

ДП «Научно-технический центр иммунобиотехнологии»
НТК „Институт монокристаллов” НАН Украины
Научно-производственная компания “Диапроф-Мед”

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
для работы с иммуноферментной тест-системой
для определения антител
против вируса лейкоза крупного рогатого скота
(„DIA-BLV-Ab”)

Киев - 2005

УДК 578.76:616.155.392

Практическое пособие для работы с иммуноферментной тест-системой для определения антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота "DIA-BLV-Ab".

Под редакцией профессора Спивала Н.Я.

Авторы: Ганова Л.А., Раевская Г.Е., Иванская Н.В., Резуненко Е.В.
Зоценко В.Н.

Для ветеринаров, врачей-лаборантов ветеринарного профиля, эпидемиологов, вирусологов, биологов, студентов высших учебных заведений и аспирантов.

Киев, "Диапроф-Мед", 2005

Сокращения, использованные в тексте пособия:

АГ - антиген;
 АТ - антитело;
 ВЭЛ КРС - вирус энзоотического лейкоза большого рогатого скота;
 ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения;
 КРС - крупный рогатый скот;
 ГЗ - предельное значение (оптической плотности);
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
 ЭЛ КРС - энзоотический лейкоз крупного рогатого скота;
 ИФА - иммуноферментный анализ;
 кДа - килодальтон;
 КДНК - комплементарная ДНК; ДНК с последовательностью, комплементарной к (вирионной) РНК;
 ЛПС - липополисахарид;
 МЭБ - Международное эпизоотическое бюро;
 МКА - моноклональные антитела;
 ММ - молекулярная масса;
 МЗ - Министерство здравоохранения;
 НИИ - научно-исследовательский институт;
 ОП - оптическая плотность;
 ОП_{сер} К⁻ – среднее значение оптической плотности для проб отрицательного контроля;
 ОП_{сер} Ig К⁺ и ОП_{сер} Ig К⁻ – средние значения оптической плотности для проб положительного контроля;
 ПЦР - полимеразная цепная реакция;
 о.о. - оптическая единица;
 РИДА - реакция иммунодиффузии в агаре;
 РИФ - реакция иммунофлюоресценции;
 РНИФ - реакция непрямой иммунофлюоресценции;
 РНК - рибонуклеиновая кислота;
 РПИФ - реакция прямой иммунофлюоресценции;
 РФК - реакция фиксации комплемента;
 ТИФА - твердофазный иммуноферментный анализ;
 ТМБ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 BLV (bovine enzootic leucosis virus) - вирус энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ВЭЛ КРС);
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) - Центры США по проблемам контроля и предупреждения заболеваний;
 CV - коэффициент вариации;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) - твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА);
 FDA (USA Food and Drug Administration) - Агентство (государственное управление) США по вопросам продовольствия и медикаментов;
 HTLV-1 and HTLV-2 (human T-lymphotropic virus 1, -2) - Т-лимфотропные вирусы человека 1 и 2.;
 IgA, IgM, IgG - иммуноглобулины классов А, М и G, соответственно;
 Office Internationale des Epizooties – Международное эпизоотическое бюро (МЕБ).

Удалено: ¶

Удалено: '

Введение

По данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ, Office Internationale des Epizooties, OIE), энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) принадлежит к важным и до сих пор окончательно не решенным проблемам сельского хозяйства и ветеринарии во многих странах мира, где развивается промышленное животноводство. В относительно благополучных хозяйствах Украины лейкозом поражено возле 30-36 % поголовья КРС (Павленко и др., 2002). То же самое можно сказать и о частоте распространения лейкоза КРС в других странах (Klasse & Sattentau, 2002). Недуг протекает как энзоотическое заболевание и охватывает в первую очередь коров с высокими надоями, иммунная система которых довольно ослаблена. Если болезнь проходит без ярко выраженных признаков, инфицированное молоко передается на молокозаводы. При пастеризации возбудитель в молоке обеззараживается, но в нем остаются определенные канцерогенные вещества (Klasse & Sattentau, 2002). Итак, потребление продукции от коров, пораженных вирусом энзоотического лейкоза КРС (ВЭЛ КРС), может иметь определенное нежелательное влияние на здоровье человека.

Лечение для больных лейкозом животных отсутствует. Особей, у которых при обследовании выявлено заражение вирусом лейкоза, отправляют на вынужденный убой. 5-10 % пораженных животных гибнут внезапно без проявлений болезни. Таким образом ЭЛ КРС причиняет хозяйствам определенный экономический ущерб, связанный с изъятием инфицированных животных из стада, и мешает усовершенствованию промышленного животноводства. Кроме того, дополнительные экономические потери от лейкоза КРС обусловлены также запретом продавать и экспортировать больных животных. Все эти обстоятельства свидетельствуют о необходимости своевременного выявления больных особей и обеспечения надлежащей диагностической работы на фермах.

Удалено: Ю

Этиология

Возбудитель лейкоза КРС - вирус лейкемии (лейкоза) КРС (ВЭЛ КРС - bovine leukemia virus, bovine leucosis virus, BLV) входит в подсемейство Oncovirinae рода Retroviridae и принадлежит к группе С опухолевых вирусов, патогенных для млекопитающих. Показано, что структурно и функционально ВЭЛ КРС родственен с известными Т-лимфотропными вирусами человека (HTLV-1 и HTLV-2) (Сергеев и Орлянкин, 1993; Сюрин и др., 1998; Renstrom, 2000). Установлено, что вирусы этой группы вызывают у чувствительных животных возникновение сарком и лейкозов. Лимфосаркомы у КРС могут быть вызваны также другими факторами, но единый до сих пор известный возбудитель энзоотического лейкоза этих животных - именно ВЭЛ КРС.

Зрелые вирионы лейкоза сферической формы, их диаметр составляет 73-120 нм (Сюрин и др., 1998; Renstrom, 2000). Вирусная частица состоит из капсида (core) в центре, промежуточного пласта и липидосодержащей внешней оболочки, на поверхности которой под электронным микроскопом видны характерные выступы длиной 8-11 нм. Они образованы гликозилированными белками gp51 и gp28 (gp30), ответственными за типоспецифичность вируса. Вообще же в частицах ВЭЛ выявлено шесть основных белков с молекулярными массами от 10 до 51 кДа. Четыре негликозилированных белка (p24, p15, p12 и p10) входят в сердцевину вириона, наибольшее количество сердцевинного белка приходится именно на долю антигена p24. Как у всех ретровирусов, сердцевина ВЭЛ содержит две тождественные молекулы одноцепочечной вирусной РНК (60-70S), связанных между собой в области 5'-концов. Эти РНК - носители вирусной генетической информации, которая реализуется при проникновении вируса в клетки-мишени при участии присутствующей в вирионах обратной транскриптазы.

Вне организма ВЭЛ довольно быстро инактивируется, хотя и может заражать чувствительных животных через недавно загрязненные корма (Lucas, 1996; Сюрин и др.,

1998; Renström, 2000). ВЭЛ не стойкий против температурных влияний (при температуре 56 °С он инактивируется уже через 15 мин.), легко теряет способность заражать клетки после замораживания и размораживания. В сыром молоке вирус сохраняется в течение 18 дней при комнатной температуре, в разбавленном (до 37,7 %) - уже лишь через 12 ч. Снижение кислотности молозива до значений РН 4,5 не обеззараживает возбудителя в течение 2 ч. Распространенные дезинфектанты довольно быстро приводят к инаktivации ВЭЛ (прямые солнечные лучи - через 4 ч., 0,5 % NaOH - через 30 мин., 2 % этанол - через 4 ч., 0,5 % формальдегид - через 8 ч., 0,5 % фенол - через 72 ч. (Бусол и др., 2004). Однако лимфоциты с провирусной ДНК сохраняют контагиозность в течение нескольких лет в жидком азоте.

Патогенез ВЭЛ КРС

Проникновение вируса в клетку происходит после нескольких постепенных этапов взаимодействия его с клеточными рецепторами. Сначала вирус узнает специфическую рецепторную структуру на поверхности клетки-мишени. После этого происходит слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, проникновение вируса в цитоплазму и „раздевание” его. Как это вообще типично для ретровирусов, в случае заражения ВЭЛ под действием обратной транскриптазы на матрице вирионной РНК происходит синтез вирусспецифичной комплементарной ДНК (кДНК), т.е. провирусной ДНК. Эта ДНК встраивается в геном клетки-хозяина, приводя к неопластичной трансформации этой клетки. Вместе с тем в некоторых клетках (прежде всего в клетках крови) вследствие размножения вируса происходит синтез вирионной РНК на матрице к ДНК, синтез вирусспецифичных белков и образование вирусных частиц. Вирионы выходят из клетки, отпочковываясь от клеточной оболочки.

Развитие лейкоза, вызванное ВЭЛ КРС, скорее всего обусловлено встраиванием провирусной ДНК в клеточный геном и последующей активацией соседнего клеточного гена (онкогена) под влиянием вирусного промотора, расположенного в области на правом конце интегрированной провирусной ДНК (Сюрин и др., 1998). Не исключена, кроме того, также возможность косвенной активации клеточных онкогенов, отдаленных от интегрированной провирусной ДНК (Renstrom, 2000).

Клинические признаки лейкоза у коров включают потерю аппетита, похудение, снижение надоев молока, набухание внешних и внутренних лимфатических узлов, частичный паралич задних конечностей, повышение температуры, нарушение дыхания, выпячивание глаз, разлады пищеварения - поносы или запоры (Нагаева и др., 2003).

В зараженном организме происходит также накопление трансформированных клеток, которые можно найти при гематологических обследованиях периферической крови (Нагаева и др., 2003). Может происходить активное размножение вируса и заражение новых клеток. Многие при этом зависят от иммунного ответа организма и от активности цитотоксичных Т-лимфоцитов. Развитие инфекции сопровождается нарастанием количества В-клеток в крови, которые выражают антиген CD5. В то же время усиленный синтез иммунодоминантного антигена gp51 происходит, главным образом, в клетках CD19.

Важно указать, что у КРС, инфицированного ВЭЛ, не обязательно развиваются проявления болезни (лейкоз и лимфосаркома). Это один из тех случаев, когда между заражением и развитием болезни нет прямой безоговорочной связи. Лишь у около 5 % зараженных животных, гибнущих от лимфосаркомы образуются опухоли. Клинические признаки этой болезни долго (в течение 1-8 лет, по другим данным - до 4-8 лет после заражения, или пожизненно) остаются незамеченными (Szczotka & Rulka, 2004; Szczotka et al., 2004). У большинства животных наблюдается латентная и персистентная болезнь с хроническим течением. При этом вирус часто присутствующий в зараженных лимфоцитах в неактивном состоянии защищен от влияния антител.

Эпидемиология ВЭЛ КРС

Как уже было указано, в естественных условиях ВЭЛ вызывает злокачественное заболевание кроветворной ткани КРС. ВЭЛ распространен на всех континентах. Многие исследователи считают, что естественная инфекция бывает лишь у КРС. По мнению некоторых авторов (Lucas, 1996; Renstrom, 2000), естественная инфекция лейкоза встречается также у овец, водных буйволов и южноамериканских водосвинок. По данным Сюрин и соавт. (1998), ВЭЛ в естественных условиях может поражать также шведских лосей и зебу. Экспериментальное заражение пытались вызвать у животных многих видов. У свиней и коней ВЭЛ не вызывает ни хронической, ни острой инфекции, тогда как у зараженных овец болезнь обычно развивается в хронической, а иногда и в острой форме. Есть данные, что лейкозный процесс у зараженных мышей проявляется в опухолевой форме и сопровождается развитием вторичного иммунодефицита (Бусол и др., 2004). По данным этих авторов, лабораторной моделью для изучения лейкоза КРС могут быть кроли, у которых антитела, появляясь через 28-35 дней после заражения ВЭЛ. Молекулярно-биологические исследования доказывают при этом, что ВЭЛ не размножается у этих животных в клетках нелимфоидного происхождения.

Старые животные более чувствительны к заражению, чем молодняк. Исследования показывают, что болезнь активнее распространяется летом. Предполагают участие в передаче инфекции насекомых-кровососов как механических переносчиков (Renstrom, 2000).

Кровь - наиболее распространенный источник лейкозной инфекции. Поэтому заражение на молочных фермах, т.е. в частично искусственных условиях, может передаваться через нестерильные иглы (при вакцинации и при проведении других ветеринарных манипуляций), через загрязненные инфицированной кровью инструменты, которыми пользуются ветеринары, чтобы облегчить отел коров, а также инструменты для срезания рогов, клеймение и татуирование скота (Ollis, 2004).

Важнейшее значение для распространения инфекции имеют зараженные животные без симптомов проявления болезни и клинически здоровые (в течение очень продолжительного времени или пожизненно) носители вируса. Выделяя вирус в окружающую среду, они оказывают содействие в его передаче здоровым животным прежде всего через зараженные корма. Распространение контактной инфекции КРС зависит от условий содержания: чем более тесные контакты между животными, тем быстрее передается болезнь другим особям. При горизонтальной передаче возбудитель обычно распространяется внутри популяции в результате контактов между животными разного возраста благодаря загрязнению вирусом окружающей среды (Бусол и др., 2004).

Кроме горизонтальной, установлено также вертикальная передача вирус лейкоза (Lucas, 1996; Сюрин и др., 1998; Renstrom, 2000; Нагаева и др., 2003; Бусол и др., 2004). Доказано его проникновение от зараженной беременной коровы к плоду. Как считают, ВЭЛ в ряде случаев способен преодолеть плацентарный барьер (Нагаева и др., 2003). Установлено, что в хозяйствах, где выявлен лейкоз КРС, инфицирована лишь некоторая часть телят (около 20 %), родившихся от зараженных коров. Поскольку вирус находят в молозиве и в молоке, разумеется, что эти секреты могут играть определенную роль в распространении ВЭЛ (Нагаева и др., 2003), передавая инфекцию телятам после рождения. Итак, вертикальная передача ВЭЛ оказывает значительное содействие его распространению в популяции КРС и усиливает возможности его сохранения в природе.

Таким образом, эпидемиологические исследования (Lucas, 1996; Renstrom, 2000; Нагаева и др., 2003) четко показывают, что источником инфекции в естественных условиях становятся больные животные на всех стадиях недуга. Вирус содержится в крови, молоке, разных секретах и экскрементах, особенно в таких случаях, когда там

присутствуют лейкоциты. Поэтому очень важно своевременно обнаруживать и изолировать инфицированных животных от здоровых коров и быков, которые заражаются, главным образом, энтеральным, парэнтеральным и внутриутробным путем. Существует также мысль о передаче ВЭЛ через сперму быков-вирусоносителей (Нагаева и др., 2003). Тем не менее Сюрин и др. (1998) утверждают, что непосредственно в бычьих сперматозоидах вируса не выявлено, а заражение от инфицированного бугая может происходить благодаря присутствию в его сперме лимфоцитов-носителей ВЭЛ. Вероятна и заразность других физиологических жидкостей организма, кроме крови, и передача ВЭЛ всегда обусловлена присутствием зараженных лимфоцитов.

В официальном документе Международного эпизоотического бюро (МЭБ, OIE) (Lucas, 1996) подытожено, что нет безоговорочных данных об опасности заражения человека при потреблении молока от коров, инфицированных ВЭЛ, и от особей с четко выраженным лейкозом. Одно время считали, что нет безоговорочных данных о передаче ВЭЛ КРС от животных к человеку и что для заражения человека ВЭЛ КРС не представляет опасности. Однако нельзя отвергать возможности того, что статистические данные о параллелизме частоты лейкозов у КРС и людей свидетельствуют не о передаче ВЭЛ человеку (например, через сырое молоко), а об одновременном влиянии определенных вредных лейкемогенных факторов. Считают, что факторы окружающей среды (грунта, климатические и радиационные), а также внутренние факторы организма могут содействовать или мешать размножению ВЭЛ при попадании в организм. В частности, при низком содержимом нужных питательных веществ в кормах чаще всего болеют лейкозом именно высокопроизводительные молочные коровы, в молочной железе которых активнее проходят физиологические процессы, а потому недостаточность питания ощущается острее; это обстоятельство содействует развитию уже начатого лейкоза (Уразаев, 1978).

Важность данной проблемы хорошо понимают хозяйственники, специалисты ветеринарной медицины и вирусологи. Поэтому в этом направлении постоянно проводятся ряд мероприятий как за границей (Lucas, 1996; Renstrom, 2000), так и в нашей стране (Нагаева и др., 2003). Действующая государственная отраслевая научно-техническая программа «Обеспечение ветеринарно-санитарного благополучия в Украине» (от 25 апреля 2002 г.) предусматривает безоговорочную необходимость «создать интегрированную систему защиты КРС от лейкоза» (раздел 03-103). Понятно, что одно из важнейших орудий в контроле ВЭЛ КРС и в борьбе с недугом является своевременная диагностика заболевания. Чем раньше выявлены инфицированные животные, тем выше вероятность оздоровления поголовья и искоренение болезни.

Диагностика ВЭЛ КРС

В наши дни в значительной степени потеряли свое значение клинический, патологоанатомический, гистологический и гематологический методы, которые достойно служили ветеринарной практике при открытии и становлении более поздних и современных методов - вирусологических, серологических и молекулярно-биологических. Особенно важную роль в оздоровлении поголовья КРС от ВЭЛ играют серологические методы, с помощью которых определяют антитела против вируса (Аноним, 1997; Сюрин и др., 1998; Горбатенко и др., 2004; Спивак и др., 2004). Важное значение имеют также подходы, направленные на прямое определение возбудителя.

Идентификация вируса

Согласно установкам МЭБ, при попытках культивировать ВЭЛ КРС с целью его идентификации вирусологическими методами используют моноклеарные клетки, полученные от зараженных животных. Эти клетки, выделенные из периферической крови КРС, выращивают в смеси с перевиваемыми клетками легкого бычьего зародыша (fetal

bovine lung cells, FBL), которые легко заражаются ВЭЛ, который выходит из инфицированных моноклеоров (Renstrom, 2000).

Иногда при отсутствии перевиваемых клеток FBL или из других соображений для идентификации ВЭЛ прибегают к заражению овец. В этом случае при положительном ответе в овечьих сыворотках через 6 месяцев обнаруживают антитела против вируса.

Еще один прямой метод идентификации ВЭЛ - выявление специфических нуклеотидных последовательностей в пробах от зараженных животных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР = polymerase chain reaction, PCR). Праймеры для проведения ПЦР должны содержать консервативные участки нуклеотидных последовательностей вирусных генов env (он кодирует gp51), gag и pol. Наиболее чувствительным считают метод двойной ПЦР (гнездовой ПЦР, nested PCR) со следующим электрофорезом и визуализацией полученных фрагментов. Высококочувствительный и сравнительно быстрый метод ПЦР требует соблюдения определенных условий работы и очень высокого уровня подготовки сотрудников специализированной лаборатории. Методы ПЦР представляют особую ценность для выявления животных на ранних стадиях инфекции, когда серологическими методами еще нельзя найти антител против вируса. ПЦР важен также в тех случаях, когда антитела у теленка нашли, но невозможно отличить материнские антитела, переданные через плаценту, от антител, приобретенных после инфицирования. ПЦР приносит пользу при подтверждении диагноза (например, при получении одиночных сомнительных данных и при подозрении на лейкоз у коров из благополучных хозяйств, а также при закупке и импорте элитных животных).

Для диагностики методом ПЦР достаточно наличия в пробе одной копии молекулы-мишени. ПЦР позволяет выявлять 5-10 молекул вирусного генома на 100000 клеток (Anonymous, 1999). Благодаря очень высокой чувствительности ПЦР загрязнение образцов может привести к ложно-положительным результатам реакции. Вместе с тем не исключено и получение ложно-отрицательных ответов из-за того, что в пробу могут не попасть именно зараженные клетки (их еще мало на ранних этапах инфекции), или из-за действия ингибиторов реакции (Lucas, 1996; Сюрин и др., 1998).

Серологические методы диагностики ВЭЛ КРС

Для ВЭЛ КРС присуща выраженная антигенная активность; он вызывает синтез антител, которые нейтрализуют вирус, осаждают (преципитируют) его и принимают участие в реакции фиксации комплемента (РФК). Выявлена общая антигенная детерминанта в главном сердцевинном белке ВЭЛ, вирусов лейкозо-саркоматозного комплекса птиц и вирусов типов С и D млекопитающих. Такое сходство свидетельствует о значительном консерватизме этого белка в ВЭЛ и других онкорнавирусов, не родственных близко с ВЭЛ. Кроме того, у ВЭЛ выявлена способность агглютинировать эритроциты мышей; она связана с оболочечным гликопротеином (gp51).

Животные, инфицированные ВЭЛ КРС, пожизненно сохраняют возбудителя в организме. Из-за хронической инфекции происходит постоянный синтез антител. Впервые антитела появляются через 3-16 недель после заражения. Антитела, полученные от матери, исчезают у молодых животных в возрасте 6-7 месяцев. При исследовании сывороток телят от зараженных коров нельзя установить, это антитела пассивно переданные, или синтезированные в организме молодого инфицированного животных. Антитела, переданные матерью, могут в отдельных случаях защитить теленка от заражения при столкновении его с вирусом или же (так бывает чаще) только удлинить инкубационный период заболевания. Случается, что у коров, истинно зараженных ВЭЛ, не удается выявить противовирусные антитела за 2-3 недели до отела и через 2-3 недели после него, так как материнские антитела переходят в молоко. Поэтому диагностику ВЭЛ в таких случаях можно проводить лишь с применением ПЦР. Серологическую же диагностику ВЭЛ на наличие антител в случае отрицательного результата не считают полноценной (Renstrom, 2000), особенно в том случае, когда для серологической

диагностики использована реакция иммунодиффузии в агаре (РИДА, agar gel immunodiffusion, AGID test). Понятно, что это особенно касается коров за 2-3 недели до отела и через 2-3 недели после него. Общеизвестно, что для РИДА характерна высокая специфичность, но очень низкая чувствительность.

В огромном большинстве случаев противовирусные антитела образуются против гликозилированного антигена вирусной оболочки gp51 (особенно против трех его иммунодоминантных эпитопов - F, G и H) и против внутреннего белка р24. Обратная транскриптаза ВЭЛ, кодируемая геном рol, принадлежит к слабым антигенам, и антитела против нее находят лишь у отдельных особей, зараженных вирусом в естественных условиях. Не выявлено взаимосвязи между концентрацией таких антител и уровнем сывороточных антител против структурных вирусных белков (Сюрин и др., 1998). В большинстве коммерческих тест-систем, предназначенных для выявления противовирусных антител, определяют именно антитела против gp51. Они синтезируются раньше, чем антитела против других вирусоспецифических антигенов, а потому почти постоянно присутствуют в организме зараженных животных. Другой диагностически важный антиген - р24.

Согласно международным стандартам, при обследовании КРС для выявления ВЭЛ (в частности, при проверке на лейкоз при международных торговых операциях) используют РИДА и иммуноферментный анализ (ИФА). При проведении исследований обоими указанными методами обязательно используют две контрольные стандартные сыворотки - Е1 и Е4. Сыворотка Е1 не содержит антител против р24 и применяется для стандартизации препаратов антигена gp51. Е4 - это стандартная сыворотка МЭБ для сравнения чувствительности разных тестов. Обе сыворотки проверены и одобрены контрольными лабораториями Европейского экономического союза (European Economic Community, ЕС, теперь European Union). Такие сыворотки продают странам-членам ЕС; их получают в Дании (National Veterinary Laboratory, P.O.Box 373, DK1503, Copenhagen, Denmark). Сыворотки, которые вырабатывают в странах-членах ЕС для определения антител против ВЭЛ, должны быть непременно стандартизированы с использованием сыворотки Е4.

РИДА - тест довольно простой для выполнения и высокоспецифичный, часто оказывается довольно чувствительным для широкого скринингового использования при исследовании сывороток отдельных животных, особенно при первичных обследованиях в проблемных хозяйствах. Однако этот тест совсем не годится для исследования проб молока из-за очень низкой чувствительности. В РИДА используют антигены, синтезированные в культуре клеток, которые частично контаминированы вирусом бычьей диареи, что часто приводит к ложно-положительному результату. Поэтому данный метод не пригоден для анализа слитых сывороток. Тест РИДА дает возможность выявить противовирусные антитела к ВЭЛ при разведениях сыворотки Е4 в 10 раз. Использование РИДА ограничено необходимостью применения агарозного геля, сложностью постановки теста и визуального учета результатов реакции.

Метод ИФА можно применять при исследовании слитого молока от нескольких коров, если на момент исследования на ферме доится не менее чем 30 % коров. Такое соотношение обусловлено практической возможностью проверить всех коров на ферме один раз в год. При таком применении метод ИФА годится для того, чтобы судить о состоянии с ЭЛ на ферме, но не для того, чтобы установить статус каждого животного.

Если отдельные сыворотки для проведения анализа сливают в одну пробу, то стандартная положительная сыворотка Е4 при этом должна оставаться положительной при разведении, которое в 10 раз превышает количество исследуемых сывороток в пуле. Например, если в одной пробе объединено 50 сывороток, то Е4 должна давать положительный результат при разведении в $10 \times 50 = 500$ раз.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA test = ТИФА) для выявления антител к ВЭЛ КРС теперь широко распространен благодаря доступности ряда

современных коммерческих диагностикумов на основе разнообразнейших модификаций: прямой, косвенный, блокировочный, конкурентный, с использованием конъюгатов на основе моно- и поликлональных антител против иммуноглобулинов КРС. Как правило, для работы с сыворотками КРС и с молоком используют разные тест-системы. Чувствительность тест-систем для определения антител зависит от очень многих причин, в частности, от того, какой будет конформация, пространственное размещение разных доменов молекул gp51, связанных с поверхностью планшета. Большое значение имеет то обстоятельство, какие именно эпитопы открыты для специфического связывания с антителами.

При изготовлении иммуносорбента для тест-систем ИФА используют естественные или рекомбинантные антигены ВЭЛ КРС.

При работе с естественными вирусоспецифическими и отрицательными (контрольными) антигенами их готовят на той самой линии перевиваемых клеток. В первом случае берут клетки, хронически зараженные ВЭЛ (клетки из почки зародыша овцы). Во втором случае берут те же культуры, не зараженные вирусом. Согласно требованиям МЭБ, клетки, используемые для этой цели, должны быть свободными от вируса бычьей диареи, а также других ретровирусов КРС, в частности, вируса иммунодефицита КРС и бычьего синцитиального вируса (см. Renstrom, 2000).

Коммерческие диагностические иммуноферментные тест-системы при конструировании иммуносорбента обычно используют рекомбинантные белки р24 (сердцевинный) и gp51 (оболочечный), являющиеся аналогами белков ВЭЛ. На основе данных белков в компании «Диапроф-Мед» разработана диагностическая иммуноферментная тест-система «DIA-BLV-Ab», предназначенную для выявления специфических антител к ВЭЛ.

Методика работы с иммуноферментной тест-системой «DIA-BLV-Ab»


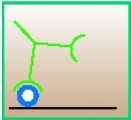
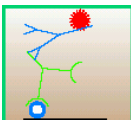
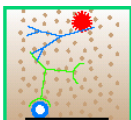
Иммуноферментная тест-система «DIA-BLV-Ab» создана по принципу непрямого ИФА и предназначена для выявления антител класса IgG против ВЭЛ КРС при анализе сывороток крови КРС.

Принцип анализа

Главные компоненты набора - иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент представляет собой полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными белками р24 и gp51 - аналогами специфических антигенов ВЭЛ КРС. Конъюгат представлен моноклональными антителами против иммуноглобулинов класса IgG КРС, мечеными пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток, ВЭЛ-специфичные антитела, присутствующие в сыворотке, связываются с антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело, которые обнаруживают с помощью специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки вносят раствор проявителя, содержащий субстрат пероксидазы (перекись водорода) и хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, прибавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 450 нм. Значение ОП пропорционально концентрации специфических антител в образцах сывороток крови.

Схема проведения ИФА

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> • Полистироловые стрипы, сенсibilизированы антигенами ВЕЛ 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки стрипов по 95 мкл раствора для разведения образцов и по 5 мкл образцов контролей и сывороток • Инкубация в течение 60 мин. при 37 °С (формирование комплекса антиген-антитело) • Промывание лунок буферным раствором 4 раза 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки по 100 мкл раствора конъюгата • Инкубация в течение 30 мин. при 37 °С (формирование комплекса с конъюгатом) • Промывание лунок буферным раствором 6 раз 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки по 100 мкл раствора перекиси водорода и ТМБ • Инкубация в течение 30 мин. при комнатной температуре (окраска) • Остановка реакции добавлением стоп-реагента • Регистрация оптической плотности 	

В состав тест-системы входят:

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора для промывания	3 фл. по 25 мл
2	Иммуносорбент	2 планшета
3	Раствор для разведения сывороток	1 фл. по 20 мл
4	Раствор для разведения конъюгата	1 фл. по 26 мл
5	Субстратный буфер	1 фл. по 14 мл
6	Раствор ТМБ	1 фл. по 14 мл
7	Концентрат конъюгата (50х)	1 амп. по 0,6 мл
8	Положительный контроль	1 амп. по 0,15 мл
9	Отрицательный контроль	1 амп. по 0,15 мл
10	Стоп-реагент	1 фл. по 25 мл
11	Клейкая пленка	6 шт.

Способ применения

Проведение анализа

1 Подготовка к анализу (из расчета на 16 лунок)

Выдерживают компоненты набора при температуре 18-30°C в течение 30 минут.

1.1 Приготовление раствора для промывания

Содержимое одного флакона с концентратом раствора для промывания интенсивно встряхивают. Отбирают 6 мл раствора и разводят в 180 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35-37°C до полного растворения кристаллов.

Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более чем 5 суток.

1.2 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отбирают 2 мл раствора для разведения конъюгата и прибавляют 40 мкл концентрата конъюгата (50X). Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская образование пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

1.3 Приготовление ТМБ субстрата

В чистый флакон отбирают 1,0 мл раствора ТМБ и прибавляют 1,0 мл субстратного буфера, смесь интенсивно встряхивают.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Раствор ТМБ необходимо беречь от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор ТМБ-субстрат должен быть бесцветным.

2 Проведение анализа

- Готовят раствор для промывания согласно п. 1.1.
- Освобождают от упаковки необходимое количество стрипов и вставляют их в рамку.

Стрипы, неиспользуемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8°C не более 1 месяца с момента вскрытия упаковки планшета.

Промывают лунки стрипов раствором для промывания (350 мкл раствора на лунку) с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки один раз, после чего избавляются от лишней влаги в лунках (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

В каждую лунку стрипов вносят по 95 мкл раствора для разведения сывороток.

Вносят в лунки по 5 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными первые 4 лунки (лунки для контролей).

- В две лунки (A1, B1) вносят по 5 мкл положительного контроля и в две лунки (C1, D1) – по 5 мкл отрицательного контроля. *При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь.*
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 минут.
- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок с помощью промывателя или 8 канальной пипетки и промывают лунки четыре раза раствором для промывания, после чего избавляются от лишней влаги в лунках (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2.
- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 минут.

- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок с помощью промывателя или 8-канальной пипетки и промывают лунки шесть раз раствором для промывания, после чего избавляются от лишней влаги в лунках (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор ТМБ с субстратом согласно п. 1.3
- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл ТМБ с субстратом.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 18-30 °С в темном месте в течение 30 мин.
- Останавливают цветную реакцию внесением в лунки по 100 мкл стоп-реагента.
- Через 1 минуту после остановки цветной реакции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм).

Оптическую плотность можно определять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку в анализе. При работе в одноволновом режиме снижается специфичность и точность анализа.

Учет результатов анализа

- Проведение анализа считают корректным, если оба значения оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контролем не выше 0,2 оптической единицы (ОО), а значение ОП каждого из двух положительных контролей не ниже 0,6 ОО.
- Рассчитывают среднее значение ОП для лунок отрицательного контроля (ОПср К-). Если одно из двух значений ОП отрицательного контроля больше 0,2 ОО, его отбрасывают, а дальнейший учет результатов проводят с использованием значения ОП отрицательного контроля, который не превышает 0,2 ОО.
- Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ рассчитывают, прибавляя поправочный коэффициент **0,20** к значению ОПср К (значение коэффициента может изменяться в зависимости от серии тест-системы).
- “Серая зона” - зона значений ОП, находящаяся в пределах от ГЗ до значений меньших ГЗ на 10 %.
- Результаты анализа считаются **отрицательными**, если значение ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП “серой зоны”.
- Результаты анализа считаются **положительными**, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ.
- Образцы со значениями ОП в пределах “серой зоны” считаются **неопределенными**.
- Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:
 - Образцы, положительные в одной или больше лунках, следует считать положительными;
 - Образцы, отрицательные в двух или больше лунках, следует считать отрицательными.

Форма выпуска наборов

- Набор с 2 монолитными планшетами, проявитель с ОФД – 2 монолитных планшета, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на проведение 2 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- Набор с 2 стриповыми планшетами, проявитель с ОФД – 2 стриповых планшета, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки);
- Набор с 2 монолитными планшетами, проявитель с ТМБ – 2 монолитных планшета, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 2 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок).
- Набор с 2 стриповыми планшетами, проявитель с ТМБ – 2 стриповых планшета, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 12 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Наборы рассчитаны на проведение 192 анализов (включая контроли).

- Набор с 1 стриповым планшетом, проявитель с ТМБ – 1 стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; система-тест-система рассчитана на 12 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок).

Набор рассчитан на проведение 96 анализов (включая контроли).

Срок годности

Срок годности набора - 1 год от даты изготовления.

Условия хранения и транспортирования

Набор хранят и транспортируют при температуре 2-8 °С.

Замораживать набор не разрешается.

Упаковка

- Иммуносорбент вложен в пакет из многослойной и комбинированной пленки, пакет термозапаян.
- Концентрат конъюгата, положительный контроль, отрицательный контроль разлиты в пластиковые ампулы объемом 0,5 мл или 2,0 мл.
- Растворы, кроме раствора ТМБ, разлиты в полиэтиленовые флаконы объемом 30 мл или 35 мл.
- Раствор ТМБ разлит во флаконы из полиэтилена коричневого цвета объемом 15 мл.
- Набор компонентов вместе с вкладышем помещены в коробку из гофрокартона с пластиковой вставкой.

Характеристика показателей качества системы-тест-системы «DIA-BLV-Ab»

Для оценки качества тест-системы «DIA-BLV-Ab» проводили сравнительные исследования ее чувствительности и специфичности с аналогичными показателями импортного аналога - тест-системой «Bovine Leukemia Virus AntibodyTest Kit», производства VMRD, Inc. (США). Исследование сывороток на обоих диагностикумах проводили соответственно инструкциям к наборам.

Постановку осуществляли на сыворотках КРС, взятых от животных в хозяйствах разных областей Украины (Киевской, Сумской, Донецкой, Запорожской) и предоставленных для работы Институтом ветеринарной медицины Украинской академии аграрных наук (Киев) и Институтом экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН (Харьков). Сыворотки были предварительно охарактеризованы с помощью РИДА.

Результаты ИФА представлены в таблице 1 как отношение оптической плотности к предельному значению (ОП/ГЗ), величина которого рассчитывалась согласно инструкции,

к тест-системе. При значении ОП/ГЗ, выше 1,0 результат анализа считался положительным, а при значении, меньше 1,0 - отрицательным. При проверке в ИФА с использованием диагностических тест-наборов все исследованные сыворотки крови, охарактеризованные в РИДА как положительные, дали положительный результат, а отрицательные в РИДА - отрицательный результат в ИФА. Согласно полученным данным, показатели информативности тест-системы «DIA-BLV-Ab» аналогичны показателям ее импортного аналога. Кроме того, качество тест-набора «DIA-BLV-Ab» дает возможность при тестировании исследуемых сывороток избегать предварительного их разведения перед анализом, необходимого при использовании тест-системы VMRD, Inc., когда исследуемые образцы перед тестированием разводятся буфером (1:50).

Поскольку в клинической лабораторной практике при серологической диагностике ВЭЛ КРС широко используют РИДА, было проведено сравнительное изучение результатов, полученных при тестировании 89 сывороток крови КРС на тест-системе «DIA-BLV-Ab» и с помощью РИДА. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 1. Результаты сравнения разных тест-систем
для определения антител против ВЭЛ
при исследовании сывороток крови КРС

Сыворотки	Тест		
	РИДА	ИФА, ОП/ГЗ	
		Test Kit, VMRD, Inc., США	«DIA-BLV-Ab»
4	+	6,3	3,8
5	+	5,9	3,4
6	+	5,2	4,2
7	+	4,9	3,3
8	+	3,5	2,6
9	+	3,9	2,6
10	+	3,9	1,3
12	+	6,4	3,2
13	+	4,2	3,1
14	+	4,3	2,5
17	+	6,4	4,1
24	+	4,5	2,1
29	+	5,2	2,4
60	+	4,7	2,9
61	+	4,2	2,1
62	+	2,8	1,5
63	+	2,7	1,9
25	-	0,1	0,1
27	-	0,4	0,2
31	-	0,6	0,8
34	-	0,4	0,3
42	-	0,4	0,1
46	-	0,5	0,4
47	-	0,7	0,3
48	-	0,4	0,3
49	-	0,8	0,7
50	-	0,4	0,4
51	-	0,3	0,5
53	-	0,3	0,4
54	-	0,4	0,4
55	-	0,7	0,4
56	-	0,3	0,4
721	-	0,2	0,1
722	-	0,7	0,5
723	-	0,3	0,2
724	-	0,3	0,3
725	-	0,5	0,3
726	-	0,5	0,3

Таблица 2. Оценка показателей информативности тест-системы «DIA-BLV-Ab» в сравнении с РИДА

Сыворотки КРС с диагнозом:	Количество образцов	Положительные данные	
		РИДА	«DIA-BLV-Ab»
ЭЛ	43	43	41
трихинеллез	1	0	0
инфекционный ринотрахеит	1	0	0
ротавирусная диарея	1	0	0
диарея другого происхождения	2	0	0

Из 43 образцов сывороток, положительных в РИДА, с помощью тест-системы «DIA-BLV-Ab» антитела класса IgG к ВЕЛ были выявлены во всех пробах, а из 41 образца, отрицательного в РИДА, с помощью ИФА на тест-системе «DIA-BLV-Ab» в 2 образцах выявлено антитела к ВЕЛ. В 5 сыворотках, содержащих антитела, которые могут давать ложно-положительные результаты при серодиагностике лейкоза (это антитела против возбудителей трихинеллеза, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи), при анализе на тест-системе «DIA-BLV-Ab» антител против ВЭЛ КРС не выявлено. Из полученных результатов видно, что в сравнении с РИДА чувствительность и специфичность тест-системы «DIA-BLV-Ab» составляет, соответственно, 95,3% и 95,1%. Однако необходимо подчеркнуть, что учет результатов РИДА проводится визуально и может дать погрешность при недостаточной профессиональной подготовке исследователя. При проведении ИФА результаты реакции фиксируются в автоматическом режиме, который предотвращает от ошибок. Поскольку тест-система «DIA-BLV-Ab» выявляет в исследуемом материале антитела к р24 и к gp51 ВЭЛ КРС, то она дает возможность обнаруживать не только более ранние специфические антитела к ВЭЛ, но и субклассы IgG, не определяемые в РИДА.

Оценку показателей информативности тест-системы «DIA-BLV-Ab» также проводили на ВЭЛ-положительных и ВЭЛ-негативных сыворотках, входящих в состав стандартных панелей производства Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов Министерства аграрной политики Украины (г. Киев) и на стандартной положительной сыворотке E4 производства Национальной ветеринарной лаборатории Дании (National Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark). Результаты тестирования образцов в РИДА и ПЦР представлены в таблице 3 (по паспортным данным для панелей сывороток).

Таблица 3. Результаты оценки качества тест-системы «DIA-BLV-Ab» на стандартных панельных сыворотках Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов и международному стандартному положительному образцу E4

Сыворотки	Всего образцов	Количество положительных результатов реакции		
		РИДА	ПЦР	ИФА «DIA-BLV-Ab»
положительные к ВЭЛ КРС	33	33	33	33
отрицательные к ВЭЛ КРС	29	0	0	0
стандартная положительная E4	1	1	1	1

При исследовании данных образцов на тест-системе «DIA-BLV-Ab» сыворотки, содержащие антитела к ВЭЛ КРС, диагностировались как положительные, а образцы, не содержащие специфических антител, - как отрицательные.

Таким образом, диагностическая тест-система «DIA-BLV-Ab», предназначенная для выявления антител класса IgG к ВЭЛ КРС, по своим показателям информативности близка к своему импортному аналогу производства VMRD, Inc. (США), широко применяемого в мире для диагностики лейкоза. Характеристики качества тест-системы «DIA-BLV-Ab» дают возможность использовать ее при скрининговых исследованиях присутствия у КРС антител против ВЭЛ. Простота постановки реакции, скорость проведения анализа, автоматический учет полученных результатов составляют преимущество данного теста по сравнению с РИДА при серодиагностике ВЭЛ КРС.

Литература

- . Анонім. План основних заходів щодо оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу в Україні на 1996-2000 р.р./ Ветеринарна медицина України, 1997, № 1, с.36-42.
- Бусол В.О., Постой В.П., Бондаренко Д.І., Козаченко О.І. Закономірності епізоотичного процесу при лейкозі великої рогатої худоби. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с. 155-160.
- Горбатенко С.К., Семенченко О.Ю., Цимбал В.І., М'ягих Н.В., Зданевич П.П., Корнейков О.М. Розробка алергену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с.255-258.
- Нагаєва Л.І., Аранчій С.В., Синицин В.А., Стародуб М.Ф., Добросол Г.І., Нагаєва Г.Г. Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби. – Бібліотека ветеринарної медицини. – К.: 2003. – №№ 9-12. – 64 с.
3. Павленко С., Говдин А.К., Миролюбова А., Изучение возможности выявления носительства ВЛКРС у телят 6-месячного возраста. Международный сельскохозяйственный журнал, № 4, 2002, с.53-58.
- Сергеев В.А., Орлянкин Б.Г. Структура и биология вирусов животных. М., "Колос", 1983, 336 с. (с.311-313).
8. Спивак Н.Я., Ганова Л.А., Стегний Т.Б., Киприч В.В., Синицын В.А. Иммуноферментная система для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с. 641-646.
4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Лейкоз крупного рогатого скота. – В кн.: «Вирусные болезни животных». – М.: ВНИТИБП. – 1998. – с. 383- 406.
11. Уразаев Н.А. Биогеноз и болезни животных. – М.: «Колос». – 1978. – 208 с.
5. Anonymous. The modifications of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding tuberculosis, brucellosis and enzootic bovine leucosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Sanco/B3/R10/1999; European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General/ Directorate B – Scientific Health Opinions/ Unit B3 – Management of scientific committees II.
6. Klasse P.J. and Sattentau Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses, Journal of General Virology, V.83, 2002, p.2091-2108.
7. Lucas M.H.. Enzootic bovine leukosis. In the: "OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines". France, Paris. – 1996. – p.p.276-280.
- Ollis G.W. Enzootic bovine leucosis. – <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/600/63-07.html> – 22.09.2000.
8. Renström L. Enzootic bovine leukosis. In the: "OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines". France, Paris. – 2000 – p.p.371-380.
10. Szczotka M., Rulka J. Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus infected cattle. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с.123-126.
11. Szczotka M., Kawaiak M., Winnicka A., Rulka J. Determination of lymphocyte subsets, PCNA activity and BCL-2 in experimental infection with bovine leukemia virus (BLV). – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с.126-129

Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия:	3
Введение	4
Этиология	4
Патогенез ВЭЛ КРС	5
Эпидемиология ВЭЛ КРС	6
Диагностика ВЭЛ КРС	7
Методика работы с иммуноферментной тест-системой «DIA-BLV-Ab»	10
Характеристика показателей качества системы-тест-системы «DIA-BLV-Ab»	14
Литература	19