

3. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus / B. K. Kang [et al.] // J. Virol. Meth. – 2007. – Vol. 145. – P. 30–36.
4. Hawkes, R. A dot immunoblotting assay for monoclonal and other antibodies / R. Hawkes, E. Niday, J. Gordon // Analyt. Biochem. – 1982. – Vol. 119. – P. 142–147.
5. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // OIE Terrestrial Manual, 2008. – Part 2, section 1, chapter 2.1.13. – P. 304–323.
6. Schneider, L. G. The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies / L. G. Schneider // Zentrabl. Veterinaer. Med. – 1969. – № 16. – P. 24–31.
7. Zimmerman, J. Zur brauchbarkein des cornea tested de Tollwut diagnose / J. Zimmerman // Berl. Munch. Tieraztl. Eachr. – 1971. – Vol. 84, № 9. – P. 172–174.

Поступила 30.06.2017 г.

УДК 619:616.98:578.826.2-07:636.4

**П. А. Красочко¹, С. В. Жаворонок², П. П. Красочко¹,
Д. С. Борисовец³, Т. М. Прокопенкова³**

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IG-АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е У СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

*¹УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь*

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь

*³РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелецкого»,
г. Минск, Беларусь*

Введение

По современным представлениям гепатит Е уже давно рассматривается как инфекционное заболевание, которое выявляется в развивающихся странах. Вирус гепатита Е генотипа 3 был выделен от пациентов (американцев) в США в 1997 г., а его природным резервуаром являются свиньи. Различные штаммы вируса гепатита Е были выделены от человека, а также от различных видов животных – домашних свиней, диких кабанов, мангустов, кроликов, верблюдов, кур, крыс, оленей, летучих мышей, хорьков, овец. Все штаммы относятся к семейству *Неревиридае*, которое было впервые описано в 2012 г. [1].

Вирус гепатита Е (HEV) является безоболочечным вирусом, содержащим РНК-геном 7,2 кб, который состоит из 5'-некодирующей области, трех открытых рамок считывания (ORFs) и 3'-некодирующей области [1, 2, 5].

Вирус гепатита Е успешно культивируется в клеточных линиях. Он может индуцировать как хронический гепатит, так и внепеченочные синдромы.

Анти-HEV антитела появляются при острой HEV инфекции и могут сохраняться в течение нескольких лет.

Полученные данные про ВГЕ-подобные вирусы в животном мире являются достаточно интересными и заслуживают дальнейшего внимания, особенно потому, что гепатит Е признан зоонозной инфекцией, с резервуарами у домашних свиней и диких кабанов, а также, вероятно, других видов животных [1]. Вызывают опасения последствия повсеместного наличия циркуляции ВГЕ у животных, имеющих отношение к производству пищевых продуктов (домашние свиньи и дикие кабаны, кролики, олени и многие другие виды животных), что может привести к употреблению инфицированных продуктов человеком, прямому контактированию человека с инфицированными животными, загрязнению окружающей среды и поверхностных вод фекалиями животных [1–4].

Штаммы ВГЕ свиней, особенно те, которые определены в промышленно развитых странах, часто связаны со случаями заболевания человека, в которых не было выявлено какого-либо конкретного источника инфекции [2, 3].

Таким образом, необходимость разработки системы его диагностики вируса гепатита Е для изучения его циркуляции на территории Республики Беларусь не вызывает сомнения.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского», НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии и кафедры эпизоотологии УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины».

Для конструирования тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней на первом этапе провели определение антител к вирусу гепатита Е в сыворотках свиней. Сыворотки крови от клинически здоровых свиней и свиней с поражением печени были исследованы на наличие антител классов IgG и IgM к ВГЕ (anti-HEV-IgM, anti-HEV-IgG) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Постановку ИФА проводили следующим образом: в лунки планшета вносили положительный и отрицательный контроли и исследуемые образцы сывороток в разведении 1:10, инкубировали 30 мин при температуре 37 °С, промывали 5 раз. Затем добавляли раствор конъюгата. Для исследования сывороток крови животных вместо антиглобулинового конъюгата использовали раствор белка А стафилококка, конъюгированного с пероксидазой хрена. Инкубировали 30 мин при температуре 37 °С, промывали 5 раз и добавляли субстрат (тетраметилбензидин). Инкубировали при комнатной температуре в течение 25 мин. Затем добавляли серную кислоту (стоп-реагент). Инкубацию ИФА-планшетов проводили в термошейкере «Dialab». Для промывки использовали автоматическое промывающее устройство «BiosanIW-8». Спектрофотометрическое измерение результатов реакции проводили на приборе Stat Fax 3200.

Для сенсбилизации полистироловых панелей использовали генноинженерные полипептиды ОРФ-2 и ОРФ-3 с антигенной последовательностью вируса гепатита Е генотипа 1, конъюгированные с бета-галактозидазой, полученные из ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова Российской академии медицинских наук» (г. Москва). Конъюгат белка А стафилококка получали из фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США).

Результаты и их обсуждение

При конструировании тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита Е в сыворотках крови свиней исследования проведены в несколько этапов.

На первом этапе исследований осуществлён подбор концентраций и буфера для сорбции полипептидов ОРФ-2 и ОРФ-3 на полистироловые планшеты после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением для повышения адгезивности для сорбции рекомбинантного антигена. Проведены отработка условий нанесения антигенов на планшет, а также подбора его оптимальной концентрации. Установлено, что оптимальная концентрация полипептидов для сорбции полипептидов ОРФ-2 и ОРФ-3 на полистироловые планшеты составляет 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатном буфере pH 9,5.

На втором этапе подобрано оптимальное разведение универсального конъюгата – белка А стафилококка с пероксидазой хрена для проявления тестируемых сывороток свиней.

Нами определено, что отправной точкой в оптимизации конъюгата является разведение исходного раствора в диапазоне 1:5000–1:50 000 (0,02–0,2 мкг/мл). Поэтому мы испытали следующие концентрации: 0,01, 0,1 и 0,3 мкг/мл.

В результате постановки реакции с набором сывороток для выявления антител против гепатита Е и использовании конъюгата – белка А стафилококка с пероксидазой хрена в различных разведениях было установлено, что высокая концентрация конъюгата приводит к значительному повышению оптической плотности отрицательного контроля, что сказывается на конечном результате в виде снижения диагностической чувствительности набора – слабо положительные пробы демонстрируют отрицательный результат. В связи с этим необходимо использовать меньшую концентрацию конъюгата.

При уменьшении концентрации конъюгата до 0,1 мкг/мл мы наблюдаем практически полное согласование результатов с изначально полученными с коммерческим набором. Кроме того, использование такой концентрации позволяет несколько повысить чувствительность метода – пробы, показывавшие отрицательный результат в исходном наборе, имеют слабо положительный результат в модифицированном методе.

Для оценки возможности использования меньшей концентрации конъюгата была испытана концентрация 0,01 мкг/мл аналогичным образом.

Снижение концентрации конъюгата до 0,01 мкг/мл снижает чувствительность набора. Изначально положительные пробы с низким содержанием антител

в данном варианте показывают отрицательный результат, что в итоге приводит к ложноотрицательным значениям.

На основании полученных результатов наиболее эффективной концентрацией конъюгата является 0,1 мкг/мл, которую в дальнейшем использовали для выявления антител свиней против вируса гепатита Е.

Многие ИФА тест-системы, предназначенные для мониторинга серологического статуса поголовья, имеют высокую чувствительность, что позволяет исследовать сыворотки пулом, т. е. объединять несколько проб в одну. В первую очередь на эту возможность влияет аффинность антител конъюгата: чем более аффинны антитела в конъюгате, тем меньшая концентрация их требуется для получения должного уровня оптической плотности, превышающего фоновый уровень. Такой подход позволяет сократить время и материальные ресурсы для скрининга большого количества образцов, при этом по своей чувствительности практически не уступает индивидуальному исследованию сывороток крови.

В связи с этим фактом нами была проверена возможность выявления антител свиньи в пуле с использованием конъюгата белка А стафилококка. Для этого применяли положительные сыворотки с разным содержанием антител и объединяли их с отрицательными (отбор и тестирование сывороток проводили с коммерческой тест-системой для выявления антител к вирусу гепатита Е). Использовали два варианта объединения; 1 положительная и 4 отрицательных; 1 положительная и 9 отрицательных. Обработку этих параметров проводили набором для выявления антител к гепатиту Е свиней.

Установлено, что объединение 5 сывороток крови не влияет на результат реакции, что свидетельствует о высокой аффинности конъюгата. При объединении 10 сывороток в одну пробу выявляются пробы, содержащие высокий и средний уровень антител, а также имеющие изначальный коэффициент связывания больше 26,5 %, который находится достаточно близко к пороговому значению.

Таким образом, в процессе исследований нами отработаны основные параметры конструирования тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней и параметры постановки ИФА.

Заключение

Проведенные исследования по разработке тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней показали, что в качестве антигена целесообразно использовать генно-инженерные полипептиды с антигенной последовательностью вируса гепатита Е генотипа 1, конъюгированные с бета-галактозидазой, полученные из ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова Российской академии медицинских наук», для сорбции полипептидов на полистироловые планшеты после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением для повышения

адгезивности для сорбции рекомбинантного антигена, в оптимальной концентрации полипептидов для сорбции на полистироловые планшеты – 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатном буфере pH 9,5, а разведением универсального конъюгата – белка А стафилококка с пероксидазой хрена для проявления тестируемых сывороток свиней является 0,1 мкг/мл.

Литература

1. Руководство по вирусологии / под ред. акад. Рос. акад. наук Д. К. Львова. – М. : Изд-во «Мед. информ. агентство», 2013 – 1200 с.
2. Expression and characterization of hepatitis E virus-like particles and non-virus-like particles from insect cells / Y. Qi [et al.] // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2015. – Vol. 63. – P. 362–370.
5. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea / I. S. Choi [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 3602–3608.
3. PAVIO, N. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks / N. PAVIO, X. J. MENG, C. RENOU // Vet. Res. – 2010. – Vol. 41. – P. 46.
4. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus / D. Yoo [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2001. – Vol. 8. – P. 1213–1219.

Поступила 10.07.2017 г.

УДК 571.27

И. А. Соболев, А. М. Шестопапов

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ БЫСТРОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

*Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины,
г. Новосибирск, Россия*

Быстрая и удобная диагностическая тест-система для индивидуального использования является актуальной практически для любых медицинских и ветеринарных вирусных инфекций. Наличие такой тест-системы позволит фермеру, частному предпринимателю, да и просто любому гражданину быстро провести предварительный анализ на то или иное заболевание у животных и человека.

Нами на примере наиболее распространенного вирусного заболевания человека – гриппа, разработан опытный образец такой тест-системы. Наличие такого прототипа тест-системы позволит, используя другие специфические компоненты, создать диагностический препарат на любую актуальную вирусную инфекцию.