ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
ПО ПРОДОВОЛЬСТВИЮ И ЗАКУПКАМ

МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ им. К. И. СКРЯБИНА

На правах рукописи

ТРИФОНОВ Валерий Дмитриевич

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД И РЕАКЦИЯ ЛАТЕКСАГГЛЮТИНАЦИИ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ АДЕНО- И ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.

03.00.06 - вирусология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Библиотека
Сам[illegible]
ВНИИЗЖ

Москва 1990

3. Разработать метод обнаружения антител к АдКРС и вИРТ на основе реакции латексагглютинации (РЛА) с использованием окрашенных полиакролеиновых латексов и провести сравнение РЛА с ИФА, реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакцией нейтрализации (РН).

4. Разработать основы технологии производства РЛА-диагностикума для обнаружения антител к вИРТ.

Научная новизна работы: Разработан и применен метод выделения и очистки гексона АдКРС3 на основе гидрофобной и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий получать очищенный гексон АдКРС3 в препаративных количествах.

Разработан гистохимический иммуноферментный метод обнаружения антигенов АдКРС и вИРТ в инфицированных клетках. Проведена оптимизация техники постановки анализа и интерпретации результатов.

Разработан способ получения латексных частиц, сенсибилизированных антигенами АдКРС и вИРТ. Разработан метод обнаружения антител к АдКРС и вИРТ в сыворотках крови животных на основе реакции латексагглютинации.

Практическая ценность работы: ГИФМ может быть использован для экспресс-диагностики и ускоренной диагностики АдКРС и вИРТ.

Метод обнаружения антител к АдКРС и вИРТ на основе реакции латексагглютинации рекомендован Главным управлением ветеринарии Государственной комиссии по продовольствию и закупкам СМ СССР к практическому использованию в ветеринарной практике. Разработана технология изготовления РЛА-диагностикума и подготовлена нормативно-техническая документация на его изготовление. Материалы исследований внедрены в учебный процесс и на их основе проводятся практические занятия на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов Московской ветеринарной академии.

На защиту выносятся: разработка метода выделения и очистки гексона АдКРС3; разработка гистохимического иммуноферментного метода обнаружения антигенов АдКРС и вИРТ в инфицированных клетках и сравнение его с существующими в настоящее время; разработка метода обнаружения антител к АдКРС и вИРТ на основе реакции латексагглютинации и сравнение его с используемыми в настоящее время; разработка основ технологии производства набора для серологической диагностики вИРТ на основе РЛА и проведение комиссионных испытаний метода.

Апробация работы: Основные положения диссертации изложены на конференциях молодых ученых МВА в 1987, 1988 и 1989 г., на отчетных научных конференциях МВА в 1987 и 1989 г., на конференции молодых ученых социалистических стран в г. Братислава (ЧССР) в 1988 г., на Всесоюзном семинаре руководителей вирусологических отделов областных и республиканских ветеринарных лабораторий (г. Косино Моск. обл.) в 1989 г. и в 1990 г.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 5 статей, имеется положительное решение на выдачу авторского свидетельство.

Объем и структура диссертации: Диссертация изложена на 118 страницах, включая введение, обзор литературы, материалы и методы собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы и приложения. Список использованной литературы включает 104 источника. Работа содержит 16 таблиц и 8 рисунков.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектом исследований были культуры клеток МДВК, HeLa и ТБ, инфицированные АдКРС и вИРТ и культуральные жидкости инфицированных клеток, клетки носоглоточных смывов экспериментально зараженных АдКРС и вИРТ телят, гипериммунные антисыворотки против АдКРС и вИРТ, сыворотки крови экспериментально зараженных телят и полевые сыворотки крови КРС.

В работе были использованы методы аффинной и гидрофобной хроматографии, гель-фильтрации, высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле, иммуноэлектрофореза. Обнаружение вирусных антигенов проводили с использованием гистохимического иммуноферментного метода, реакции иммунофлуоресценции, твердофазного ИФА и иммуноэлектрофореза. Обнаружение антител к исследуемым вирусным антигенам проводили с использованием реакции латекс-агглютинации, реакции непрямой гемагглютинации, твердофазного ИФА, реакции преципитации в геле и реакции нейтрализации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Выделение и очистка гексона АдКРС3.

В литературе имеются указания на перспективность использования гексона аденовирусов в качестве антигена в иммунодиагностике аденовирусных инфекций.

Ранее сотрудниками лаборатории генной инженерии МВА было показано, что гексон АдКРС3 может быть выделен из экстрактов инфицированных клеток или из культуральной жидкости инфицированных клеток методами гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе (ГХФС) и ионообменной хроматографии. В наших исследованиях была использована ГХФС, однако доочистку препарата гексона проводили методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (эВЭЖХ). Содержание гексона в получаемых препаратах определяли методами ИФА и иммуноэлектрофореза.

Количественные характеристики использованного метода выделения гексона АдКРС3 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Количественные характеристики метода выделения гексона АдКРС3.

Препарат*	Кол-во белка(мг)	Гексон (мг)	Очистка (раз)	Процент выхода
1	7840	20,5	1	100
2	20,4	17,8	333	87
3	17,0	17,0	363	78

* 1 - исходная культуральная жидкость
2 - концентрат фракций после ГХФС
3 - препарат гексона после эВЭЖХ

По своим характеристикам использованный метод выделения гексона АдКРС3 не уступал описанным ранее и позволял получать прак-

гически чистый препарат гексона АдКРС с высоким выходом.

Получение гипериммунных антисывороток против гексона АдКРС3, вирионов АдКРС3 и вИРТ.

Выделенный гексон АдКРС3 использовали для иммунизации кроликов и получения гипериммунных антисывороток по разработанной в лаборатории схеме иммунизации. Титр антител, определенный в РПГ составлял 1: 64 - 1:128.

Антисыворотки против вирионов АдКРС3 и вИРТ имели титр антител против вирионов АдКРС3 в РПГ 1:32-1:64, в реакции нейтрализации - 1:320-1:640, а в ИФА 1:100 000 - 1:200 000. Титр антител против вирионов вИРТ составлял в РПГ 1:4-1:8, в ИФА 1:25000-1:50000. Титр полученных антисывороток в РН составлял 1:80-1:160.

ИФА для определения антигенов АдКРС3 и вИРТ.

Для обнаружения антигенов АдКРС3 были разработаны две схемы ИФА - конкурентный и "сэндвич". При использовании в качестве стандарта очищенного гексона АдКРС3 чувствительность конкурентного ИФА составляла 25 нг/мл, а "сэндвич"-метода - 5 нг/мл.

Разработанный ИФА для обнаружения антигенов вИРТ в варианте "сэндвич" имел чувствительность 0,05-0,1 мкг/мл при использовании в качестве антигена очищенных вирионов вИРТ. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными о низкой чувствительности "сэндвич"-метода при обнаружении вИРТ.

Чувствительность ИФА для обнаружения АдКРС3 в пересчете на инфекционность вируса в образцах составила 10^{8} ТЦД50/мл, что позволило обнаруживать АдКРС3 практически во всех образцах лизатов инфицированных клеток и культуральной жидкости в ходе опыта. Чувствительность ИФА для обнаружения вИРТ составила 10^{5} - $10^{5,5}$ ТЦД50 /мл, и оказалась недостаточной для исследования всех образцов, поскольку такие значения титров инфекционности наблюдаются на поздних стадиях инфекции, при проявлении цитопатического действия на (++) - (+++).

гИФМ для обнаружения в инфицированных клетках антигенов АдКРС вИРТ.

Исследования по разработке гИФМ были направлены на создание метода, который можно было бы применять при массовых обследованиях с использованием более доступной, чем авидин-биотиновая , систем детекции.

Учет результатов реакции осуществляли с помощью светового микроскопа, считая специфически окрашенные клетки из общего количества 400 -500. Положительная реакция проявлялась в виде красно-бурого цитоплазматического и (или) внутриядерного окрашивания на общем светлом фоне. В качестве контроля использовали препараты неинфицированных клеток, а также нормальную сыворотку кролика в тех же разведениях, что и иммунные сыворотки.

В клетках носовых смывов положительными считали пробы, в которых в поле зрения микроскопа обнаруживали 10 и более окрашенных клеток.

Разработку гИФМ проводили в нескольких модельных система:

1) МОВК - АдКРС1; 2) МОВК -АдКРС3; 3) МОВК -вИРТ;

4) ТБ - АдКРС7; 5) ТБ - вИРТ; 6) HeLa - Ad5;

Динамику роста числа специфически окрашенных в гИФМ клеток МОВК в инфицированной АдКРС3 культуре изучали при низкой (2-5 ТЦД50/ 10^4 кл) и высокой (5-10 ТЦД50/кл) множественностях заражения. Одновременно изучали: динамику роста числа специфически светящихся клеток в РИФ, динамику накопления гексона АдКРС3 в лизатах инфицированных клеток и культуральной жидкости методом ИФА, динамику накопления аденовирусной ДНК методом тМГ, проявление цитопатического действия вирусов.

Были поставлены опыты по сравнению сроков обнаружения окрашенных клеток в гИФМ со сроками проявления ЦПД в инфицированных клетках вирусов.

Исследовали, кроме гомологичной системы МОВК-АдКРС3 две гетерологичные: HeLa - Ad5 и ТБ - АдКРС7.

Динамику роста числа клеток МОВК, инфицированных вИРТ и выявляемых в гИФМ сравнивали с динамикой проявления ЦПД вИРТ при высокой и низкой множественностях заражения. Одновременно проводили сравнение с результатами метода тМГ для выявления ДНК вИРТ в

инфицированных клетках.

В результате этих опытов было показано, что гИФМ позволял обнаруживать инфицированные клетки на более ранних сроках после заражения, чем РИФ, значительно раньше (на 12 -40 часов) проявления ЦПД. В условиях высокой множественности заражения сроки обнаружения вирусной ДНК методом тМГ незначительно опережали сроки обнаружения вирусных антигенов в гИФМ, тогда как в условиях низкой множественности заражения различие сроков обнаружения составляло 40 часов в пользу тМГ.

Были проведены лабораторные испытания гИФМ обнаружения вИРТ и АдКРС в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных телят.

Результаты обнаружения АдКРС в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных приведены в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что гИФМ позволяет обнаруживать антигены АдКРС в гомологичной и гетерологичной системах в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных. Эффективность обнаружения АдКРС использованными методами по сравнению с вирусовыделением составила: тМГ - 96%, гИФМ - 84% и РИФ - 60%.

При обнаружении антигенов АдКРС в клетках 52 носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных совпадаемость результатов определений составила 96%.

В таблице 3 представлены результаты опыта по обнаружению антигенов вИРТ в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных в сравнении с результатами метода тМГ и вирусовыделения.

Из таблицы 3 следует, что гИФМ позволяет обнаруживать вИРТ в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных. Эффективность обнаружения вИРТ гИФМ составила 88%, а методом тМГ - 100% по сравнению с методом вирусовыделения на культуре клеток.

Таким образом, гИФМ позволяет обнаруживать вирусные антигены в инфицированных клетках как в случае моноинфекции, так и при смешанной инфекции, отличается высокой чувствительностью, специфичностью, простотой постановки анализа и интерпретации его результатов и может быть использован в качестве метода экспресс-диагностики аденовирусных и ИРТ-инфекций крупного рогатого скота.

Таблица 2.

Сопоставление методов обнаружения АдКРС в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных.

No.	Вирусы, которыми проводили заражение	Методы	Дни после заражения						
			0 (до зар.)	3	4	5	6	7	8
1.	АдКРС7	тМГ	-	+	-	+	+	+	+
		гИФМ	-	+	+	+	+	+	+
		РИФ	-	-	-	-	-	-	-
2.	АдКРС3 + КРТ	тМГ	-	+	+	+	+	+	-
		гИФМ	-	+	+	+	-	-	+
		РИФ	-	+	+	н.о.*	+	+	+
3.	АдКРС3 + АдКРС7	тМГ	-	+	+	+	+	+	+
		гИФМ	-	-	+	+	н.о.	+	+
		РИФ	-	-	-	+	+	+	-
4.	контроль	тМГ	-	-	-	-	-	-	-
		гИФМ	-	-	-	-	-	-	-
		РИФ	-	-	-	-	-	-	-

* н.о. – не определяли.

Таблица 3.

Сопоставление методов обнаружения вИРТ в клетках носоглоточных смывов экспериментально зараженных животных.

No.	Методы	Дни после заражения: 0 (до зар.)	3	5	7	10
зараженные						
73	ГИФМ	н.о.	+	+	+	+
	ТМГ	н.о.	+	+	+	+
74	ГИФМ	-	+	-	+	+
	ТМГ	-	+	+	+	+
78	ГИФМ	-	+	н.о.	+	+
	ТМГ	-	+	+	+	+
80	ГИФМ	-	+	+	+	+
	ТМГ	-	+	+	+	+
81	ГИФМ	-	+	+	+	+
	ТМГ	-	+	+	+	+
контроль						
82	ГИФМ	-	-	-	-	-
	ТМГ	-	-	-	-	-
83	ГИФМ	-	-	н.о.	-	-
	ТМГ	-	-	-	-	-

* н.о. - не определяли.

РЛА для серодиагностики заболеваний вызываемых АдКРС и вИРТ.

В качестве исследуемых антигенов были использованы: культуральные жидкости клеток МДБК, инфицированных АдКРС3, АдКРС7 и вИРТ (К.Ж.АдКРС3, К.Ж.АдКРС7, К.Ж.вИРТ); очищенные вирионы АдКРС3 и вИР (в.АдКРС3 и в.вИРТ); гексон АдКРС3 (гек.АдКРС3); лизат клеток МДБК, инфицированных вИРТ (Л.К.вИРТ);

Контроль активности антигенов осуществляли в ИФА.

Были получены стабильные по физико-химическим свойствам и обладавшие иммунохимической активностью конъюгатов ПАЛ-К.Ж.АдКРС3 (I), ПАЛ-К.Ж.АдКРС7 (II), ПАЛ-К.Ж.вИРТ (III), ПАЛ-гек.АдКРС3 (IV), ПАЛ-Л.К.вИРТ (V), которые в дальнейшем будут обозначаться римскими цифрами, указанными в скобках.

На первом этапе исследований были изучены параметры РЛА в сравнении с параметрами ИФА в модельной системе. Для этого были использованы конъюгаты IV и V.

Было проведено сравнение РЛА и РНГА при обнаружении антител к АдКРС и вИРТ. Для этой цели использовали конъюгаты I, II, III и V и ТНГА-диагностикумы для серодиагностики АдКРС и вИРТ.

В итоге исследований параметров РЛА в модельных системах было установлено, что при обнаружении антител к АдКРС чувствительность РЛА превосходит чувствительность ИФА в 10-100 раз, а при обнаружении антител к вИРТ чувствительность РЛА сопоставима с чувствительностью ИФА и в 10-50 раз превосходит по чувствительности РНГА. Специфичность наблюдаемых взаимодействий была подтверждена в опытах по ингибированию взаимодействий в РЛА, ИФА и РНГА.

В таблице 4 представлены результаты обнаружения серопозитивных животных методами РЛА, РНГА, ИФА и РН в ходе одного из опытов по экспериментальному заражению телят АдКРС 1 и 2 серологических групп и вИРТ. Сравнение результатов серологических исследований 40 проб сывороток, взятых от экспериментально зараженных животных показало что между значениями титров сывороток, определенными в РЛА, РН, ИФА, РНГА наблюдается прямая корреляция. Коэффициенты корреляции для значений титров сывороток оказались равными: РЛА / ИФА - 0,99; РЛА / РНГА - 0,96; РЛА / РН - 0,85.

Таблица 1.

Количество сероположительных животных, определяемых методами РЛА, РНГА, ИФА и РН по дням в условиях экспериментального заражения. *

Вирус	Методы	Дни после заражения				
		5	10	15	20	25
АдКРС	РЛА	3	9	9	10	10
	ИФА	1	7	10	10	10
	РНГА	3	9	10	10	10
	РН	-	8	-	11	11
вИРТ	РЛА	3	7	7	7	6
	ИФА	1	5	7	6	6
	РНГА	1	5	6	5	6
	РН	-	4	-	6	6

* Примечание: АдКРС было заражено 12 (6+6), а вИРТ - 9 животных.
(-) - исследования не проводили;

На основании результатов лабораторных исследований были определены условия и разработана методика проведения анализа, разработаны технические условия производства РЛА-диагностикума на вИРТ. Метод серодиагностики вИРТ с использованием реакции латекс-агглютинации был представлен на межведомственные комиссионные испытания по программе, утвержденной ГУВ Госагропрома СССР. Результаты межведомственных комиссионных испытаний РЛА-диагностикума приведены в таблице 6.

Метод серологической диагностики вИРТ в РЛА успешно прошел межведомственную комиссионную проверку . Было рекомендовано провести широкие производственные испытания диагностикума.

Таким образом, РЛА является специфичным, чувствительным, быстрым методом обнаружения антител к АдКРС и вИРТ проста в постановке и может быть использована как в лабораториях, так и непосредственно в полевых условиях.

Технология изготовления компонентов диагностикума.

В итоге проведенных исследований была разработана технология получения РЛА-диагностикума для обнаружения антител к вИРТ.

Процесс изготовления РЛА-диагностикума включает в себя следующие стадии:

- приготовление антигена на основе лизата клеток, инфицированных вИРТ и контроль его активности в ИФА или ДОТ-ИФА;
- приготовление конъюгата латекса с полученным антигеном;
- получение отрицательной сыворотки и гипериммунной сыворотки против вИРТ и их контроль в ИФА и РН;
- приготовление рабочих растворов;
- расфасовка и лиофилизация препаратов конъюгата и сывороток с последующей проверкой их активности в РЛА;
- компоновка наборов;

Отличительной чертой данной технологии является то, что в процессе производства используются реактивы и препараты, производство которых налажено в СССР.

Латексные конъюгаты могут быть лиофилизированы без потери активности. Сохранность конъюгатов в суспензии более 2-х лет, а в лиофилизованном состоянии - более года без потери активности.

На основании результатов всех проведенных исследований была предложена схема компоновки набора для серологической

Таблица 5.

Обнаружение антител к вИРТ в сыворотке крови экспериментально зараженных животных в РЛА в сравнении с РНГА, ИФА и РН по итогам межведомственной комиссионной проверки. *

№№ телят	Значения титров антител к вИРТ в сыворотках крови							
	до заражения				18 сутки после заражения			
	РН	РНГА	РЛА	ИФА	РН	РНГА	РЛА	ИФА
73	0	1:128	1:160	1:200	1:4	1:256	1:160	1:400
74	0	1:256	1:160	1:200	0	1:256	1:320	1:200
76	0	1:32	1:40	0	1:4	1:256	1:640	1:400
78	1:2	1:64	1:20	0	1:8	1:128	1:80	1:200
80	0	1:16	1:40	0	1:2	1:128	1:640	0
82	0	1:32	1:40	0	0	1:16	1:20	0
83	0	1:64	1:20	0	0	1:32	1:20	0
84	0	1:16	1:40	0	0	1:16	1:40	0

* Животные No. 73, 74, 76, 78, 80 - опыт,
No. 82, 83, 84 - контроль.

диагностики вИРТ в реакции латексагглютинации. В состав набора входят:

- конъюгат латекса со специфическим антигеном - 1 флакон;
- 10-ти кратный концентрат рабочего буфера - 1 флакон;
- бычий сывороточный альбумин - 1 ампула;
- специфическая положительная сыворотка - 1 ампула:
- контрольная отрицательная сыворотка - 1 ампула;

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что гИФМ и РЛА могут быть использованы для иммунодиагностики заболеваний, вызываемых АдКРС и вИРТ. Разработанные методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, простотой постановки и интерпретации результатов. Проведение исследований этими методами не требует высокой квалификации персонала.

Важной особенностью гИФМ и РЛА является возможность их использования в одном пакете для ранней диагностики АдКРС и вИРТ-инфекций. Как следует из результатов работы, вирусные антигены могут быть обнаружены в гИФМ на 3 день после начала заболевания, а антитела к ним в РЛА на 5-10 дни.

Таким образом, гИФМ и РЛА являются перспективными для практического применения методами иммунодиагностики адено- и герпесвирусных инфекций крупного рогатого скота и расширяют арсенал методов иммунодиагностики вирусных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика очистки гексона АдКРС3 из культуральной жидкости инфицированных клеток с последовательным использованием гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод позволяет получать гексон АдКРС3 высокой чистоты с выходом 78% от исходного содержания гексона в культуральной жидкости.

2. Разработан гистохимический иммуноферментный метод (ГИФМ) обнаружения антигенов АдКРС и вИРТ, позволяющий обнаруживать антигены АдКРС и антигены вИРТ в инфицированных клетках. Проведено сравнение ГИФМ с другими методами обнаружения вирусов в инфицированных клетках: реакцией иммунофлуоресценции (РИФ), твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) и методом точечной молекулярной гибридизации. Установлено, что ГИФМ является более чувствительным методом обнаружения вирусных антигенов, чем РИФ и ИФА и не требует для постановки специального оборудования. Метод апробирован на полевом материале, показана возможность использования ГИФМ для иммунодиагностики АдКРС и вИРТ.

3. Разработан метод серологической диагностики АдКРС и вИРТ на основе реакции латексагглютинации (РЛА). Проведено сравнение РЛА с применяемыми в настоящее время методами серологической диагностики АдКРС и вИРТ на основе ИФА и РИГА. Показаны преимущества РЛА, заключающиеся в более высокой чувствительности и специфичности, простоте постановки и интерпретации результатов. Метод успешно прошел межведомственные комиссионные испытания и рекомендован для серологической диагностики ИРТ.

4. Разработана технология получения РЛА-диагностикума и выпущена опытная партия "Набора для серологической диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в реакции латексагглютинации". Главным управлением ветеринарии утверждены методические указания и инструкция по применению набора. Получено положительное решение на выдачу авторского свидетельства на способ получения латексного диагностикума.

0-13359