

УДК 619:616.006.446

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИГЕНОВ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ
АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА МЕТОДОМ ИФА**



В.В. Храмцов¹, доктор
ветеринарных наук,
профессор



Н.Г. Двоглазов¹, кандидат
ветеринарных наук



Ю.В. Туманов², доктор
биологических наук

¹Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Россельхозакадемии, ²Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор»

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота; иммуноферментный анализ (ИФА); реакция иммунодиффузии (РИД), рекомбинантный антиген, диагностические исследования.

Проведен анализ эффективности применения разных по биологической природе антигенов с использованием иммуноферментной технологии для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

**STUDYING OF EFFICIENCY APPLICATION OF ANTIGENS AT EXPOSURE OF
ANTIBODIES TO VIRUS OF LEUCOSIS BY
IMMUNE-ENZYME ASSAY TECHNIQUE**

V.V. Khrantsov¹ - doctor of Veterinary Sc., Professor

N.G. Dvoeglazov¹ - candidate of Veterinary Sc.

U.V. Tumanov² - doctor of Biological Sc.

¹ Institute of Experimental Veterinary in Siberia and Far East of Russian Agricultural Academy; ²
States Scientific Centrum of Virusology and Biotechnology "Vector"

Keywords: cattle leucosis; immune-enzyme assay; agar gel immunodiffusion; recombinant antigen; diagnostic researches

There was carried out comparative analysis of antigens being various as to biological nature to reveal antibodies to bovine leucosis virus using immune-enzyme assay technique.

В настоящее время для диагностики ВЛКРС используют серологические методы – реакцию иммунодиффузии в геле и иммуноферментный анализ. Эпизоотологический контроль ВЛКРС главным образом основан на постановке РИД.

Разработка РИД и ИФА развивалась в двух направлениях: выявление антител к гликопротеиновому антигену gp51 и к белкам p24. Исследования показали, что антитела к gp51 присутствуют в организме инфицированных животных в более высоких титрах, чем к p24 [1]. Противовирусные антитела можно выявлять не только в сыворотке крови, но и в других антителосодержащих жидкостях организма.

Реакция (РИД) проста в исполнении, но поскольку не у всех животных уровень антител в крови достигает определенных значений, она не может выявить всех инфицированных животных. Специфичность РИД по-разному оценивается исследователями. По данным литературы, она достигает 99,8% при чувствительности 98,5% [2].

Другим методом, применяемым в настоящее время для диагностики лейкозной инфекции, является иммуноферментный анализ. ИФА имеет большую чувствительность, чем РИД, по титру выявляемых антител [3]. Способность ИФА определять антитела в молоке и в его сборных пробах – основное преимущество перед РИД. Но это применимо только для взрослых животных. Место ИФА в системе противолейкозных мероприятий определяется его чувствительностью, специфичностью и быстротой постановки.

Развитие методов молекулярной биологии позволяет получать рекомбинантные белки ВЛКРС [4, 5], синтезируемые в различных системах экспрессии, что позволяет удешевить стоимость антигенов и упрощает процесс очистки.

По литературным данным, подтверждена иммунологическая идентичность естественного и рекомбинантного гликопротеиновых антигенов (АГ) ВЛКРС и установлена принципиальная возможность использования рекомбинантного АГ для диагностических целей [6].

Цель исследований: изучить диагностическую ценность антигенов ВЛКРС с использованием ИФА и РИД при диагностике лейкоза.

Работа выполнена на базе лаборатории лейкоза ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, лаборатории биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор».

Исследования проводились на крупном рогатом скоте в возрасте 3-7 лет: интактном и инфицированном ВЛКРС.

В качестве референс-контроля использовали стандартную реакцию иммунодиффузии в агаровом геле с применением коммерческого набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота производства Курской биофабрики согласно наставлению производителя.

Иммуноферментный анализ (производство «Нарвак») проводили в соответствии с наставлением по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота. Учет и интерпретацию результатов реакции осуществляли инструментально на ридере «Multiscan Multisoft» при длине волны 450 нм.

Выделение и очистку антигенов ВЛКРС проводили по методике Р.З. Файзулина [7]. Полипептид экспрессирован и выделен из *E.coli* в растворимом состоянии, очищен методом аффинной хроматографии. Рекомбинантные белки очищали в два этапа: аффинной хроматографией на сорбенте Ni-NTA-resin Qiagen (Германия) в 8 М растворе мочевины. Элюцию белка проводили 0,25 М раствором имидазола с последующим диализом против 0,1 % SDS, 20 mM трис-HCl (pH 8,0) и 1 mM раствором PMSF при температуре 8°C. Гель-фильтрацию полученного белка проводили на сорбенте сефакрил S400 (Pharmacia, Швеция) в буферном растворе, содержащем 0,1% SDS, 10 mM растворе трис-HCL (pH 8,0), 20 mM р-меркаптоэтанол и 1 mM раствором PMSF.

Для оценки диагностической эффективности антигенов была создана стандартная лабораторная панель сывороток для выявления антител к ВЛКРС. Для этого были взяты образцы крови от 96 животных. Отобранный материал был охарактеризован с

использованием коммерческих наборов (РИД и ИФА) и на его основе были созданы стандартные панели положительных и отрицательных сывороток крупного рогатого скота.

По результатам исследований в лабораторную панель вошли следующие группы образцов:

- отрицательные по двум тестам – 36;
- отрицательные в РИД, положительные в ИФА – 4;
- положительные по двум тестам – 56.

Для того чтобы в дальнейшем можно было использовать образцы сыворотки из панели для работы по разработке тест-системы ИФА, была проведена их стабилизация и консервация.

Мы исследовали разные по природе антигены в ИФА-тестах, используя положительные и отрицательные образцы сыворотки крови из панели (рисунок).

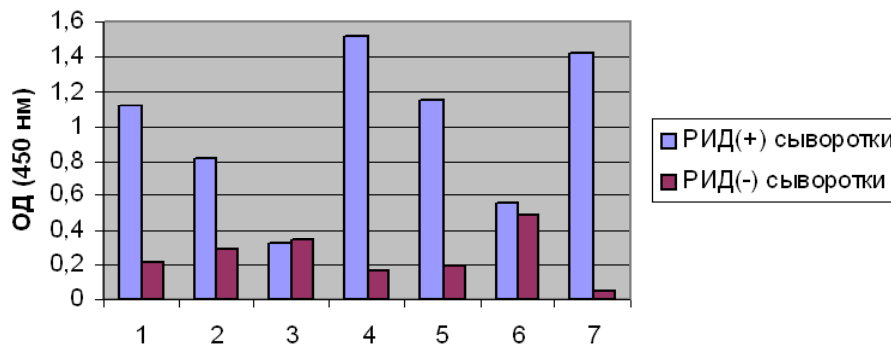


Рис. Выявление антител к ВЛ КРС методом ИФА среди РИД (+) и РИД (-) сывороток с использованием разных по природе антигенов

Цифрами по оси абсцисс обозначены разные по природе антигены: 1 – рекомбинантный очищенный АГ; 2 – рекомбинантный АГ; 3 – коммерческий АГ (из РИД-набора); 4 – МКА/рекомбинантный очищенный АГ; 5 – МКА/рекомбинантный АГ; 6 – МКА/коммерческий АГ; 7 – контроль (тест-система «Нарвак»). По оси ординат приведены параметры оптической плотности при длине волны 450 нм.

На рисунке представлены результаты выявления IgG-антител с использованием разных по природе антигенов и с различной степенью очистки. Значения показателей оптической плотности для всех антигенов получены с использованием одной и той же выборки положительных (n=15) и отрицательных (n=15) сывороток крови из панели. Как показывают приведенные на рисунке данные, выявление антител к ВЛКРС зависит от чистоты антигена (очищенный антиген 1) и способа нанесения белкового антигена на иммунопланшет (МКА/очищенный рекомбинантный антиген 4). Так, при использовании рекомбинантных белков с МКА выявляемость позитивных сывороток была наиболее высокой (80-92%), коммерческий антиген позволяет выявлять антитела к ВЛКРС с низкой эффективностью (54-67%). При использовании коммерческого антигена фоновый сигнал при выявлении антител был значительно выше от контрольных и исследуемых сывороток. Эффективность выявления антител в ИФА с использованием разных по природе антигенов соответствовала следующему ряду: 4 > 5 > 1 > 2 > 6 > 3.

Чувствительность и специфичность разных антигенов по сравнению с РИД составила 70-93%. Суммарная реактивность антигенов, используемых в работе, – 90% от общего числа тестируемых сывороток. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными

данными о том, что наиболее иммуногенные свойства проявляют очищенные антигены gp51 и p24.

Чувствительность и специфичность выявления антител к ВЛКРС составили 67-87% для разных по природе антигенов, что соответствует литературным данным [8].

Таким образом, оба метода (РИД и ИФА) позволяют эффективно диагностировать антитела к ВЛКРС. Чувствительность и специфичность разных антигенов по сравнению с РИД составила 70-93%. Очищенный рекомбинантный антиген может быть успешно использован для создания на его основе ИФА-тест-систем.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Иммунологические** методы выявления инфекции вируса лейкоза у крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн [и др.]. Рига: Зинатне, 1982. - С. 105-151.
2. **Estimation** of the sensitivity and specificity of the agar-gel immunodiffusion test for bovine leukemia-virus - 1,296 cases (1982-1989) / D.R. Monke et al. // J. Amer. Vet. Med. Ass. - 1992. - Vol. 200, N 12. - P. 2001-2004.
3. **K. Takahashi Kono J.** Development of practical ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus: comparison of its sensitivity with that of virus neutralization and agar gel immunodiffusion tests // Jpn. J. Vet. Sci. - 1985. - Vol. 47, N 2. - P. 193-200.
4. **Synthesis** of Bovine Leukemia-Virus Antigens in Escherichia-Coli / R. Ulrich et al. // Archiv fur experimentelle veterinarmedizin. - 1990. - Vol.44, N 6. - P.909-916.
5. **Expression** of Bovine Leukemia-Virus Antigens Fused to Ms2 Polymerase in Escherichia-Coli / R. Ulrich [et al.] // Acta virologica. - 1991. - Vol.35, N 4. - P.391-395.
6. **Вирусные** болезни животных / В.Н.Сюрин и др. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 383-406.
7. **Файзулин Р.З., Чекишев В.М.** Универсальные реагенты для диагностики инфекционных болезней животных в иммуноферментном анализе // Диагностика инфекционных болезней животных: сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 1993. - С. 55-63.
8. **Seroprevalence** of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods / K.G. Trono et al. // Vet. Microbiol. - 2001. - N 3. - P. 235-248.