

Иммуноферментный метод выявления антител к коронавирусу для диагностики инфекционного перитонита кошек

Ю.О. Терехова¹, В.В. Цибезов¹, М.М. Рахманина², Э.И. Элизбарашвили², Н.А. Рахманина³, О.А. Верховский¹

¹ АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», Москва, Россия.

² ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва, Россия.

³ Ветеринарная клиника «Кибела» (Москва).

Ключевые слова: антитела, инфекционный перитонит кошек, иммуноферментный анализ

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ВТГС — вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, ИПК (FIP) — инфекционный перитонит кошек (*feline infectious peritonitis*), ИФА — иммуноферментный анализ, МкА — моноклональные антитела, МФА — метод флуоресцирующих антител, ПААГ-ДСН — полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНГА — реакция непрямой гемагглютинации, ТГС — трансмиссивный гастроэнтерит свиней, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, ФСБТ — фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1 % Твин 20, ЭК — энтерит кошек

Введение

Возбудителем ИПК (FIP) является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Coronaviridae, роду Coronavirus. Вирус входит в состав группы таксономически близких коронавирусов, включающую вирус ЭК, ТГС и коронавирус собак [1, 7].

Существует экспериментально подтвержденная теория о том, что вирус ИПК образуется в результате мутации авирулентного кишечного вируса ЭК [10]. При этом вирус приобретает вирулентность, способность поражать моноциты и макрофаги и вызывать тяжелый перитонит [1, 8].

Клинически ИПК проявляется в двух формах — влажной (инфузионной), сопровождающейся скоплением экссудата в брюшной и/или плевральной полостях и сухой (неинфузионной) — гранулематозным поражением внутренних, преимущественно паренхиматозных органов и не сопровождается накоплением экссудата в полостях тела. Инфузионный ИПК считают классической клинической формой проявления заболевания, на долю которого приходится 75 % случаев. Обе формы заболевания приводят к летальному исходу [1]. Наибольшую угрозу ИПК представляет для питомников со скученным содержанием животных, которые становятся стабильным источником распространения инфекции.

Для диагностики ИПК применяют как методы обнаружения непосредственно возбудителя (ИФА, МФА,

ПЦР), так и методы выявления антител (РНГА, МФА, ИФА). Высокие титры антител считаются типичными для генерализованной инфекции и в сочетании с клиническими симптомами ИПК могут быть важным прогностическим показателем, поскольку изменение титров антител в ту или другую сторону прямо коррелирует с тяжестью клинического проявления болезни [4]. Определение уровня антител важно и для выявления интактных животных, что необходимо при «оздоровлении» питомников, осуществлении карантинного контроля, исследовании кошек перед вакцинацией против инфекционного перитонита.

В нашей стране антител к вирусу ИПК определяют в основном посредством РНГА. За рубежом для этого широко применяют иммуноферментные тест-системы различных производителей.

Цель исследования

Разработать метод ИФА для определения антител к коронавирусу кошек, подтвердить его диагностическую ценность и возможность использования для оценки и прогнозирования клинического состояния кошек при ИПК.

Материалы и методы

Антиген. В качестве антигенов применяли очищенные вирусы ИПК и ТГС. Для получения вируса ИПК использовали культуральные раскладки штамма Багира в культуре клеток CrFK с титром инфекционной активности 7,0 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус ТГС (вакцинный штамм ТМК) с инфекционной активностью не менее 7,0 lg ТЦД₅₀/мл получали методом роллерного культивирования в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Вирусы осаждали полиэтиленгликолем 6000 и очищали в линейном градиенте плотности сахарозы (30...45 %) при 125000x g в течение 1,5 ч в 10мМ Трис-НСI, 1мМ ЭДТА, 1М NaCl, 0,2 % твин-20, pH 7,2. Опалесцирующие полосы собирали и диализовали против 0,01М ФСБ (pH 7,4) в течение 12 ч. Полученные антигены использовали для сорбции на планшет. Белковый состав антигенов определяли методом электрофореза в 12 %-м ПААГ-ДСН. Антигенную активность вирусных белков и специфичность антител исследовали методом иммуноб-

лоттинга [9]. В работе использовали ВТГС-специфические МкА (любезно предоставлены канд. биол. наук В.К. Сологубом) и специфические сыворотки крови кошек.

Биологический материал. Контрольные сыворотки крови получали от здоровых кошек. От подозрительных по заболеванию и клинически больных животных получали сыворотки крови, асцитную жидкость и плевральный экссудат. Диагноз подтверждали клиническими или патолого-анатомическими исследованиями. Все образцы биоматериала были предварительно исследованы на наличие специфических антител методами РНГА и ИФА с использованием коммерческого набора Feline Corona Virus antibody ELISA (EVL, Голландия).

Антитела к IgG кошки, конъюгированные с пероксидазой хрена. IgG получали из сыворотки крови кошки методом аффинной хроматографии с использованием Protein A-agarose (Sigma, США). Очищенным препаратом иммунизировали козу. IgG козы из гипериммунной сыворотки очищали на Protein A-agarose. Конъюгат антител с пероксидазой хрена получали периодатным методом [6]. Иммунохимическая активность и специфичность конъюгата определяли методом прямого ИФА с использованием в качестве антигенов IgG кошки, человека, свиньи и крупного рогатого скота.

Непрямой ИФА антител. Антигены очищенных вирусов ТГС и ИПК сорбировали на иммунологических планшетах (Greiner, Германия) в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5 в течение 18 ч при 4°C, промывали ФСБТ и высушивали при 37°C. Концентрации реагентов для сорбции подбирали методом шахматного титрования.

Для специфической сорбции антигенов вируса ТГС, ВТГС-специфичные МкА (концентрация 10 мкг/мл) сорбировали в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5 в течение 18 ч при 40°C. Планшеты промывали ФСБТ и блокировали ФСБТ, содержащим 5 % сыворотки крови лошади. Затем вносили очищенный вирус ТГС (0,06 мг/мл) в ФСБТ+0,5 % БСА, инкубировали 18 ч при 40°C, повторно блокировали сывороткой лошади, промывали ФСБТ и высушивали при 37°C.

В лунки планшетов с иммобилизованным антигенами вносили 0,1 мл сывороток кошек (двукратные разведения 1:100...1:200 и т.д.) в ФСБТ + 0,5 % БСА. Планшет инкубировали 1 ч при 37°C, промывали ФСБТ и добавляли 0,1 мл меченых пероксидазой антител к IgG кошки. Через 1 ч инкубации при 37°C отмывали планшет ФСБТ и вносили в лунки 100 мкл субстратного раствора с тетраметилбензидином («МДЛ», Россия). Инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 0,1 мл 1М H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом (Multiscan EX, США) при 450 нм (A₄₅₀). Положительными считали сыворотки со значением A₄₅₀ в 2 раза выше значения A₄₅₀ отрицательной сыворотки.

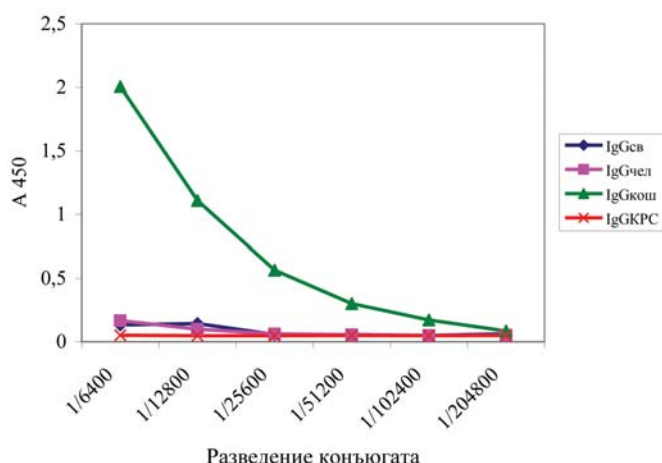


Рис.1. Иммунохимическая активность и специфичность пероксидазного конъюгата поликлональных антител козы к IgG кошки, определенная методом непрямого ИФА

Результаты

Ключевыми компонентами непрямого ИФА для детекции антител являются высокоочищенные антигены и специфические антивидовые антитела.

На первом этапе работы нами получены специфические поликлональные антитела к IgG кошки, которые были конъюгированы с пероксидазой хрена. При определении иммунохимической активности и специфичности конъюгата методом прямого ИФА показано, что полученный конъюгат обладает высокой иммунохимической активностью и специфичностью к IgG кошки и не взаимодействует с IgG других млекопитающих (рис. 1).

Чтобы выбрать антиген для ИФА, сравнили иммунохимическую специфичность антител к ИПК к вирусам ИПК и ТГС, поскольку известно, что данные вирусы обладают близкими структурными и антигенными характеристиками [1, 3, 7].

Вирусы ИПК и ТГС были очищены в градиенте сахарозы и отработаны условия их прямой сорбции на

1. Результаты исследований сывороток крови кошек с использованием в качестве антигенов вирусов ТГС и ИПК

№ пробы сыворотки крови	Титр ИФА с антигеном ТГС	Титр ИФА с антигеном ИПК	Титр РНГА
1	1:12800	1:12800	1:4096
2	1:12800	1:12800	1:2048
3	1:12800	1:12800	1:2048
4	1:12800	1:12800	1:1024
5	1:12800	1:6400	1:1024
6	1:6400	1:6400	1:512
7	1:3200	1:6400	1:512
8	1:800	1:400	1:64
9	1:400	1:400	1:32
10	≤1 : 200	≤1 : 200	1:32
11	≤1 : 200	≤1 : 200	1:4
12	≤1 : 200	≤1 : 200	1:2
13	≤1 : 200	≤1 : 200	≤1:2
14	≤1 : 200	≤1 : 200	≤1:2

иммунологические планшеты. При исследовании панели сывороток от больных и здоровых кошек показана 100%-я корреляция результатов при использовании в ИФА антигенов вирусов ТГС и ИПК (табл. 1).

Очищенный вирус ТГС был исследован методом электрофореза в ПААГ и иммуноблоттингом. Показано, что основным белком в полученном препарате вируса ТГС является белок с молекулярной массой около 45 кД (рис. 2), что соответствует молекулярной массе структурного нуклеокапсидного белка N [7]. Другие структурные белки вируса S и M присутствуют в меньших количествах. При анализе антигенов ТГС методом иммуноблоттинга показано, что основную антигенную активность проявляет белок N, который одинаково эффективно детектируется как ВТГС-специфическими МкА, так и антителами из сыворотки крови кошек с диагнозом ИПК. Однако сыворотка № 6 детектирует более широкий спектр вирусных антигенов (см. рис. 2).

В процессе работы было установлено, что при непосредственной сорбции вируса ТГС на иммунологический планшет происходит быстрая (в течение 1,5...2 нед) инактивация антигена. Для решения этой проблемы была использована схема «принудительной» сорбции антигена через ВТГС-специфические МкА. Оказалось, что в таком формате сорбции сохранность антигена на планшете увеличивалась, по крайней мере, до 6 мес (срок наблюдения).

Чувствительность и специфичность разработанного метода ИФА по сравнению с РНГА составляла 85 и 88 %, соответственно; по сравнению с коммерческой иммуноферментной тест-системой Feline Corona Virus antibody ELISA 96 и 98 %.

Чтобы оценить диагностическую эффективность разработанной тест-системы, были исследованы сыворотки, асцитная жидкость и/или плевральный экссудат от здоровых кошек, кошек с подозрением на ИПК и животных с подтвержденным диагнозом ИПК. Отмечено, однако, что при использовании в качестве биоматериала асцитной жидкости и плеврального экссудата отсутствовала прямая корреляция между результатами ИФА и РНГА, а также клиническим диагнозом. Возможно, это связано с высоким содержанием вируса и/или наличием иммунных комплексов в биоматериалах, что препятствует корректному определению антител в формате непрямого ИФА. Не исключено также, что антитела в асцитной жидкости и плевральном экссудате появляются лишь на терминальной стадии заболевания, как это происходит в спинномозговой жидкости [2]. В связи с этим, в дальнейшей работе использовали только сыворотки крови. Результаты приведены в таблице 2.

Анализ полученных данных показывает, что диагноз ИПК можно считать установленным при показателях титра антител в ИФА 1:3200 и выше (диагностический титр).

Обсуждение

Антигенное сходство коронавирусов делает практически невозможным дискриминацию антител к этим вирусам методом непрямого ИФА. С другой стороны, это обстоятельство позволяет использовать в каче-

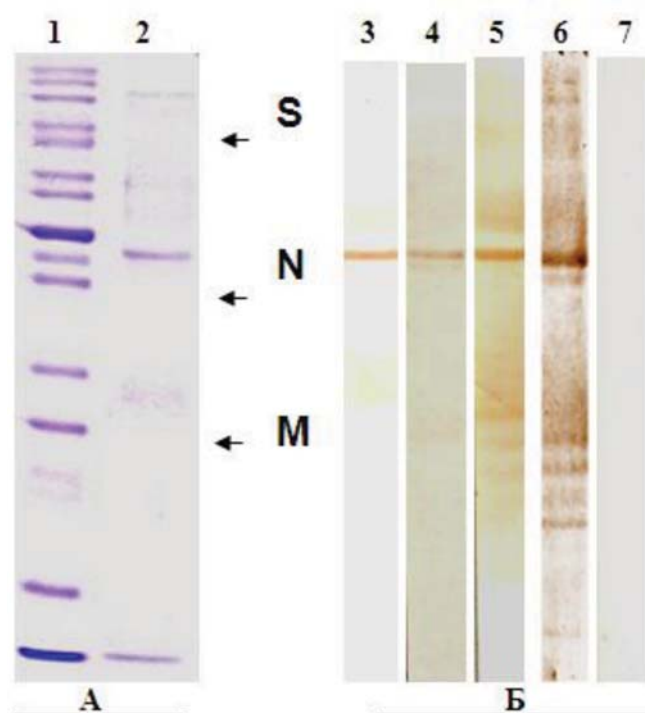


Рис. 2. Электрофоретическая и антигенная характеристика очищенного вируса ТГС. А. Окраска суммарных белков в геле Кумасси G-250. Маркеры молекулярной массы 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 кД (1), Вирус ТГС (2). Стрелками отмечено положение основных белков вируса ТГС. Б. Обработка вирусных белков после электропереноса на PVDF мембрану ВТГС-специфическими МкА (3), сыворотками крови кошек, положительными к коронавирусу кошек (4, 5, 6), сывороткой здоровой кошки (7)

стве антигена для определения антител другие коронавирусы семейства. Известно, например, что с помощью белков S, N и M вируса ТГС методами ИФА и радиоиммунной преципитации в сыворотке крови одинаково эффективно детектируются антитела не только к вирусу ТГС, но и к вирусу ИПК и коронавирусу собак [3]. В свою очередь, коронавирус собак был успешно использован для детекции антител к вирусам ЭК и ИПК методом непрямого ИФА [5]. Полученные в настоящей работе данные показывают, что для выявления антител к вирусу ИПК можно применять метод непрямого ИФА с очищенным вирусом ТГС, причем определяемые уров-

2. Результаты определения титров антител к коронавирусу в сыворотках крови кошек

Количество проб (животных)	Титр в ИФА	Титр в РНГА	Клинические данные/патологоанатомическое подтверждение диагноза
17	? 1:200	0...1:2	Клинически здоровы
52	1:200...1:800	1:2...1:32	Клинически или патологоанатомический диагноз не подтвердился
17	1:800...1:3200	1:32...1:256	Вирусоносители. Клинически здоровы, в фекалиях методом ПЦР обнаружен коронавирус
14	≥ 1:3200	≥ 1:512	Классическое проявление клинической картины или патолого-анатомических изменений, характерных для ИПК

ни антител в сыворотках кошек при использовании вирус ТГС и ИПК практически совпадают (см. табл. 1).

Антигенная активность вируса ТГС в отношении антител к вирусу ИПК подтверждена также методом иммуноблоттинга: в сыворотках животных с диагнозом ИПК и высокими титрами антител в ИФА выявляются антитела к белкам вируса ТГС (см. рис. 2). Видно также, что антигенный спектр, выявляемый сыворотками от разных животных, различается: положительные сыворотки №№ 4 и 5 детектируют только белок N, в то время как сыворотка № 6 активна в отношении и других вирусных белков. Связывание антител только с белком N (но не с белками S и M) коронавируса может быть обусловлено особенностью формирования иммунного ответа при ИПК. Известно, например, что при экспериментальном заражении кошек вирусом ЭК первыми формируются антитела к белку N, а антитела к другим вирусным белкам детектируются лишь к 40...50-ую после заражения [11]. Не исключено, что изменение антигенного спектра для сывороточных антител, выявляемое иммуноблоттингом, указывает на стадию развития заболевания. Таким образом, данный метод может быть использован как дополнительный, подтверждающий тест для диагностики ИПК.

Полученные результаты демонстрируют возможность использования более доступного антигена вируса ТГС для определения антител к вирусу ИПК, поскольку культивирование и хранение коронавирусов ЭК и ИПК кошек представляет определенные трудности (низкий выход вируса, культивирование в нестандартных условиях, предпочтительное хранение при -70°C) [1].

Диагностическое значение разработанного иммуноферментного метода было определено при исследовании сывороток крови кошек с подозрением на ИПК и животных с подтвержденным диагнозом ИПК (табл. 2).

Титр 1:800...1:1600 может свидетельствовать о возможной инфицированности животного как вирусом ИПК, так и вирусом ЭК и/или ксеногенными коронавирусами, а также указывать на латентную форму болезни или носительство. Известно, что для ИПК характерно быстрое увеличение уровня антител [4]. В связи с этим, необходимы повторные исследования клинического материала с интервалом 2...4 нед. Увеличение титра антител за этот период может быть вызвано развитием инфекционного процесса, а при достижении уровня 1:3200 или выше при повторном исследовании интерпретируется как ИПК. При сохранении первоначального результата при повторном исследовании или снижении титра диагноз ИПК можно считать отрицательным. Для дальнейшего прогнозирования развития инфекции у серопозитивных кошек с титрами выше 1:800, особенно при их скученном содержании, можно рекомендовать ежемесячные исследования сыворотки крови методом ИФА.

Заключение

Разработана ИФА тест-система для определения титра антител к коронавирусу кошек, которая может быть использована в лабораторной ветеринарной практике для диагностики ИПК, прогнозирования течения болезни и мониторинга уровня антител к вирусу ИПК.

Библиография

1. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. — М.: Библионика, 2007.
2. Boettcher I.C., Steinberg T., Matiassek K., Greene C.E., Hartmann K., Fischer A. Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats // J. Am. Vet. Med. Assoc., 2007; 15, **230** (2): 199—205.
3. Horzinek M.C., Lutz H., Pedersen N.C. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses // Infect. Immun., 1982, **37** (3): 1148—1155.
4. Kai K., Yukimune M., Murata T., Uzuka Y., Kanoe M., Matsumoto H. Humoral immune responses of cats to feline infectious peritonitis virus infection // J. Vet. Med. Sci., 1992; **54** (3): 501—507.
5. Mochizuki M., Furucava H. An enzyme-linked immunosorbent assay using canine coronavirus-infected CRFK cells as antigen for detection of anti-coronavirus antibody in cat // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1989; **12** (4): 139—146.
6. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody — a new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem., 1974; **22** (4): 1084—1092.
7. Spaan W., Cavanagh D., Horzinek M.C. Coronaviruses: structure and genome expression // J. Gen. Virol., 1988; **69** (Pt 12): 2939—2952.
8. Stoddart C.A., Scott F.W. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence // J. Virol., 1989; **63** (1): 436—440.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Biotechnology, 1992; **24**: 145—149.
10. Vennema H., Poland A., Foley J., Pedersen N.C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses // Virology, 1998; 30, **243** (1): 150—157.
11. Vogel L., van der Lubben M., Te Lintelo E.G., Bekker C.P., Geerts T., Schuijff L.S., Grinwis G.C., Egberink H.F., Rottier P.J. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats // Vet. Res., 2010; 23, **41** (5): 71.

SUMMARY

Yu.O. Terekhova, V.V. Tsibezov, N.A. Rakhmanina, M.M. Rakhmanina, E.I. Elisbarishvili, O.A. Verkhovsky. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of feline coronavirus antibodies for feline infectious peritonitis (FIP) serology. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of feline infectious peritonitis (FIP) virus antibodies is described. In the assay transmissible gastroenteritis (TGE) and FIP viral antigens was used. Comparative testing of selected feline sera in both assays resulted in corresponding titers, which justifies the conclusion that the ELISA was able to detect anti-coronavirus antibodies and is a reliable test for the serology of FIP.