Разработка и внедрение в практику методов иммунодиагностики инфекционных заболеваний животных

Development and introduction in practice of the immunoassays for diagnosis of animal infection diseases

Верховский О.А.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-1
УДК 619:616-079.4

Ключевые слова: иммунодиагностические методы, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, инфекционные болезни животных, вакцины, диагностика

Key words: immunoassay, ELISA, monoclonal antibodies, infection diseases of animals, vaccines, diagnosis

Резюме. В статье приведена информация о разработке и внедрению в практику ветеринарных лабораторий современных иммунодиагностических методов, в том числе иммуноферментного (ИФА) и иммунохроматографического (ИХМ). Представлены данные о тенденциях в развитии иммунодиагностической методологии, касающихся технологии производства готовых к применению наборов, расширения спектра диагностируемых патогенов, совершенствования методов контроля вакцин и развития стратегии DIVA. Показана практическая эффективность ИФА и ИХМ на основе моноклональных антител для диагностики инфекционных болезней животных в т.ч. африканской чумы свиней. Обсуждены вопросы, связанные с использованием ИФА на этапе промежуточного контроля производства вакцин, в частности, против бешенства собак и кошек и цирковиральных болезней свиней. На примере болезни Ауески свиней и бруцеллеза крупного рогатого скота показана эффективность иммунодиагностических методов при реализации стратегии DIVA.

Summary. The article focuses on the design and implementation of state of the art immunodiagnostic systems including enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatography test (ICHT). Data on current trends in immunodiagnostic system design are summarized, including such aspects as manufacturing technologies suitable for ready-to-use test kits, broadening the spectrum of detectable pathogens, perfecting vaccine quality control methods and implementing the DIVA strategy. The efficacy of ELISA and ICHT kits based on the use of monoclonal antibodies (Mabs) for the purpose of diagnosing infectious diseases in animals is substantiated. In particular, it was demonstrated that blocking ELISA was designed on the basis of recombinant p30 protein

of the ASF virus and Mabs was highly efficacious when used to detect antibodies against ASFV. This assay could therefore be used to monitor virus dissemination in Russia in order to take timely action at outbreak sites, especially for moderately virulent strains. Additionally, issues related to the use of ELISA in the course of inprocess control are discussed. It was observed that a sandwich ELISA on the basis of Mab 1C5 used to evaluate the content of rabies virus glycoprotein (G-protein) was highly sensitive and specific and was comparable to test kits manufactured overseas. A direct correlation was found between ELISA results obtained for samples containing the virus with no adjuvant present and results obtained using a method approved by NIH. This ELISA assay has therefore been used in the manufacturing of antirabic vaccines as an inprocess control tool for over five years for the purpose of confirming that the virus-containing material is suitable for use as a vaccine component. A similar approach was adopted during the development of a procedure performed as part of inprocess control during the production of a recombinant subunit vaccine "VERRES-CIRCO" against infections caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). The Mabbased sandwich-ELISA designed to detect the ORF-2 protein of PCV2 is capable of identifying both the naturally occurring virus and recombinant protein in samples of any kind, which made it a perfect choice for quantitative assessment of raw materials used in the manufacturing of the vaccine. The efficacy of ELISA-based testing as part of the DIVA strategy implementation was also demonstrated as exemplified by products used to diagnose Aujeszky's disease in pigs and brucellosis in cattle.

Введение

За истекшие годы XXI века были достигнуты значительные успехи в развитии ряда прикладных направлений современной ветеринарной иммунологии, включая решение общих иммунологических проблем, приведших к расширению арсенала средств иммунодиагностики и специфической профилактики болезней животных и человека. Иммунологические (иммунодиагностические) методы, основанные на количественной оценке прямого взаимодействия в системе антиген (эпитоп) – антитело (паратоп) *in vitro*, наряду с молекулярно-биологическими методами (модификации полимеразной цепной реакции – ПЦР, секвенирование генов) занимают ведущее место в структуре современных лабораторных диагностических исследований животных и человека, направленных на:

- 1) диагностику заболеваний, протекающих в острой, хронической или субклинической формах;
- 2) выявление животных-носителей возбудителя инфекции в искомой популяции;
- 3) диагностику латентных инфекций (если хозяин инфицирован, но репликации вируса нет);
- 4) оценку колострального иммунитета у животных в ранний постнатальный период;
- 5) проведение эпизоотологического мониторинга, оценку заболеваемости животных в заданном регионе и оценку риска инфицирования животных и человека;
- 6) подтверждение статуса здоровья животных (животные не только не больны, но и не инфицированы).

По механизму оценки взаимодействия в системе антиген-антитело и характеру образования иммунного комплекса, все иммунодиагностические методы, относящиеся к данной группе, являются т.н. тестами основного связывания и протекают с использованием химических и физических

Авторы / Authors

Верховский О.А., доктор биологических наук, профессор, президент, info@dpri.ru,

АНО "Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных", г. Москва

Поляков В.Ф., доктор биологических наук, профессор

Алипер Т.И., доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией болезней свиней, ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН", г. Москва

Verkhovsky O. A., Polyakov V. F., Aliper T. I.

ких меток. К основным из них относятся следующие: иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический метод (ИХМ), иммуноблоттинг (ИБ), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммуногистохимический метод (ИГХ). В нашей стране разработкой и внедрением в практику подобных методов интенсивно начали заниматься в 80-х годах прошлого столетия, как в медицине, так и в ветеринарии (МГУ им. М.В.Ломоносова, ВИЭВ им.Я.Р. Коваленко, ВНИИВВиМ и др.) и в настоящее время лабораторная диагностика инфекционных болезней животных достигла исключительно широких масштабов, чему способствовало наличие на рынке современных и качественных диагностических наборов. В развитии современной иммунодиагностической методологии следует отметить следующие основные тенденции.

1. Прогресс в области производства готовых к применению наборов. За два последних десятилетия в лабораторную практику ветеринарии и медицины были внедрены простые и надежные высокочувствительные и специфические наборы на основе ИФА, ИХМ и РИФ, созданные с использованием современных технологий и последних научных достижений к которым относятся: а) использование моноклональных антител (МкА) которые практически полностью вытеснили поликлональные не только в наборах, предназначенных для обнаружения антигена, но и в большинстве тест-систем, направленных на выявление антител, где они используются либо в качестве конъюгата или для адсорбции антигена; б) использование рекомбинантных антигенов, обладающих иммунохимическими свойствами нативных белков и являющихся хорошо охарактеризованными и стандартизированными препаратами; в) использование стандартизованных микроносителей, стабильных химических реагентов и высокочувствительных субстратных смесей в качестве неспецифических компонентов наборов. Специалисты НПО НАРВАК и АНО "НИИ ДПБ" впервые внедрили в ветеринарную практику нашей страны подобные ИФА- и ИХМ-наборы, производимые с использованием данной технологии и уже много лет используемые в ветеринарных лабораториях нашей страны для диагностики инфекционных заболеваний свиней, крупного рогатого скота, собак и кошек [1, 2, 4, 5, 10]. Среди последних внедренных разработок, следует отметить наборы на основе ИФА, ИХМ, РИФ и ИГХ, предназначенные для диагностики африканской чумы свиней (АЧС) [3, 6, 11], цирковирусных болезней свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней. В частности, показано, что тест-система в формате конкурентного ИФА на основе рекомбинантного белка р30 вируса АЧС и специфических МкА является эффективным методом выявления антител к вирусу АЧС в практических условиях, что позволяет осуществлять контроль за распространением вируса (особенно обладающего умеренно вирулентными свойствами) на территории нашей страны и оперативно принимать меры по ликвидации очагов инфекции [3].

2. Расширение спектра анализируемых соединений. Дальнейшее развитие иммунодиагностики направлено не только на расширение спектра анализируемых патогенов, но и разработку иммунометодов, предназначенных для выявления сверхмалых количеств биологических и химических веществ в организме животных, продуктах животноводства и окружающей среде, за счет получения хорошо охарактеризованных МкА, обладающих строгой специфичностью и высокой степенью аффинности. Это позволяет оснастить региональные ветеринарные лаборатории новыми наборами, применение которых будет способствовать обеспечению пищевой и биологической безопасности нашей страны. Примером такого подхода явилось получение отечественными специалистами уникальных МкА к ивермектину и разработка ИФА для выявления остаточных количеств ивермектинсодержащих соединений в продуктах животного происхождения [9]. Это существенно облегчает работу ветеринарных лабораторий по контролю качества молока, мяса и продуктов переработки после применения животным противопаразитарных и антигельминтных

средств, содержащих ивермектин и его производные.

3. Совершенствование методов контроля производства вакцин. Известно, что специфическая профилактика инфекционных болезней животных основана на применении живых, инаktivированных или субъединичных вакцин с целью создания у животных напряженного иммунитета, и спектр вакцин отличаются большим разнообразием. При этом необходимой составляющей технологического процесса производства вакцин является контроль качества вирусного или бактериального сырья на промежуточном этапе и конечного содержания микроорганизмов или их антигенов на конечном. Примером применения иммунодиагностического метода для контроля вируссодержащего сырья на различных этапах производства биологических препаратов было нами ранее продемонстрировано на модели инъекционных антирабических вакцин для собак и кошек. Было установлено, что разработанный нами сэндвич-ИФА на основе МкА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства обладает высокой чувствительностью и специфичностью, сопоставимой с аналогичными параметрами зарубежных тест-систем, а результаты ИФА при исследовании вируссодержащих проб без адъюванта положительно коррелировали с таковыми при НИИ-методе. Поэтому данный метод более пяти лет эффективно используется на этапе промежуточного контроля производства антирабических препаратов, т.е. для определения пригодности вирусного компонента при включении его в состав вакцины [7]. Аналогичный подход был использован при разработке метода контроля производства рекомбинантной субъединичной вакцины "ВЕРРЕС-ЦИРКО" против цирковирусных болезней свиней. Разработанный сэндвич-ИФА на основе МкА к белку ORF-2 ЦВС-2 выявляет как нативный вирус, так и рекомбинантный белок ЦВС-2 в любом биологическом материале, что предопределило его использование для количественной характеристики сырья при производстве вакцины [8].

4. Развитие стратегии DIVA. Известно, что вакцинация способна защитить животных от клинических проявлений болезни, но не защищает их от инфицирования. В результате контакта с вирусом вакцинированные животные могут становиться бессимптомными вирусоносителями и потенциальным источником заболевания для неиммунного поголовья. В связи с этим актуальной задачей является разработка и внедрение в практику методов диагностики, способных дифференцировать вакцинированных и инфицированных животных и выявлять вирусоносителей среди вакцинированного поголовья. Эти проблемы можно решить с помощью, так называемой стратегии DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) которая предопределяет использование ИФА на фоне вакцинопрофилактики. При этом в качестве вакцины используется препарат, не содержащий определенного антигена (маркера), а роль ИФА заключается в выявлении антител, как к структурному белку вируса, так и к маркеру. В животноводстве конкретным примером такого подхода является стратегия борьбы с ящуром, бруцеллезом, болезнью Ауески (БА), инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и др. Так, в случае БА основное значение отводится использованию вакцины, маркированной по гену гликопротеина Е (gE), кодирующего фактор вирулентности и соответствующего ИФА-набора, предназначенного для выявления антител к gE-антигену вируса БА. Таким образом, принцип дифференциации основан на отсутствии антител к gE-антигену у вакцинированных свиней (при наличии антител к другим структурным белкам вируса, в частности к gB) и выявлении этих антител (как gE-, так и gB-специфических) у инфицированных животных. В нашей стране такой подход был апробирован с высокой степенью эффективности, что показывает его преимущества перед традиционным [12].

Впервые в России диагностический ИФА-набор, отличительной особенностью которых, являлась способность дифференцировать животных, инфицированных *Brucella abortus* или *Brucella melitensis* от животных, иммунизиро-

ванных всеми типами аттенуированных слабоагглютинируемых вакцин, был разработан в АНО "НИИ ДПБ" и после проведения двухлетних производственных испытаний зарегистрирован в 2009 г. [13]. В настоящее время ассортимент подобных наборов значительно расширился, кроме того появились предварительные данные о возможности использования некоторых из них и в медицине.

Заключение

В последние годы в мировой ветеринарной практике возросли требования как к препаратам, применяемым для специфической профилактики инфекционных болезней, так и к диагностическим наборам, позволяющим своевременно и достоверно выявлять многочисленные патогены на ранней стадии инфекционного процесса. Использование ПЦР, ИФА, ИХМ позволило вывести диагностику на новый уровень чувствительности и специфичности, что позволило расширить спектр анализируемых патогенов, значительно улучшить параметры иммунодиагностических методов и усовершенствовать технологию производства коммерчески доступных диагностических наборов, предназначенных для выявления сверхмалых количеств биологических и химических веществ в организме животных, продуктах животноводства и окружающей среде. В инфектологии это особенно важно в случаях с неясной этиологией, появлении у животных необычных клинических признаков, при подозрении на появление новых вариантов возбудителей или эмерджентных инфекций.

Литература/References

1. Арутюнова, М.А. Иммуноферментный метод выявления специфических антител классов IgG и IgM к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) / М.А.Арутюнова, В.В.Цибезов, С.А.Раев, М.И.Мусиенко, К.П.Алексеев, О.А.Верховский. Т.И.Алипер // Ветеринария. - 2014. - №8 - С.55-59.
2. Баландина, М.В. Иммуноферментная тест-система для выявления антител к вирусу ТГС / М.В.Баландина, В.В.Цибезов, О.А.Верховский, И.В. Непоклонова, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2004. - № 4. - С.20-23.
3. Верховский, О.А. Иммуноферментный метод выявления антител к белку р30 вируса АЧС / О.А.Верховский, В.В.Цибезов, К.П.Алексеев, А.Ю.Козлов, Л.В.Костина, Н.Н.Власова, О.Ю.Черных, Т.И.Алипер // Ветеринарный врач. - 2018. - №5. - С.15-20 (в печати).
4. Верховский, О.А. Моноклональные антитела в ветеринарной иммунодиагностике / О.А.Верховский // Ветеринария и кормление. - 2017. - № 3. - С. 20-21.
5. Верховский, О.А. Разработка и совершенствование иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител, предназначенных для диагностики инфекционных болезней животных / О.А. Верховский, В.В. Цибезов, Т.А. Чеботарева, М.В.Баландина, М.А.Смагина, И.В.Непоклонова, Т.И.Алипер // Ветеринарная патология. - 2003. - №1 (5). - С.107-109.
6. Жуков, И.Ю. Выявление клинико-анатомических, гистологических изменений при АЧС и локализации вируса в органах инфицированных животных / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.С. Иголкин, А.В. Борисова, А.А. Егоров, В.В. Цибезов, О.А. Верховский, Н.Н. Власова // Российский Ветеринарный Журнал, серия "Сельскохозяйственные животные". - 2015. - №3. - С.36-39.
7. Лосич, М.А. Разработка и использование ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства / М.А.Лосич, И.В.Непоклонова, О.А. Верховский, С.В.Грибенча, М.В.Баландина, А.Н.Мухин, С.А.Раев, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2012. - №7. - С.30-35.
8. Раев С.А. Разработка и применение вакцины "ВЕРРЕС-ЦИРКО" / С.А. Раев, К.П.Алексеев, Е.В. Шемельков, Т.И. Алипер, М.М.Мусиенко, Б.Г. Орлянкин, А.М.Мишин, О.А.Верховский, А.Д.Забережний // Ветеринария сегодня. - 2013. - №3. - С. 54-59.
9. Тарасов, И.Е. ИФА для определения ивермектина с использованием моноклональных антител / И.Е.Тарасов, Л.В.Костина, В.В.Цибезов, А.Ю.Козлов, А.А. Непоклонов, Т.И.Алипер, О.А.Верховский // Ветеринария. - 2009. - № 4. - С. 59-61.
10. Терехова, Ю.О. Иммуноферментный метод выявления антител к коронавирусу для диагностики инфекционного перитонита кошек / Ю.О. Терехова, В.В.Цибезов, М.М.Рахманина, Э.И.Элизбарашвили, Н.А.Рахманина. О.А. Верховский // Российский ветеринарный журнал, серия "Мелкие домашние животные". - 2012. - №1. - С. 24-28.
11. Цибезов, В.В. Эффективность иммунохроматографической тест-системы для быстрого выявления вируса африканской чумы свиней / В.В.Цибезов, Ю.О.Терехова, О.А.Верховский, А.С.Першин, Н.Н.Власова, А.С.Иголкин, О.Ю.Черных, Т.И.Алипер, Е.А.Непоклонов // Ветеринария. - 2015. - №5. - С.58-64.
12. Шемельков, Е.В. Разработка и оценка эффективности живой маркированной вакцины "ВЕРРЕС БАГЕ" против болезни Ауески / Е.В.Шемельков, А.П.Котельников, Т.С.Куликова, А.М.Мишин, О.А.Верховский, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2018. - № 6. - С. 21-27.
13. Wolfram, J.H. Diagnostic and vaccine chapter / J.H.Wolfram, S.K.Kokanov, O.A.Verkhovsky // Vaccine. - 2010. - Vol. 28. - SUPPL. 5. - P. F49-F53.