф., Сорока В.И., Прусс О.Г. Рекомендації по діагностиці і заходам боротьби з ензоотичним енцефаломієлітом (хворобою Тешена) свиней. – Чернігів, 1999. – 22 с.

8. Knowles N.J. Laboratory identification of porcine enteroviruses // International Symposium on Porcine Picornavirus Infections (2-3 May 1994). – Greifswald (Germany), 1994. – P. 1-3.

9. Синицин В.А. Застосування методу імуноферментного аналізу для виявлення специфічних антитіл до вірусу ензоотичного енцефаломієліту свиней // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту. – 1999. – Вип. 8. – С. 213-216.

10. Nardelli S., Farina L., Selli L. et al. Research on the presence of porcine enterovirus serotype 1 in North-Eastern Italy // J. Vet. Med. Ser. B. – 1993. – Vol. 40. – № 3. – P. 190-196.

11. Бова Т.О. Можливість використання інактивованого вірусу для постановки ІФА // III Міжнародна науково-практична конференція “Біоресурси і віруси”. – Київ, 2001. – С. 25.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ ТЕШЕНА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

Бова Т.А., Сорока В.И.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Представлены результаты апробации иммуноферментной тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу болезни Тешена в сыворотках крови свиней. Разработанная тест-система позволяет определить иммунный статус животного, а также эффективность применения вакцин в хозяйствах.

Ключевые слова: тешовирус, антитела, тест-система, твердо-фазный иммуноферментный анализ.

THE RESULTS OF APPROBATION OF IMMUNO-ENZYME TEST-SYSTEM FOR DETECTION ANTIBODY AGAINST TESCHEN DISEASE VIRUS IN PORCINE SERUM

Bova T.A., Soroka V.I.

Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

The results of approbation of immuno-enzyme test-system for detection antibody against Teschen disease virus in porcine serums are presented. It's shown that this worked out test-system has permitted to determine the immune status of animal and the efficiency of application vaccines in farms.

Key words: teschovirus, antibodies, test-system, enzyme-linked immunoassay