

УДК 619:578

## ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ПАРВОВИРУСУ ГУСЕЙ

Трефилов Б.Б., Никитина Н.В.

ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург, e-mail: vnivip@yandex.ru

В последние годы достигнуты определенные успехи в борьбе с инфекционными болезнями молодняка водоплавающих птиц вирусной и бактериальной природы, значение инфекционной патологии как одного из основных критериев благополучия признано всем мировым сообществом. На фоне достижений по изучению этой проблемы особенно явной становится концентрация усилий исследователей по изысканию методов и средств диагностики и специфической профилактики и эффективных методов защиты молодняка от такой весьма распространенной инфекционной болезни, как парвовирусная инфекция гусей. В этой связи сохраняется также актуальность разработки таких технологических систем, которые обеспечивали бы получение здорового молодняка с высокой резистентностью. Возникновение парвовирусной инфекции, тяжесть течения болезни тесно связаны с нарушением санитарно-гигиенического и противоэпизоотического режима, а также технологии кормления. В статье описаны результаты разработки непрямого варианта иммуноферментного анализа для серологической диагностики парвовирусной инфекции гусей. Получен антивидовой иммунопероксидазный конъюгат гусиный. Установлена высокая чувствительность и специфичность разработанной тест-системы для выявления антител к парвовирусу в сыворотке крови гусей. Показана коррелятивная связь результатов исследований в реакции нейтрализации и иммуноферментном анализе.

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, антивидовой конъюгат, парвовирусная инфекция гусей, диагностика, специфические антитела

## ELISA TEST KITS FOR ANTIBODY DETECTION TO THE GOOSE PARVOVIRUS

Trefilov B.B., Nikitina N.V.

Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science», Saint-Petersburg, e-mail: vnivip@yandex.ru

In recent years was achieved the certain success in the fight against viral and bacterial disease of young waterfowl birds, value of infectious pathology as one of the main measures of well-being recognized by The Entire International Community. On the base of achievements in the study of this problem, especially obvious becomes a concentration of research efforts on the search of methods and diagnostic means and specific prophylaxis and effective protection methods of young animals from this common infectious disease, such as geese parvovirus infection. Thereby, saves topicality of development such technologically systems, that would provide obtaining healthy young animals with high resistance. The emergence of parvovirus infection, severity of the disease are closely related with noncompliance of sanitary-hygiene mode and also the feeding technology. In this article were described the results of indirect ELISA development for geese parvovirus infection serological diagnostic, was obtained the geese anti-species conjugate and has been found that the developed test kit for antibody detection to parvovirus in geese blood serum is highly sensitive and specific, was shown the correlative relation of research results in neutralization reaction and ELISA.

**Keywords:** linked immunosorbent assay, antispecies conjugate parvovirus infection geese, diagnosis, specific antibodies

Серьезным препятствием на пути развития промышленного гусеводства наряду с факторами нарушения технологического режима выращивания являются различные инфекционные болезни молодняка, среди которых особое место занимает парвовирусная инфекция гусей (болезнь Держи). Эта болезнь до настоящего времени имеет широкое распространение в гусеводческих хозяйствах, протекает остро и сопровождается высокой смертностью среди гусят 1–30-суточного возраста, достигая до 60–100% [1, 2, 3, 6, 12].

Данные эпизоотологических и клинических наблюдений, патологоанатомической картины и лабораторных исследований свидетельствуют о том, что парвовирусная инфекция (ПВИ) гусей протекает как моноинфекция и как смешанная инфекция с бактериальными, грибными и паразитарными

болезнями (сальмонеллезы, колибактериоз, аспергиллез и кокцидиозы) [6, 11].

Диагностика смешанных инфекций связана со значительными трудностями и требует комбинированного использования современных вирусологических и микробиологических методов исследования.

Для серодиагностики широко используют реакцию нейтрализации в культуре клеток, которая высокоспецифична, но наряду с этим она дорогостоящая, методически трудоемкая и связана с сезонностью репродуктивного периода гусей [5, 12].

Серологическая диагностика ПВИ гусей с применением иммуноферментного анализа (ИФА) является наиболее распространенной, как в аспекте ретроспективного отслеживания возможных вспышек заболевания, так и для оценки эффективности специфической профилактики [4, 10].

Учитывая очевидную перспективность ИФА, разработка чувствительного и специфического метода выявления и оценки концентрации антител к парвовирусу в сыворотке крови гусей, используемого для серологического контроля за распространением ПВИ в популяциях гусей и оценки эффективности иммунизации поголовья против данной болезни является актуальной.

Целью исследований явилась разработка тест-системы для выявления антител к парвовирусу в сыворотке крови гусей методом иммуноферментного анализа.

### Материалы и методы исследований

*Вирус.* В работе использовали вакцинный «клон б» штамма П-75 парвовируса гусей с титром  $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$  [7].

*Химические агенты:* аминоксилы (АЭЭИ), тиосульфат натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).

*Культуру клеток* готовили из 14–15 – суточных гусиных эмбрионов (КЭГ) по общепринятой методике [8].

*Птица:* гуси 12-месячного возраста из ОАО «Утиный бройлер», благополучного по инфекционным болезням.

*Вирус инактивировали* АЭЭИ в режиме перемешивания в течение 24 ч при температуре  $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Нейтрализацию АЭЭИ проводили 2М раствором тиосульфата натрия до конечной концентрации  $0,03 \text{ М/дм}^3$ . Полноту инактивации вируса определяли последовательными трехкратными пассажами в культуре КЭГ.

*Очистку вирусосодержащего материала* проводили методом гельхроматографии на макропористом стекле (МПС), обработанном 4% раствором поливинилпирролидона.

*Иммуноглобулины G (IgG)* выделяли из нормальной сыворотки крови гусей. Осаждение сывороточных иммуноглобулинов проводили 30% раствором сернокислого аммония с последующей очисткой на колонке с Sephadex G-200.

*Иммуноферментный конъюгат* получали модифицированным методом периодатного окисления [9]. Очистку конъюгата проводили методом гельфилтрационной хроматографии на колонке с Sephadex G-200, уравновешенной 0,01 М фосфатно-солевым буфером pH 7,2 (+ 0,02 М NaCl). Использовали фракции со значениями  $\text{RZ} = 0,4\text{--}0,6$ . Активность конъюгата проверяли в прямом «сэндвич»-варианте ИФА со специфическим иммуноглобулином.

*Иммуноанализ антител.* Для сенсibilизации поверхности лунок использовали антиген парвовируса гусей в оптимальной концентрации, разведенный 0,01М ФБР, pH 7,3–7,5. Иммунизацию антигена на поверхности лунок полистироловых планшет осуществляли в течение 18–20 часов при температуре 4–8°C. Несвязавшийся антиген с поверхностью полистирола отмывали трехкратно в объеме  $0,2 \text{ см}^3$  0,01М калий-фосфатным буфером, содержащим 0,5М раствор хлорида натрия с 0,1% конечной концентрацией твина-20 (ФБРТ), pH 7,0–7,4. В качестве субстрата пероксидазы использовали 0,04% раствор ортофенилендиамина (ОФД) в фосфатно-цитратном буфере pH 4,9–5,0 и 0,4% раствор перекиси водорода. Для остановки реакции использовали 10% раствор

серной кислоты и считывали оптическую плотность на иммуноферментном анализаторе «Униплан» при длине волны 492 нм.

*Статистическая обработка данных.* Для статистической обработки данных использовали общепринятые методы вариационной статистики, применяя компьютерную программу Microsoft Excel.

### Результаты исследований и их обсуждение

1. Получение специфических компонентов для иммуноферментного анализа.

*1.1. Получение очищенного парвовируса гусей.* Парвовирус гусей репродуцировали в культуре клеток гусиных эмбрионов. Активный антиген парвовируса получали из культуральной вирусосодержащей жидкости с титром не ниже  $7,5 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$ .

Вирусосодержащую культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Вирус осаждали центрифугированием при 160000 g в течение 1,5 часов и очищали методом молекулярно-ситовой хроматографии на макропористом стекле с диаметром пор 700Å в 0,01М натрий-фосфатном буфере с содержанием 0,15 М хлорида натрия, pH  $7,2 \pm 0,2$ . Очистка вируса составила 98,5%, с концентрацией белка 30–40 мкг в  $0,1 \text{ см}^3$ .

*1.2. Получение специфической (иммунной) сыворотки крови.* Для получения специфической гипериммунной сыворотки крови к парвовирусу использовали клинически здоровых 30-суточных гусят, свободных от антител к возбудителям вирусных болезней: ньюкаслская болезнь, гепатит, адено-, рео- и парвовирусная инфекции гусей. Экспериментально было показано, что оптимальным методом получения гипериммунной сыворотки крови гусей является трехкратное введение птице очищенного вируса по схеме: двукратное введение антигена вируса подкожно в объеме  $0,5 \text{ см}^3$  с интервалом в 7 сут. Третья иммунизация через 7 сут. внутривенно в объеме  $1,0 \text{ см}^3$ . Через 14 сут. после последней иммунизации гусей тотально обескровливали путем взятия крови из сердца. Активность гипериммунной сыворотки определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток гусиных эмбрионов в β-варианте, ее активность равнялась  $9,0 \log_2$ , а титр в ИФА составил 1:4000.

Нормальную сыворотку крови гусей получали от клинически здоровых 30-суточных гусят, свободных от антител к возбудителям вирусных болезней птиц, в том числе к парвовирусу гусей, для отрицательного контроля в ИФА и получения антивидового иммунопероксидазного конъюгата.

*1.3. Выделение IgG* из нормальной сыворотки крови гусей проводили сульфатно-ри-

ваноловым методом. Фракцию, содержащую IgG(H + L), очищали с помощью гельхроматографии на Sephadex G-200 и идентифицировали иммуноэлектрофорезом. Содержание белка в полученном материале составило 10,5 мг/см<sup>3</sup> по Лоури. Выделенные IgG(H+L) использовали для получения иммунопероксидазного конъюгата.

*1.4. Конъюгат получали* методом перидатного окисления и очищали от несвязавшейся пероксидазы на колонке с сефадексом G-200. Отбирали пиковые фракции с коэффициентом связывания от 0,4 до 0,6, так как при этих значениях достигается оптимальное соотношение фермента с IgG(H + L) в конъюгате, когда каждая молекула иммуноглобулина связана с одной или более молекулами пероксидазы.

Активность конъюгата в «сэндвич»-варианте ИФА со специфическим IgG была 1:4000. Для выявления специфических антител к ПВИ гусей подбирали оптимальное рабочее разведение конъюгата, которое составило 1:400.

2. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к парвовирусу гусей.

*2.1. Определение оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов.* Оптимизацию параметров постановки реакции для выявления антител к парвовирусу гусей проводили по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам диагностической тест-системы. Для получения активного твердофазного иммуносорбента использовали планшеты фирмы «Nunc» (США). Рабочее разведение антигена было определено методом «шахматного» титрования на поверхности лунок полистироловых планшетов в фосфатно-солевом буфере, рН = 7,3–7,5, в течение 16–18 часов при температуре 4°C. Оптимальной сенсibiliзирующей дозой парвовирусного антигена явилась концентрация 6–8 мкг на лунку в объеме 0,1 см<sup>3</sup>. Рабочее разведение конъюгата составило 1:300–1:400. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин («Sigma») в концентрации 5 мг на 12 см<sup>3</sup> фосфатно-цитратного буфера, рН = 4,9–5,0. В процессе постановки реакции исследуемые и контрольные сыворотки, конъюгат инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 минут. В качестве промывочной буферной системы, обеспечивающей специфичность иммуноферментного анализа, использовали 0,01М калий-фосфатный буфер, рН = 7,2–7,4, содержащий 0,5М хлорида натрия с 0,1% конечной концентрацией детергента твин-20.

*2.2. Определение диагностического титра сыворотки в ИФА.* Диагностический

титр в ИФА устанавливали методом «шахматного титрования» положительных сывороток, начиная с разведения 1:100, при стандартной концентрации (6 мкг на лунку) сорбированного антигена. Результаты исследований показали, что разведение сыворотки 1:400 дает возможность не пропустить слабоположительные сыворотки и считать разведение сыворотки 1:400 диагностическим титром на парвовирусную инфекцию гусей. При этом 40 проб сыворотки крови из благополучных по вирусному энтериту хозяйств были отрицательными в ИФА, что подтверждает специфичность разработанной диагностической тест-системы.

*2.3. Количественная оценка титра антител к парвовирусу гусей методом одного разведения.* Для определения конечного титра тестируемой сыворотки по одному разведению использовали метод регрессионного анализа. При исследовании проб сыворотки, имеющих разную активность, определяли корреляцию между значениями Ig S/P и Ig T, установленными для разведений сыворотки 1:100, 1:400 и 1:800, и проводили построение соответствующих математических моделей. Установлено, что наиболее высокое значение коэффициента корреляции определено для разведения сыворотки 1:400, которое и было принято за рабочее. Уравнение линейной регрессии  $Ig T = 1,4128 (Ig S/P) + 3,5575$  для разведения сыворотки 1:400 было использовано для расчета числового значения титра.

Определение диапазона допустимых значений оптических плотностей (ОП) отрицательного и положительного контролей является обязательным для разрабатываемой тест-системы ИФА. Установлено, что разница показателей средних значений ОП положительного и отрицательного контролей в разведении 1:400 должна быть в диапазоне 0,340–0,980. Среднее значение ОП отрицательного контроля в разведении 1:400 не должно превышать 0,200.

*2.4. Определение пороговых S/P-показателей реакции, разграничивающих специфическое и неспецифическое взаимодействие,* проводили путем исследования проб сыворотки крови гусей, свободных от антител к парвовирусу, но имеющих уровень неспецифической реакции, превышающий отрицательный контроль. В качестве пороговой величины для отрицательной реакции приняли S/P-показатель, который соответствовал нижней границе 95% доверительного интервала исследованной выборки значений ОП. S/P-показатель для отрицательной реакции составил 0,2. Пороговой величиной, соответствующей ми-

нимальной ожидаемой положительной реакции, считали значение S/P, установленное для верхней границы 95% доверительного интервала. Величина S/P для положительной реакции составила 0,24. Промежуточные величины 0,21–0,23 соответствовали зоне «сомнительных» результатов.

*2.5. Оценку чувствительности и специфичности разработанной тест-системы* проводили путем сравнительного анализа результатов тестирования проб сыворотки крови гусей в ИФА и реакции нейтрализации (РН), которая является классическим тестом серологической диагностики вирусных болезней. Результаты исследования представлены в таблице.

Параллельное тестирование сыворотки крови гусей различной активности показало, что корреляция между результатами исследования в ИФА и РН составила 97%, 96% и 95% соответственно. С отрицательными и гетерологичными сыворотками крови гусей результаты иммуноферментной реакции были отрицательными ( $P < 0,05$ ). Полученные результаты исследований подтверждают высокую чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы.

*2.6. Практическое использование иммуноферментной тест-системы для выявления антител к парвовирусу в сыворотке крови гусей.* Сыворотки крови, полученные из ООО «Катайский гусеводческий комплекс» и ЗАО «Птицефабрика Глазовская» после иммунизации гусей вирусвакциной ВНИВИП против вирусного энтерита, исследовали методом ИФА и реакцией нейтрализации на культуре клеток.

Результаты исследований показали, что вакцина сухая культуральная ВНИВИП обладает высокой антигенной активностью. Средний титр антител на пике яйцекладки в ООО «Катайский гусеводческий комплекс»

составил 5375 ( $P < 0,05$ ), а ЗАО «Птицефабрика Глазовская» – 3820 ( $P < 0,05$ ). У гусят, полученных от вакцинированных родителей, средний титр материнских антител в ИФА составил 1121 ( $P < 0,05$ ) и 809 ( $P < 0,05$ ) соответственно, что обеспечило птице защиту от инфицирования полевым вирусом в восприимчивый период.

Изучение динамики иммуногенеза у гусынь в процессе яйцекладки, вакцинированных вирус-вакциной ВНИВИП, показало, что уровень специфических антител снижался незначительно к концу репродуктивного периода.

Определение напряженности трансовариального иммунитета у суточных гусят показало, что уровень материнских антител у гусят с возрастом снижался, так, у 1-, 3-, 6-, 9- и 15- суточных гусят он составил 100, 70, 50, 25 и 0% соответственно. Период полураспада материнских антител составил 6 суток. Полученные данные свидетельствуют о необходимости вакцинации потомства в 10-суточном возрасте, что и согласуется с Инструкцией по применению вирус-вакцины.

**Выводы**

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения антител к парвовирусу в сыворотке крови гусей в одном разведении и методом последовательных разведений.

Установлено, что данный экспресс-метод является высокочувствительным и специфичным для серологического контроля над распространением парвовирусной инфекции гусей, оценки эффективности иммунизации поголовья против данной болезни и ретроспективной диагностики ПВИ гусей по приросту уровня специфических антител. Получен патент РФ № 2323743 «Способ определения специфических антител к вирусу энтерита гусей ИФА».

Результаты сравнительного изучения серологических реакций

№№ п/п	Сыворотка крови гусей	Активность сывороток		коэффициент корреляции, r
		РН, log <sub>2</sub>	ИФА	
1	гипериммунная сыворотка (положительный контроль), n = 5	9,0 ± 0,5	8005 ± 135	0,97
2	отрицательная сыворотка (отрицательный контроль), n = 2	0,75 ± 0,05	–	–
3	сыворотка крови от невакцинированных гусей, n = 3	0,75 ± 0,1	–	–
4	сыворотка крови от вакцинированных гусей, n = 10	8,5 ± 0,75	5375 ± 82	0,96
5	сыворотка крови суточных гусят, полученных от вакцинированных гусей, n = 10	5,8 ± 0,14	1121 ± 57	0,95
6	гетерологичные сыворотки к вирусам: – гепатита – реовируса	– –	– –	– –

## Список литературы

1. Белецкая А. Вирусный энтерит – под контроль / А. Белецкая // Птицеводство. – 2003. – № 8. – С. 17.
2. Контримавичус Л.М. Вирусный энтерит гусей. / Л.М. Контримавичус // – В кн.: «Профилактика инфекционных болезней молодняка». – М. – Колос, 1983. – С. 198–202.
3. Малушко В.В. Вирусный энтерит гусей. / В.В. Малушко // – В кн.: «Справочник вет. врача птицеводческого предприятия». – М. – Колос, 1982. – Ч. 1. – С. 103–105.
4. Маслов Д.В., Никитина Н.В., Трефилов Б.Б. Диагностика вирусного энтерита гусей методом иммуноферментного анализа // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. XVIII Междунар. межвуз. науч.-практ. конф. СПбГАВМ. – СПб., 2006. – 57 с.
5. Суворов А.М. Антигенные свойства парвовируса гусей // Бюл. ВИЭВ. – М., 1982. – Вып. 48. – С. 16–18.
6. Трефилов Б.Б. Разработка и внедрение средств диагностики и специфической профилактики наиболее опасных вирусных болезней птиц (инфекционный ларинготрахеит, вирусный энтерит гусей, реовирусный теносиновит). / Б.Б. Трефилов // Дисс. ... док. вет. наук. – СПб., – 2000. – 42 с.
7. Трефилов Б.Б. Штамм Goosa parvovirus для приготовления вакцинных препаратов против вирусного энтерита гусей, патент РФ № 1499917. – 1993.
8. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: «Колос», 2000. – С. 272.
9. Farr A.G., Nakane P.K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review / A.G. Farr, P.K. Nakane // J. of Immunological Methods. – 1981. – № 47. – P. 129–144.
10. Kardi V., Szegletes E. Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it / V. Kardi, E. Szegletes // Avian Pathology. – 1996. – № 25. – P. 25–34.
11. Kisary J. Indirect Immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of chickens / J. Kisary // Avian Pathology. – 1985. – № 14. – P. 269.
12. Peter W. Parvovirusinfection bei Gänsen / W. Peter // Mh. Vet.-Med. – 1985. – Jg. 40. – H. 19. – P. 63–68.

## References

1. Beleckaja A. Virusnyj jenterit pod kontrol' / A. Beleckaja // Pticevodstvo. 2003. no. 8. p. 17.
2. Kontrimavichus L.M. Virusnyj jenterit gusej. / L.M. Kontrimavichus // V kn.: «Profilaktika infekcionnyh boleznej molodnjaka». M. Kolos, 1983. pp. 198–202.

3. Malushko V.V. Virusnyj jenterit gusej. / V.V. Malushko // V kn.: «Spravochnik vet. vracha pticevodcheskogo predpriyatija». M. Kolos, 1982. Ch. I. pp. 103–105.

4. Maslov D.V., Nikitina N.V., Trefilov B.B. Diagnostika virusnogo jenterita gusej metodom immunofermentnogo analiza // Novye farmakologicheskie sredstva v veterinarii: mater. XVIII Mezhdunar. mezhvuz. nauch.-prakt. konf. SPbGAVM. SPb., 2006. 57 p.

5. Suvorov A.M. Antigennye svojstva parvovirusa gusej // Bjul. VIJeV. M., 1982. Vyp. 48. pp. 16–18.

6. Trefilov B.B. Razrabotka i vnedrenie sredstv diagnostiki i specificheskoy profilaktiki naibolee opasnyh virusnyh boleznej ptic (infekcionnyj laringotraheit, virusnyj jenterit gusej, reovirusnyj tenosinovit). / B.B. Trefilov // Diss. ... dok. vet. nauk. SPb., 2000. 42 p.

7. Trefilov B.B. Shtamm Goosa parvovirus dlja prigotovlenija vakcinnyh preparatov protiv virusnogo jenterita gusej, patent RF no. 1499917. 1993.

8. Trocenko N.I., Belousova R.V., Preobrazhenskaja Je.A. Praktikum po veterinarnoj virusologii. M.: «Kolos», 2000. p. 272.

9. Farr A.G., Nakane P.K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review / A.G. Farr, P.K. Nakane // J. of Immunological Methods. 1981. no. 47. pp. 129–144.

10. Kardi V., Szegletes E. Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it / V. Kardi, E. Szegletes // Avian Pathology. 1996. no. 25. pp. 25–34.

11. Kisary J. Indirect Immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of chickens / J. Kisary // Avian Pathology. 1985. no. 14. p. 269.

12. Peter W. Parvovirusinfection bei Gänsen / W. Peter // Mh. Vet.-Med. 1985. Jg. 40. H. 19. pp. 63–68.

## Рецензенты:

Разбицкий В.М., д.вет.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства», г. Санкт-Петербург;

Бакулин В.А., д.вет.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 31.12.2014.