

**Спиридонов В.Г.**, доктор сельскохозяйственных наук\*  
**Ситюк Н.П.**, кандидат ветеринарных наук\*\*  
**Мельничук С.Д.**, доктор биологических наук\*  
**Гончаренко В.С.**, старший научный сотрудник\*  
**Нычик С.А.**, доктор ветеринарных наук\*\*  
**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

\*Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК НУБиП, г.Киев

\*\*Институт ветеринарной медицины НААН, г. Киев

РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышелесского" г.Минск

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФИТЦ-ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

### Резюме

В статье приведены методические подходы по изготовлению специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней. Детально изложены этапы гипериммунизации лабораторных животных рекомбинантным антигеном-аналогом вируса АЧС - rK205R, получения и очистки иммуноглобулинов, их конъюгация со специфическим красителем и сравнение спектрофотометрических характеристик ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС с коммерческим аналогом.

### Summary

The article presents the methodological approaches to the production of specific antibodies to FITC-immunofluorescent diagnosis of African swine fever. Detailed stages of laboratory animals hyperimmunization recombinant antigen analogue of ASF virus - rK205R, preparation and purification of specific antibodies, their conjugation with a specific dye and comparison of spectrophotometric characteristics of FITC-ASF immunoglobulins with commercial counterparts.

Поступила в редакцию 27.10.2014 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, высоколетальная болезнь домашних и диких свиней разного возраста и пород, которая регистрируется независимо от поры года [7, 8, 10].

Впервые болезнь была зарегистрирована среди свиней европейских пород Д. Хатчеоном в Южной Африке в 1903 г. и детально описана Монтгомери в 1921 г. [5]. До 60-х годов XX ст. АЧС была широко распространена только в странах Африки. С 1957 г. эпизоотии АЧС были зарегистрированы в Европе, с 1971 г. – в Латинской Америке [6, 8]. В 2007 г. АЧС была занесена с территории Мадагаскара и Мозамбика в Кавказский регион (Грузию, Армению, Азербайджан) и Россию [3, 4, 12].

Сейчас нозоарел АЧС расширяется на территории России (2007–2014 гг.), Украины (2012, 2014 гг.), Белоруссии (2013 год), Литвы (2014 г.), Польши (2014 г.), Эстонии (2014 г.) [21].

Особую роль в ликвидации и профилактике АЧС занимает лабораторная диагностика заболевания. Для выделения вируса АЧС используют образцы лимфатических узлов, селезенки и миндалин, кровь с антикоагулянтом – EDTA или гепарином, костный мозг [9, 13, 18]. Для его выявления применяют реакцию иммунофлуоресценции [6, 13, 14], иммуноферментный анализ [1, 6], реакцию диффузной преципитации [1, 6], реакцию гемадсорбции в культуре лейкоцитов свиней [6, 14], реакцию связывания комплемента [1, 6], иммуноэлектро-

осмофорез, радиоиммунный анализ [6]; для выявления генетического материала вируса – полимеразную цепную реакцию [1, 9, 18].

Наиболее достоверным методом диагностики АЧС является выделение вируса в культурах лейкоцитов свинки в реакции гемадсорбции или аутогемадсорбции [20], но некоторые изоляты вируса АЧС не выявляются этими методами [13]. Поэтому Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) рекомендует для диагностики АЧС использовать методы полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресценции [15]. В Украине для лабораторной диагностики АЧС используют тест-системы полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресценции исключительно зарубежного производства.

**Целью** нашей работы было разработать методические подходы по изготовлению оригинальных отечественных ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательские работы по изготовлению специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС проводили в отделе молекулярной диагностики Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК НУБиП Украины.

Рекомбинантный антиген-аналог вируса АЧС рК205R «LT-Biotech» (Литва) использовали для иммунизации двух лабораторных кроликов весом  $2,0 \pm 0,2$  кг, которым на 1-е, 14-е, 28-е, 42-е и 56-е сутки вводили внутримышечно по 2,0 мг антигена с полным адьювантом Фрейнда (1:1). На 70-е сутки получали специфическую поликлональную сыворотку крови.

Контроль образцов крови кроликов по уровню накопления антител после иммунизации проводили иммуноферментным анализом. Рекомбинантный антиген-аналог вируса АЧС рК205R разводили 0,05 М карбонатным буфером (рН 9,5) и вносили в лунки полистиролового планшета

Maxi Sorb (Nunk) в количестве 10,0 мкг/мл. Планшет инкубировали на протяжении 16–18 часов при температуре 4 °С. После инкубации планшет промывали несколько раз раствором для промывки (0,02 М фосфатный буфер и 0,05 % Tween-20 с рН 8,0). Образцы сывороток крови кроликов разводили в 50 раз раствором для отмывки и вносили в лунки планшета, инкубировали при температуре 37 °С на протяжении 60 минут. По окончании инкубации лунки планшета промывали раствором для промывки и вносили в лунки иммуноферментный конъюгат (rSPGP-пероксидаза хрена) [2] в рабочем разведении 1:32000. Инкубацию планшета с конъюгатом проводили в течение 40 минут при температуре 37 °С. Лунки планшета вновь тщательно промывали и вносили раствор с красителем – хромоген тетраметилбензидин (Fluka). После 20 минут инкубации планшета при комнатной температуре реакцию останавливали путем добавления 0,5 М раствора серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм.

**Выделение иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови кроликов.** Иммуноглобулины класса G (IgG) высаливали из сыворотки крови при помощи соли сульфата аммония – 35 % раствор согласно общепринятым методам [11]. Осадок иммуноглобулинов хранили при температуре 4 °С.

**Конъюгация IgG с флуоресцентным изотиоцианатом (ФИТЦ).** Осадок IgG растворяли в дистиллированной воде до концентрации 10 мг/мл и высаливали методом эксклюзивной хроматографии на сефадексе G-75 (GE Healthcare Life Sciences), используя хроматографическую систему Biologic LP (BioRad). Хроматографический пик иммуноглобулинов переводили в 0,67 М боратный буфер (рН 8,5), добавляли ФИТЦ (Calbiochem, Molecular biology grade) в соотношении 1:1 по массе и инкубировали один час при комнатной температуре в темноте. После инкубации реакционную смесь очищали на сефадексе G-75. Характерный пик меченых ФИТЦ иммуноглобулинов переводили в 0,02 М фосфатно-

солевой буфер, который содержит 0,25 М NaCl и 0,1% Na<sub>3</sub>. Измеряли УФ-спектры на спектрофотометре BioSpec-Nano (Shimadzu) при длине волны 280 и 494 нм.

**Расчет эффективности конъюгации ФИТЦ-IgG.** Эффективность ковалентного присоединения ФИТЦ к IgG выражали как молярное соотношение ФИТЦ/IgG или F/P, используя формулу 1, концентрацию меченых ФИТЦ иммуноглобулинов подсчитывали по формуле 2 [17, 23]:

$$F/P = \frac{2,77^* \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})^{**}} \quad (1)$$

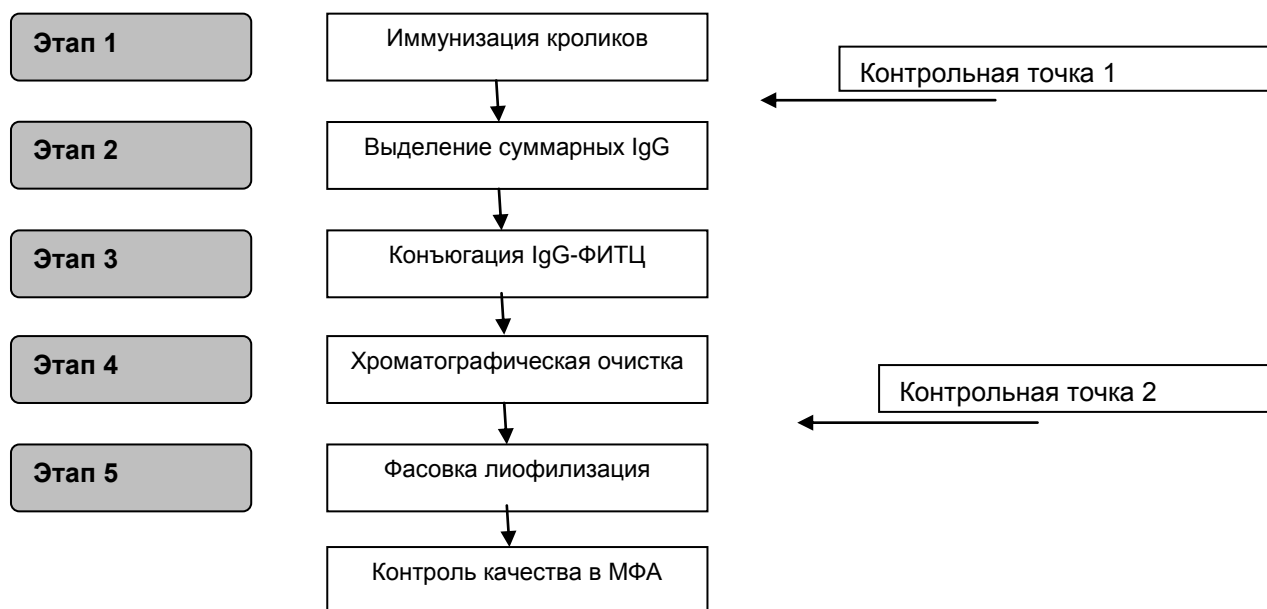
$$IgG \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4^{***}} \quad (2)$$

Примечание – \*константа для ФИТЦ-IgG конъюгатов; \*\*фактор коррекции, поскольку ФИТЦ поглощает на 280 нм; \*\*\*оптическая плотность IgG (A<sub>280</sub>) при концентрации 1,0 мг/мл

После определения эффективности конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами и концентрации меченных антител к препарату добавляли 10-тикратное количество бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich), фасовали по 0,5–1,0 см<sup>3</sup> в стеклянную тару, замораживали при температуре 80<sup>0</sup>С и лиофильно сушили в вакуумном сушильном шкафу Telstar Cryodos.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Технологическая блок-схема изготовления специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС состоит из 5 этапов, представленных на рисунке 1. При этом предусмотрены две контрольные точки: первая точка – контроль за титром антител после иммунизации кроликов рекомбинантным антигеном-аналогом рК205R вируса АЧС; вторая точка – контроль за эффективностью конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами.



**Рисунок 1 – Блок-схема технологического процесса изготовления ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС**

В качестве антигена для иммунизации лабораторных животных мы выбрали коммерчески доступный рекомбинантный препарат рК205R производства «LT-Biotech» (Литва). Нами были иммунизиро-

ваны антигеном рК205R два кролика и на 70-е сутки получена специфическая сыворотка с показателями оптической плотности в иммуноферментном анализе 3,12 и 3,56 соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Результат иммуферментного анализа

День после иммунизации	Оптическая плотность 450 нм		
	кролик 1	кролик 2	среднее
0	0,025±0,01	0,030±0,02	0,027±0,015
42	0,85±0,01	1,050±0,01	0,95±0,01
56	2,25±0,02	2,82±0,01	2,535±0,015
70	3,126±0,01	3,56±0,02	3,343±0,015

Из сыворотки крови были выделены суммарные иммуноглобулины класса G, которые в дальнейшем были мечены ФИТЦ. Реакция конъюгации иммуноглобулинов ФИТЦ представлена на рисунке 2.

Реакция конъюгации ФИТЦ происходит между свободными аминогруппами протеинов с образованием стабильной тиомочевинной связи.

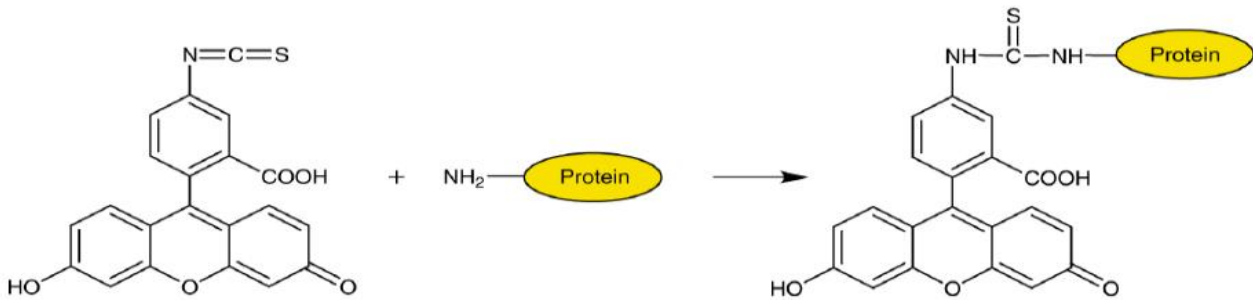


Рисунок 2 – Реакция конъюгации ФИТЦ с протеинами (схема)

После конъюгации ФИТЦ с IgG нами была проведена хроматографическая очистка целевого продукта (конъюгат ФИТЦ-IgG) от продуктов распада ФИТЦ, которые не связались с IgG. На рисунке 3 представлен хроматографический профиль очистки конъюгата. Пик А, который представляет

целевой продукт, собирали в отдельную пробирку и проводили дополнительный спектрофотометрический анализ (контрольная точка 2) качества конъюгации антител ФИТЦ и количества конечного препарата (рисунок 4).

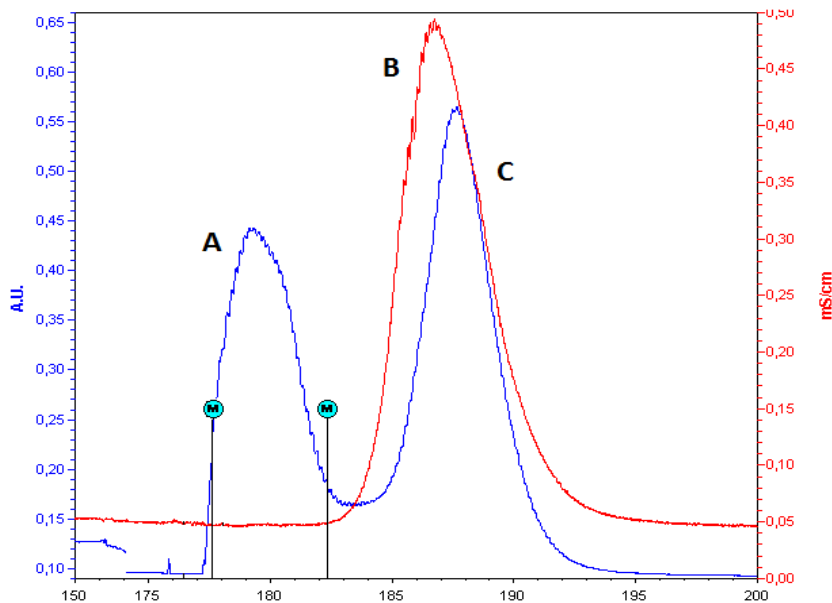
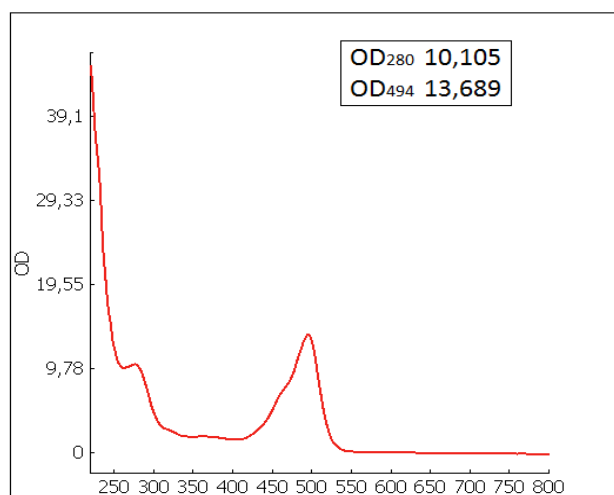


Рисунок 3 – Хроматографический профиль очистки ФИТЦ-иммуноглобулинов

Распределение продуктов реакции проводили на хроматографе Biologic LP (BioRad) с использованием матрицы сефадекс G-75 (размер колонки 20\*500 мм, скорость протока 1 мл/мин). Пик А – целевой продукт (конъюгат ФИТЦ-IgG); пик В –

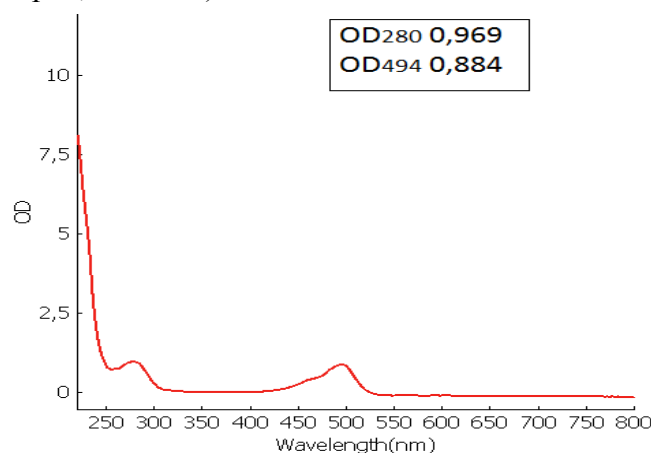
кондуктивность протока; пик С – продукты распада ФИТЦ, которые не связались с IgG. Справа шкала кондуктивности (mS/cm), слева – УФ спектр 280 нм (оптические единицы).



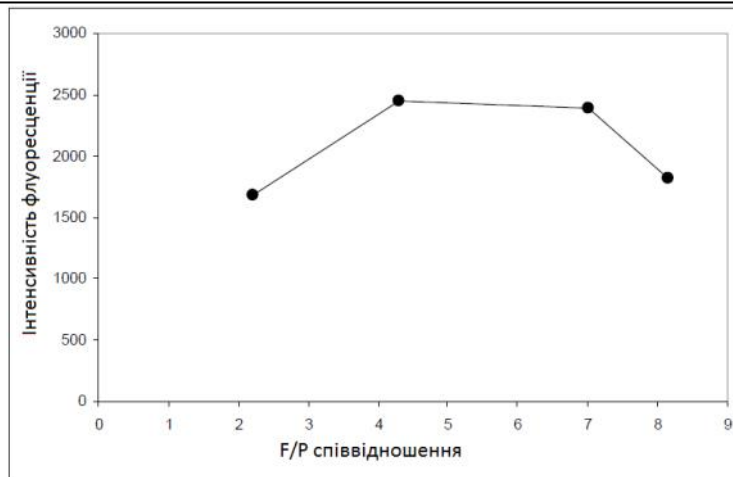
**Рисунок 4 – Контрольная точка 2. УФ-спектры целевого продукта (конъюгат ФИТЦ-IgG) на сканируемом спектрофотометре BioSpec-Nano (Shimadzu)**

Показаны пики оптической плотности (OD) при длине волны 494 и 280 нм. Нижняя шкала – длина волны (нм). Согласно полученным данным (рисунок 4) и формуле (1) нами был получен препарат – меченные ФИТЦ-антитела с соотношением F/P = 7, что указывает на высокое физико-химическое качество полученного конъюгата. Паралельно мы оценили спектрофотометрические характеристики ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС производства ГНУ ВНИИВВиМ (г. Покров, Россия) после

хроматографической очистки на матрице сефадекс G-75. Полученные данные представлены на рисунке 5. После проведения подсчета по формуле (1) мы получили показатель соотношения F/P, который равнялся 3,5. Это свидетельствует о низкой эффективности конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами. Рекомендованный эффективный диапазон соотношения F/P для ФИТЦ-IgG конъюгатов лежит в пределах 4–7 [22] (рисунок 6).



**Рисунок 5 – Спектрофотометрическая характеристика ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС серия № 06-12 от 06.11.12 производства ГНУ ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия**



**Рисунок 6 – Взаємозв'язок між співвідношенням F/P для ФІТЦ-IgG кон'югатів та інтенсивністю флуоресценції ФІТЦ (заїмствований з [23])**

### ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным антиген рК205R вируса АЧС является одним из перспективных кандидатов для серологической диагностики АЧС. В работах [16, 19] показано, что именно этот протеин является маркером ранней инфекции (экспрессия начинается с 4-го часа после инфицирования). Этот протеин обладает высоким иммунологическим потенциалом (титр антител обнаруживается на 7-е сутки после инфицирования), является достаточно консервативным среди разных штаммов вируса АЧС (в сравнении с другими антигенами) и характеризуется высокими показателями чувствительности и специфичности в иммуноферментном анализе (91% и 99 %, соответственно).

При получении отечественных ФІТЦ-иммуноглобулинов для детекции антигена вируса АЧС мы параллельно оценили их спектрофотометрические характеристики при сравнении с ФІТЦ-иммуноглобулинами-аналогами производства ГНУ ВНИИВВиМ (г. Покров, Россия). Данные соотношения показателей F/P

свидетельствуют о получении значения 3,5. Такой цифровой показатель является результатом низкой эффективности конъюгации ФІТЦ с иммуноглобулинами, а рекомендованный эффективный диапазон соотношения F/P для ФІТЦ-IgG кон'югатів должен находится по данным [22] в пределах 4–7.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработан технологический процесс получения отечественных специфических ФІТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней.

В перспективе дальнейших научных исследований необходимо испытать отечественные специфические ФІТЦ-иммуноглобулины на модели мазков-отпечатков из патологического материала от павших или вынужденно убитых с подозрением на африканскую чуму домашних или диких свиней и сравнить их с коммерческими аналогами.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Африканская чума свиней // Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – Москва : ВНИТИБП, 1998. – С. 770–787.
- 2 Бактеріальний синтез IgG-зв'язувального домену білка G Streptococcus sp. та перспективи його використання в імунологічній практиці / В. Г. Спиридонов, Д. Ю. Рибальченко, Р. М. Чумак [та ін.] // Мікробіологічний журнал. – 2006. – Т. 68, № 5. – С. 31–35.
- 3 Генкина, Р. Тревожная осень 2010-го. Ученые и руководители государственной ветеринар-

---

ной службы обсудили пути ликвидации АЧС в России / Р. Генкина // Ветеринарная жизнь. – 2010. – № 20. – С. 4–5.

4 Дудников, С. А. Африканская чума свиней – три года "прогресса" / С. А. Дудников, Л. А. Дудников // Сучасна ветеринарна медицина. – 2011. – № 1. – С. 30–32.

5 Коваленко, Я. Р. Африканская чума свиней / Я. Р. Коваленко, М. А. Сидоров, Л. Г. Бурба. – Москва : Колос, 1972. – 200 с.

6 Козлова, Д. И. Современные проблемы африканской чумы свиней / Д. И. Козлова, В. А. Бесхлебнов. – Москва, 1980. – 60 с.

7 Кушнир, А. Т. Африканская чума свиней (Обзор литературы) / А. Т. Кушнир, Е. М. Хрипунов // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей : материалы междунар. науч.-практ. конф. 16–18 апр. 2002 г. – Покров, 2002. – С. 136–140.

8 Ликвидация африканской чумы свиней в Республике Абхазия / В. Н. Герасимов, С. А. Кукушкин, А. В. Мищенко [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 3. – С. 19–24.

9 Пособие по подготовке чрезвычайных планов действий на случай эпидемии африканской чумы свиней / М.-Л. Пенрит, В. Губерти, К. Депнер, Х. Луброт. – Ереван: Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций, 2011. – XI, 77 с. – (Служба животноводства и здоровья животных ФАО; N 8).

10 Потоцкий, М. Африканська чума свиней (Pestis africana suum) / М. Потоцкий // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 12. – С. 23–26.

11 Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – Москва : Мир, 1985. – 358 с.

12 Юбхашини, Э. Африканская чума свиней в Республике Маврикий: (развернутый реферат дипломной работы выпускницы кафедры ветеринарной патологии Российского Университета Дружбы народов) / Эмритлолл Юбхашини // Ветеринарный консультант. – 2008. – № 22. – С. 10–12.

13 African swine fever / A. R. Spickler, J. A. Roth, J. Lofstedt, J. Galyon // Emerging and Exotic Diseases of Animals / A. R. Spickler, J. A. Roth, J. Lofstedt, J. Galyon. – 4th ed. – 2010. – P. 83–85.

14 African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol. 2 / World Organisation for Animal Health. – 7th ed. – 2012. – P. 1067–1079.

15 African swine fever [Electronic resource] // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – Mode of access: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.01\\_ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf). – Title from the screen.

16 Expression, cellular localization and antibody responses of the African swine fever virus genes B602L and K205R / B. Gutierrez-Castaneda, A. L. Reis, A. Corteyn [et al.] // Archives of Virology. – 2008. – Vol. 153. – P. 2303–2306.

17 McKinney, R. M. Fluorescein diacetate as a reference color standard in fluorescent antibody studies / R. M. McKinney, J. T. Spillane, O. W. Pearce // Analytical Biochemistry. – 1964. – Vol. 9. – P. 474–476.

18 Preparation of African swine fever contingency plans / M.-L. Penrith, V. Guberti, K. Depner, J. Lubroth. – Rome: FAO animal production and health, 2009. – XI, 69 p. – (FAO Animal Production and Health: N 8).

19 Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A. L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2009. – Vol. 16, N 7. – P. 1012–1020.

20 Sánchez-Vizcaíno J. M. Detección precoz y planes de contingencia para peste porcina africana [Electronic resource] / J. M. Sánchez-Vizcaíno. – Mode of access : <http://www.oie.int/doc/ged/D11830.PDF>. – Title from the screen.

21 Summary of Immediate notifications and Follow-ups – 2014 [Electronic resource]. – Mode of access : [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary). – Title from the screen.

22 SureLINK™ Fluorescein (FITC) Labeling Kit manual [Electronic resource] / KPL. – Mode of access : <http://www.kpl.com/docs/datasheet/820001.pdf>. – Title from the screen.

23 The T. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation / T. The, T. Feltkamp // Immunology. – 1970. – Vol. 18. – P. 865–873.