

УДК: 619: 616.98: 578.825.1- 078.

Чаплыго К.Э., аспирант

Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАЕН

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

Иванова И.П., младший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РНГА И РН ПРИ КОНТРОЛЕ ИММУНОГЕННОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Резюме

На основе штамма КМИЭВ - V 106 вируса болезни Ауески с использованием эритроцитов КРС по методу J. Jandl, R. Summons в модификации Красочко П.А. был сконструирован эритроцитарный диагностикум.

Была проведена сравнительная оценка применения РНГА и РН для определения напряженности иммунитета вакцинированных против болезни Ауески животных

Summary

On the base of pseudorabies virus (SMIEV - V 106) with application of erytracytes of cattle by method J. Jandl and R. Summons with modification P. Krasochko was made the diagnosticum. The comparative estimation of application RИHA and RN for assessment of intensity of immunity at vaccinated against Aujeszky's disease animals was carried out

ВВЕДЕНИЕ

При производстве инактивированных вакцин актуальной задачей по-прежнему остается совершенствование методов контроля антигенности вирусного сырья и иммуногенности уже готового препарата.

Иммуногенность вакцины является основным критерием оценки ее качества. Она может быть определена классическим методом, т.е. посредством контрольного заражения вирулентным вирусом иммунизированных животных, а также опосредованным методом, который с помощью серологических тестов позволяет выявить процент особей, дающих положительный титр антител, его уровень, разброс и т.д. [6].

Для серодиагностики болезни Ауески применяется целый ряд серологических реакций, но эталонным методом считается реакция нейтрализации (РН).

Несмотря на высокую чувствительность и специфичность, РН имеет ряд недостатков: большие временные затраты на постановку реакции и учет ее результатов, трудоемкость, невозможность исследования некоторых сывороток вследствие их цитоксичности, а также зависимость уровня получаемых титров вируснейтрализующих антител от типа используемых культур клеток, вирусного штамма, количества вируса, наличия комплемента т.д.

На сегодняшний день, помимо РН, среди серологических методов широкое применение получил ИФА. Этот тест более чувствителен,

чем РН, требует меньших временных затрат на постановку, однако и менее специфичен, что приводит к высокому уровню ложноположительных реакций.

Для исследования сывороток крови различных видов животных используют также реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), которая не уступает по чувствительности РН и является не менее специфичным тестом. Помимо этого, РНГА позволяет получать результаты во много раз быстрее (через 1,5 – 2 часа) по сравнению с РН (5 суток), не зависит от цитолитических свойств проверяемых сывороток и используемых клеточных культур, отличается стабильностью получаемых результатов, дает возможность одновременного исследования большого количества проб материала.

В основу РНГА положена адсорбция антигена (Ag) на поверхности эритроцитов с последующей их агглютинацией гомологичными сыворотками. При этом чувствительность данной реакции в значительной степени зависит от качества используемого эритроцитарного диагностикума (ЭД).

Основные этапы конструирования ЭД сводятся к получению стабильной взвеси эритроцитов, обеспечению оптимальных условий нагрузки сенситинов на эритроциты, стабилизации свойств полученного препарата.

При выборе эритроцитов учитывают уровень их резистентности к воздействию химических и физических факторов, а также отсутствие агглютинации с нормальными сыво-

ротками крови, что позволяет исключить получение неспецифических результатов. Так, эритроциты собак, свиней, кроликов, мышей малопригодны для конструирования ЭД, так как в процессе обработки легко лизируются, эритроциты же барана, курицы и человека с первой группой крови являются высокорезистентными и могут быть использованы в качестве носителей сенситинов любой природы. Тем не менее, те же эритроциты барана, несмотря на наличие высокой резистентности, после обработки танином могут агглютинироваться нормальными сыворотками животных.

К эритроцитам, отвечающим вышеуказанным требованиям (уровень резистентности, отсутствие агглютинации нормальными сыворотками) можно отнести эритроциты крупного рогатого скота (КРС). По данным Дяченко Н. С. [1], проводившего конструирование аденовирусного ЭД, среди исследуемых им эритроцитов 7-ми видов животных (баран, лошадь, КРС, обезьяна, курица, морская свинка, крыса) эритроциты КРС оказались самими пригодными. Данные эритроциты не агглютинируются нормальными сыворотками крови различных видов животных, устойчивы при обработке любыми стабилизаторами, и являются менее чувствительными к агглютинирующему действию танина (агглютинирующая доза составляет 0,2-1%). Положительные результаты по применению эритроцитов КРС в качестве носителей белковых сенситинов были также получены Красочко П. А. [5], Ковалевым Н. А. [3].

Одним из важных моментов при конструировании ЭД является стабилизация эритроцитов. С этой целью могут быть использованы ацетальдегид, глутаровый альдегид, смесь формальдегида и этилового спирта и т.д. Наибольшее распространение получил формалин, а сам метод обработки вошел в терминологию как «формалинизация». На сегодняшний день в литературных источниках описано большое количество методов формализации, но ни один из них не является универсальным. Доказано, что диагностикумы, приготовленные на основе формализованных эритроцитов, уступают по серологической активности препаратам, полученным на основе нативных эритроцитов. В процессе хранения такие эритроциты могут спонтанно агглютинировать, лизироваться и частично утрачивать активность.

Многие авторы в качестве наиболее пригодного стабилизатора рекомендуют использовать химически чистый акролеин, при-

менение которого позволяет получать стандартные ЭД. Стабилизированные акролеином эритроциты не гемолизируются в воде. После хранения более 3-х лет при 4°C они легко ресуспендируются в солевых растворах без признаков гемолиза и спонтанной агглютинации.

Танизацию эритроцитов проводят с целью повышения их сорбционной емкости, в результате чего они приобретают способность фиксировать вещества белковой природы. Под действием танина так же изменяется проницаемость эритроцитов, скорость их оседания и осмотическая резистентность, увеличивается уровень агглютинабельности.

Наиболее важным и сложным в получении сенсibilизированных белками эритроцитов является осуществление самого процесса гемо-сенсibilизации. Эффективность данного процесса определяется рядом параметров, наиболее существенными среди которых являются показатели рН, концентрации эритроцитов, температура среды, время контакта реагентов. Сенсibilизация эритроцитов должна проводиться высокоактивными сенситинами в оптимальных концентрациях, так как избыточная доза белка приводит к неспецифической агглютинации, а недостаточная - не обеспечивает максимальной активности препарата [4].

Важная роль в процессе сенсibilизации также отводится применению конъюгирующих веществ, в качестве которых могут быть использованы: риванол, амидол, хлористый цинк, циан, хром и т.д. Их применение обеспечивает процесс «сшивки» белков с эритроцитами за счет образования между ними ковалентных связей, наличие которых в свою очередь способствует более длительному сохранению свойств ЭД [2].

Целью исследования является разработка антигенного эритроцитарного диагностикума и проведение сравнительной оценки применения РНГА и РН для определения напряженности иммунитета вакцинированных против болезни Ауески животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления ЭД нами был выбран метод J. Jandl, R. Summons (1957) в модификации Красочко П. А. и соавт. (1988), основанный на использовании в качестве носителя Ag стабилизированных акролеином эритроцитов КРС с применением в процессе сенсibilизации хлорида хрома.

Активность сконструированного ЭД контролировали посредством постановки

РНГА с высокоспецифическими противовирусными антисыворотками, полученными от вакцинированных против болезни Ауески свиней. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках проверяли методом ИФА с использованием набора ANTIGEN PRV gB Ab ELISA.

Изготовленный ЭД контролировали на уровень чувствительности в зависимости от сроков хранения. ЭД хранили при $t + 4^{\circ}\text{C}$. Образцы препарата исследовали через 1, 3 и 6 месяцев (срок наблюдения) со дня изготовления со специфическими сыворотками.

Эмульгированную инактивированную вакцину готовили путем диспергирования авирулентного и очищенного материала из штамма КМИЭВ-V106 вируса болезни Ауески в количестве 70,0 % по массе и масляного адьюванта в количестве 30,0% по массе.

Иммуногенность вакцины проверяли посредством вакцинации морских свинок живой массой 300-400 г. Вакцину вводили подкожно двукратно в дозе 1 мл с интервалом 14 дней. Пробы крови отбирали перед иммунизацией и через 7, 14, 28 дней после первой иммунизации.

РНГА ставили микрометодом в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

Исследуемые сыворотки крови не инактивировали, так как в качестве носителя антигена были использованы эритроциты КРС, которые не агглютинируются нормальными сыворотками крови морской свинки, а имеющиеся в сыворотке термолабильные и термостабильные ингибиторы не влияют на результат РНГА.

Постановку реакции осуществляли следующим образом: в каждую лунку планшеты вносили по 25 мкл растворителя (физиологический раствор с 1% кроличьей сыворотки), затем в первые лунки добавляли по 25 мкл испытуемых сывороток и проводили их последовательное двукратное разведение (25 мкл с лунок последнего ряда удаляли для сохранения пропорции), после чего в каждую лунку планшета вносили по 25 мкл ЭД.

Параллельно ставили контроли:

1) На спонтанную гемагглютинацию ЭД (ЭД + физиологический раствор с 1% кроличьей сыворотки).

2) На специфичность сенсibilизированных эритроцитов (ЭД + нормальная сыворотка).

3) На отсутствие в сыворотках неспецифических геммагглютининов (исследуемые сыворотки + несенсибилизированные эритроциты).

Планшет встряхивали и выдерживали при комнатной температуре. Учет реакции производили после полного оседания эритроцитов в контроле (1,5 – 2 часа). Результаты оценивали по 4-х балльной системе в крестах:

4+ - осадок в виде хорошо выраженного «зонтика» с загибающимися краями;

3+ - «зонтик» с ровными краями;

2+ - «зонтик» со слабо выраженным кольцом по краю;

1+ - отчетливое кольцо;

- - отсутствие агглютинации эритроцитов и образование осадка в виде точки.

За титр антител сыворотки принимали то ее разведение, которое еще вызывало агглютинацию эритроцитов не менее чем на 2 креста.

РН ставили микрометодом в 96-луночной планшете посредством двукратного разведения испытуемых сывороток с постоянной дозой вируса в культуре клеток ВНК-21.

Перед постановкой реакции сыворотки инактивировали прогреванием на водяной бане при 56°C в течение 30 минут для разрушения комплекта.

Рабочую дозу вируса, равную 300 ТЦД_{50/50} мкл, получали путем разведения исходной вирусной суспензии с известным титром поддерживающей средой.

Постановку реакции осуществляли следующим образом: в лунки микропланшеты вносили по 50 мкл поддерживающей среды, затем в первые лунки ряда вносили по 50 мкл исследуемых сывороток и проводили их двукратное разведение. Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл вирусной суспензии, содержащей 300 ТЦД_{50/50} мкл. Планшет помещали в CO₂ инкубатор на 1 час при 37°C . После инкубации, в каждую лунку планшета добавляли по 150 мкл суспензии клеток ВНК-21, содержащей 150000 кл/мл. Планшет слегка встряхивали для равномерного распределения клеток по дну лунок и помещали в CO₂ инкубатор.

Параллельно ставили следующие контроли:

1) Вирусный контроль (подтверждение фактического количества вируса). Дозу вируса, используемую в РН (300 ТЦД_{50/50} мкл) разводили поддерживающей средой 1/10, 1/100, 1/1000. Затем 50 мкл каждого разведения помещали в 4 лунки планшета и в каж-

дую лунку добавляли по 150 мкл клеточной суспензии ВНК-21, смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После этого в каждую лунку вносили по 50 мкл поддерживающей среды.

2) Клеточный контроль. В каждую лунку помещали 150 мкл клеточной суспензии и 100 мкл поддерживающей среды.

3) Контроль сыворотки (для подтверждения отсутствия токсического воздействия сывороток на клетки). Планшет с лунками, содержащими по 50 мкл каждой сыворотки и 50 мкл поддерживающей среды, инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем добавляли 150 мкл клеточной суспензии.

4) Отрицательная контрольная сыворотка. Проводили те же манипуляции, что и с тестируемыми сыворотками.

Учет реакции осуществляли на 5-е сутки. За титр антител сыворотки принимали то ее разведение, которое еще сдерживало развитие цитопатического действия вируса в 50% зараженных культур клеток.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При конструировании ЭД отмытые эритроциты КРС (10%-ной концентрации), с целью их стабилизации, соединяли с равными объемами 0,2%-го акролеина на фосфатном буферном растворе (ФБР) (рН 7,2) и после 30-минутного контакта при 37°C, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для отделения акролеина. Стабилизированные эритроциты 3-хкратно отмывали ФБР (рН 7,2).

Танизацию эритроцитов осуществляли путем смешивания равных объемов 10%-ной взвеси эритроцитов и раствора танина в концентрациях 1:20000-1:50000 в течение 10-30 минут при 37 °С. После контакта, смесь центрифугировали, осадок 2-хкратно промывали ФБР (рН 7,2), а затем изотоническим раствором хлорида натрия (рН 7,2). При этом было установлено, что наиболее чувствительный ЭД получается при применении в процессе конструирования танина в концентрации 1:50000 и экспозиции 30 минут.

В качестве сенситина использовали штамм вируса болезни Ауески КМИЭВ-V106 с титром инфекционной активности 6,0 - 8,5 lg ТЦД₅₀/мл. Для удаления неспецифических гемагглютининов, находящихся в вирусосодер-

жащей жидкости, производили ее адсорбцию нормальными эритроцитами КРС при 37 °С в течение 30 минут. В ходе исследований было установлено, что при конструировании ЭД в качестве сенситина необходимо использовать вирусосодержащую жидкость с титром инфекционной активности 8,0 - 8,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Для повышения чувствительности и срока хранения диагностикума в качестве конъюгирующего вещества в процессе сенсibilизации использовали хлорид хрома.

Сенсibilизацию эритроцитов осуществляли путем смешивания 50%-ной взвеси стабилизированных акролеином, танизированных эритроцитов по следующей схеме: эритроциты - одна часть, сенсетин - одна часть, физиологический раствор (рН 7,2) - три части, 0,1% раствор хлорида хрома - пять частей. Реагенты перемешивали в течение 5 минут (время сенсibilизации). Реакцию останавливали добавлением 10-кратного количества ФБР (рН 7,2).

После трехкратного отмывания в ФБР, эритроциты ресуспендировали в консерванте, состоящем из 0,3%-ного фенолизированного физиологического раствора с 1,0 %-ной инактивированной нормальной кроличьей сывороткой, до 1,0 %-ной концентрации.

При проверке активности ЭД в РНГА со специфическими сыворотками, дающими в ИФА процент блокировки не менее 98%, титр вирусспецифических антител составил 1:128-1:256.

Последующее тестирование сконструированного образца ЭД на уровень активности в зависимости от сроков хранения показало сохранность и стабильность его свойств в течение 6 месяцев (срок наблюдения).

При исследовании проб сывороток крови от иммунизированных морских свинок в РНГА и РН, полученные данные считали достоверными, если контроли давали следующие результаты:

Для РНГА - отрицательная реакция во всех контрольных лунках (оседание эритроцитов в виде компактной точки).

Для РН:

- **Вирусный контроль.** Титр вирусной суспензии находится в пределах от 30 до 300 ТЦД₅₀/50 мкл.

- **Клеточный контроль.** Дно лунки покрыто сплошным монослоем культуры клеток ВНК-21 с характерной морфологией (фото 1).

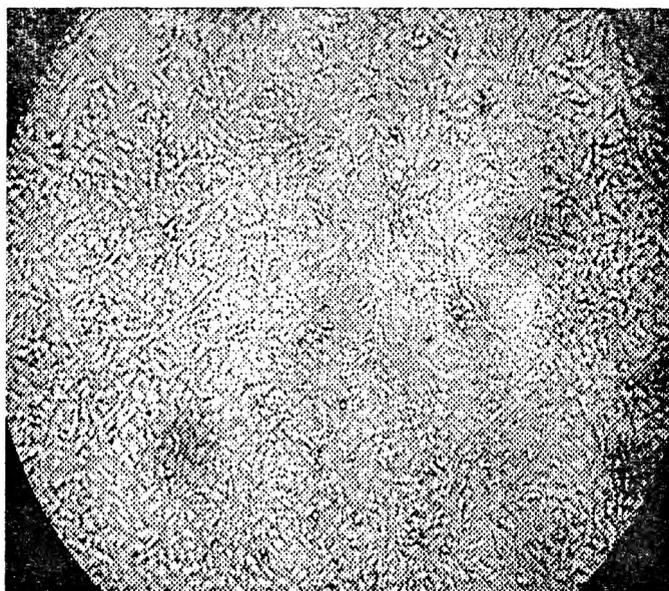
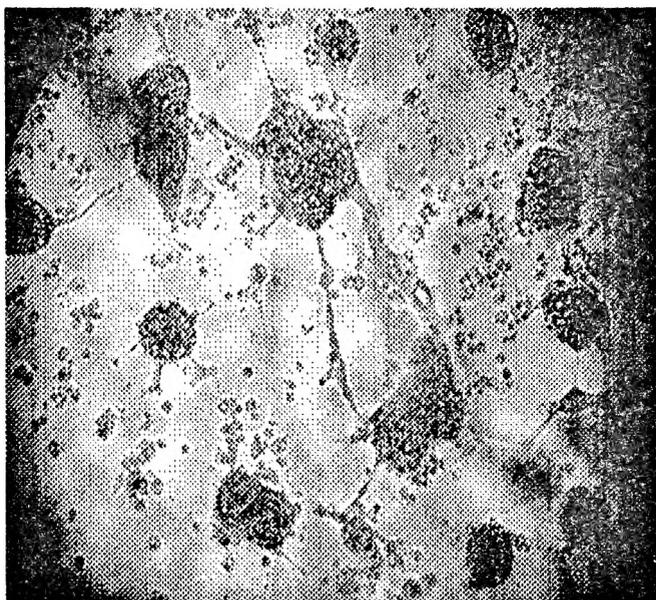


Фото 1 — Монослой интактной культуры клеток ВНК-21

-Контроль сыворотки на токсичность. Отсутствие каких-либо деструктивных изменений в клеточном монослое.

-Отрицательная контрольная сыворотка. Наличие специфического цитопатического действия вируса болезни Ауески в виде образования многоядерных гигантских клеток



— симпластов (фото 2).

Фото 2 — ЦПД вируса болезни Ауески на культуру клеток ВНК-21

В таблице 1 приведены результаты исследований по сравнительному изучению титров антител против вируса болезни Ауески в РН и РНГА.

Таблица 1 - Титры антител против вируса болезни Ауески в сыворотке крови

№	Количество дней после иммунизации	Титры антител			
		РН		РНГА	
		1/n	log ₂	1/n	log ₂
1	0 дней	0	0	0	0
2		0	0	0	0
3		0	0	0	0
4		0	0	0	0
1	7 дней	0	0	1:2	1
2		0	0	1:2	1
3		1:2	1	1:2	1
4		1:2	1	1:2	1
1	14 дней	1:8	3	1:4	2
2		1:8	3	1:4	2
3		1:16	4	1:8	3
4		1:16	4	1:8	3
1	28 дней	1:32	5	1:64	6
2		1:32	5	1:64	6
3		1:64	6	1:128	7
4		1:64	6	1:128	7

По данным, приведенным в таблице 1, видно, что иммунизация животных инактивированной вакциной против болезни Ауески способствует образованию и накоплению в их сыворотках крови высокого уровня вирусспецифических антител в значениях 1:64 в РН и 1:128 в РНГА. При этом показатели можно считать достоверными, так как исследование сывороток крови морских свинок, отобранных перед вакцинацией показали, что данные животные были серонегативны по болезни Ауески.

Согласно полученным результатам сконструированный ЭД для РНГА, можно считать высокочувствительным препаратом, так как его использование позволяет определять титры противовирусных АТ в сыворотках крови восприимчивых животных на ранних стадиях развития иммунного ответа. Примером этому может служить то, что в сыворотках крови, полученных на 7-мой день после вакцинации, вирусспецифические антитела регистрировались в РНГА в 100% случаев, в то время как в РН такой результат можно было обнаружить только в 50%.

На основании проведенных исследований между полученными в РН и РНГА данными была выведена корреляционная зависимость. Коэффициент корреляции при этом составил 0,8.

ВЫВОДЫ

1. На основе штамма КМИЭВ - V 106 вируса болезни Ауески с применением стабилизированных акролеином, танализированных эритроцитов КРС сконструирован эритроцитарный антигенный диагностикум, позволяющий определять напряженность иммунитета у вакцинированных против болезни Ауески животных в РНГА.

2. Диагностикум высокочувствителен, специфичен и сохраняет свои свойства не менее 6-ти месяцев (срок наблюдения).

3. Установлена корреляционная зависимость между титрами антител определяемыми в РН и РНГА, коэффициент корреляции составил 0,8.

4. РНГА по сравнению с РН проста в применении и высокоспецифична и может быть использована для оценки иммуногенной активности вакцины против болезни Ауески.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дяченко, Н.С. Пассивная гемагглютинация и ее применение в вирусологии / Н. С. Дяченко.- Киев: Наукова думка, 1979.- 122 с.

2. Каральник, Б.В. Эритроцитарные белковые

диагностикумы / Б. В. Каральник, Ю. П. Царевский, В. А. Шамардин.- Алмата: Наука, 1982.- 304 с.

3. Ковалев, Н.А. Эритроцитарный диагностикум для определения противовирусных антител в РНГА/ Н.А. Ковалев, М.М. Усеня //Весті Акадeмії аграрних наук.-2000.-№1.-С.65-68.

4. Коникова, Р.Е. Разработка эритроцитарных препаратов для выявления антигенов и антител в РНГА / Р.Е. Коникова, Ф.С. Носков, Г. А. Баяр //Труды института им. Пастера.- Спб.,1981.-Т 56.-С.13-31.

5. Красочко, П. А. Рекомендации по диагностике вирусных респираторных инфекций крупного рогатого скота в реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА)/ П. А. Красочко [и др.]. – Кишинев: ГПК «Молдгипрозем», 1988.- 8 с.

6. Сюрин, В. Н. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных / В. Н. Сюрин [и др.]. – М.: АГРОПРОМИЗДАТ, 1986. – 351 с.