

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
птицеводства» Российской академии наук (ФНЦ «ВНИТИП» РАН) – филиал
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
птицеводства» (ВНИВИП)**

На правах рукописи



ДМИТРИЕВ КОНСТАНТИН ЮРЬЕВИЧ

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА 1 МЕТОДОМ
НЕПРЯМОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Трефилов Борис Борисович

Кандидат биологических наук, доцент
Никитина Нина Васильевна

Санкт-Петербург - 2020 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Вирусный гепатит утят (ВГУ) типа 1, распространение и причиняемый ущерб	9
1.2. Характеристика вируса гепатита утят типа 1	10
1.3. Симптомы и патология при вирусном гепатите утят типа 1	11
1.4. Иммунопрофилактика вирусного гепатита утят типа 1	15
1.5. Диагностика вирусного гепатита утят типа 1.....	19
1.6. Иммуноферментный анализ.....	26
1.7. Заключение по обзору литературы	31
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1. Материалы и методы исследований	32
2.2. Результаты собственных исследований	38
2.2.1. Получение иммуноспецифических компонентов для иммуноферментного анализа.....	38
2.2.1.1. Получение вирусосодержащего материала	38
2.2.1.2. Инактивация вируса гепатита утят аминоэтилэтиленимином	39
2.2.1.3. Получение очищенного антигена вируса гепатита утят типа 1.....	40
2.2.1.4. Получение специфической сыворотки крови к вирусу гепатита утят	41
2.2.1.5. Выделение иммуноглобулинов	42
2.2.1.6. Получение антивидовой сыворотки.....	43
2.2.1.7. Получение и контроль иммунопероксидазного конъюгата	43
2.2.2. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1	45
2.2.2.1. Определение оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов.....	45
2.2.2.1.1. Определение концентрации антигена	45
2.2.2.1.2. Определение рабочего разведения конъюгата	47

2.2.2.1.3. Определение времени и температуры иммобилизации антигена....	47
2.2.2.1.4. Определение температуры и времени инкубации сыворотки с иммобилизованным антигеном.....	48
2.2.2.1.5. Определение специфичности, разрабатываемой иммуноферментной тест-системы.....	50
2.2.2.1.6. Определение диагностического титра	51
2.2.2.2. Расчет титра антител по одному разведению	53
2.2.2.3. Оценка чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы	56
2.2.2.3.1. Оценка воспроизводимости результатов ИФА.....	57
2.2.2.3.2. Оценка стабильности тест-системы.....	58
2.2.3. Апробация иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1	60
2.2.3.1. Изучение динамики формирования антител у вакцинированных утят в лабораторных условиях.....	60
2.2.3.2. Изучение поствакцинального иммуногенеза у уток в производственных условиях	61
2.2.3.3. Изучение продолжительности материнского иммунитета против вирусного гепатита в производственных условиях.....	63
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	65
4. ВЫВОДЫ	74
4.1. Практические предложения	75
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	76
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	78
ПРИЛОЖЕНИЕ	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В условиях сосредоточения на ограниченной территории разновозрастных групп птицы в утководческих хозяйствах создается риск возникновения эпизоотии вирусного гепатита утят типа 1 за счет постоянного притока новых партий суточного молодняка.

Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) занимает одно из приоритетных мест по степени распространения в мире, с выделением в большинстве случаев пикорнавируса типа 1 [95, 99, 100, 130, 135]. Этот факт объясняется длительной персистенцией возбудителя в организме переболевшей птицы, его генетической вариабельностью, а также стационарным характером болезни [10, 49, 88], поскольку не представляется возможным разорвать эпизоотическую цепь в цикле развития возбудителя.

Вирусный гепатит утят типа 1 – высоко контагиозная, остропротекающая болезнь утят до 6-недельного возраста с преимущественным поражением печени [73, 89, 94, 119] и высокой смертностью до 95% утят [10, 24, 25, 31, 93, 95, 102, 144]. Болезнь часто протекает в ассоциации с вирусной и бактериальной инфекцией, поэтому основой успешной борьбы с болезнью является лабораторная диагностика [25, 99, 145].

Среди серологических методов для определения уровня антител в пробах сыворотки крови уток широко используют реакцию нейтрализации (РН), которая обладает высокой специфичностью. Однако данная реакция является длительной и методически трудоемкой и не всегда удобна для исследования большого количества проб [100, 120, 135, 146].

В настоящее время для контроля уровня иммунного ответа многие исследователи успешно используют метод ELISA [24, 25, 109, 122, 136, 151]. Данный метод обладает специфичностью, высокой чувствительностью и в сочетании с быстротой анализа дает ему неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами [13, 55]. Метод позволяет автоматизировать процессы постановки реакции и одновременно исследовать большое количество

проб при компьютерной обработке результатов.

Своевременная диагностика ВГУ-1 является важным условием купирования инфекции в первичном очаге, а, учитывая очевидную перспективность иммуноферментного анализа (ИФА), разработка высокочувствительного и специфического метода является актуальной.

Степень разработанности темы. Изменчивость возбудителя, его антигенная вариабельность, несвоевременная диагностика и несовершенная схема специфической профилактики болезни являются причиной сложной эпизоотической ситуации по вирусному гепатиту утят в утководческих хозяйствах промышленного типа [22, 75, 82, 92, 138].

В Российской Федерации для серологической диагностики ВГУ-1 применяют высокоспецифичную реакцию нейтрализации [24, 63, 64, 151]. Однако в связи с длительностью и трудоемкостью постановки она не отвечает требованиям современной диагностики.

Цели и задачи исследования. Цель исследований – разработка иммуноферментной тест-системы для выявления и определения уровня антител к антигену вируса гепатита утят типа 1.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить высокоочищенный антиген вируса гепатита утят из аллантоисной вирусосодержащей жидкости и вирусспецифическую сыворотку крови уток;
- на основе очищенных IgG уток, выделенных из нормальной сыворотки крови, получить антивидовой иммунопероксидазный конъюгат;
- оптимизировать параметры проведения ИФА по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам тест-системы;
- дать оценку чувствительности, специфичности и диагностической ценности иммуноферментной тест-системы;
- провести апробацию диагностической тест-системы и оценить возможность ее применения;

– разработать Методические положения по определению специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа.

Научная новизна. Впервые в РФ разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к антигену ВГУ-1. Отработан метод концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 из аллантоисной вирусосодержащей жидкости, разработана схема получения высокоактивной специфической и антивидовой сыворотки для ИФА. Получен активный, специфичный и стабильный при хранении в жидком состоянии антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток. Оптимизированы параметры проведения иммуноферментного анализа по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам тест-системы. Проведены сравнительные исследования по определению специфических антител в сыворотке крови в иммуноферментном анализе и в реакции нейтрализации. Установлена высокая корреляция их значений ($r = -1,0$).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований позволили оценить высокую чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы при изучении динамики формирования антител у вакцинированных утят в экспериментальных условиях и поствакцинального иммуногенеза у уток в производственных условиях.

Разработаны Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» от 25.01.2016 г. и Методические положения «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28.08.2018 г. Получен патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU. Разработанные Методические положения рекомендованы для ветеринарных врачей региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Методология и методы исследования. Методология работы включала анализ научной литературы, поисковые исследования, основанные на стандартных процедурах с использованием различных материалов и животных. В работе использовали вирусологические, микробиологические, биохимические, физико-химические, серологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

- иммуноферментная тест-система для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1 в пробах сыворотки крови по одному разведению;
- сравнительная оценка иммуноферментной тест-системы и реакции нейтрализации;
- применение разработанной тест-системы в лабораторных и производственных условиях.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, научно обоснованы, достоверны и вытекают из результатов собственных исследований. Исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных методов исследований. Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2016-2018), Международной научно-практической конференции «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования» (Москва, 2017), Международной научно-практической конференции: «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке» (Смоленск, 2018), Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (г. Екатеринбург, 2018), научно-практической конференции «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 9 научных статьях, из них 2 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденный ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 106 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы, результаты исследований; обсуждение результатов; выводы; практические предложения; список литературы; список сокращений и приложение. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами, 6 рисунками и 3 формулами. Список литературы включает 151 источник, из которых 82 - зарубежные.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирусный гепатит утят типа 1, распространение и ущерб

Вирусный гепатит утят типа 1 (инфекционный гепатит уток) – высоко контагиозная болезнь, с преимущественным поражением печени, высокой смертностью утят до 4-недельного возраста [24, 25, 82, 129], и латентная инфекция уток [49, 88, 95, 100].

В 1949 году P.P. Levine и J. Fabricant выделили возбудителя болезни, сопровождавшейся высокой смертностью среди белых пекинских уток на острове Лонг-Айленд в США. Позднее вирусный гепатит утят типа 1 получил распространение в Англии, Германии, Канаде, Японии и в других странах с развитым птицеводством [101]. В 1963 году болезнь была зарегистрирована в Китае [90], а в 1984 году возбудитель был идентифицирован как вирус гепатита утят типа 1 [83, 90, 105]. В последние годы ВГУ-1 наносит существенный экономический ущерб промышленному разведению уток в Китае [92, 138, 150]. В СССР вирусный гепатит утят был впервые зарегистрирован в 1958 году на территории Белгородской и Харьковской областей [10, 47, 48, 49].

В настоящее время вирусный гепатит утят регистрируют во всех регионах, где занимаются разведением уток. Наибольшее число случаев возникновения болезни обусловлено гепатовирусом уток [10, 25, 31, 95, 100, 130, 146].

Большой экономический ущерб вирусный гепатит утят типа 1 наносит промышленным утководческим хозяйствам вследствие массовой гибели утят 1-30 – суточного возраста и падения продуктивности уток. Смертность утят может достигать 30-95%. В результате отставания в росте и развитии у переболевших утят снижаются показатели мясной продуктивности. Ущерб от ВГУ-1 также включает затраты на проведение ветеринарно-санитарных и противоэпизоотических мероприятий при ликвидации болезни. Экономические потери возрастают, когда болезнь приобретает стационарный характер [10, 24, 25, 31, 49, 144].

1.2. Характеристика вируса гепатита утят типа 1

На основании антигенных различий возбудитель вирусного гепатита утят подразделяется на три типа [80, 102, 108]: вирус типа 1 – классический серотип, получивший повсеместное распространение [130], вирусы типа 2 и типа 3, выделенные в Англии и в США соответственно [76, 102, 103].

Вирус гепатита утят типа 1 репродуцируется в клеточных культурах, в 12-13-суточных эмбрионах уток, 7-9-суточных эмбрионах кур, а также в эмбрионах перепелок [72, 147]. Вирус типа 2 хорошо реплицируется в утиных эмбрионах и организме уток, в культуре клеток печени и почек утенка. В отличие от вируса типа 1, его репродукция в культуре почек цыпленка и перепелки ограничена. Кроме этого, вирус типа 2 не репродуцируется в эмбрионах кур. Утята, иммунные к вирусу гепатита типа 1, заболевают при заражении вирусом гепатита типа 3. Особенности репродукции свидетельствуют о наличии антигенных различий у вирусов гепатита утят.

Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Picornaviridae*, роду *Avihepatovirus*. Вирусный гепатит уток типа 1 (DHV-1) имеет и другие названия - инфекционный гепатит уток, вирусный гепатит утят, Duck virus hepatitis, Duck hepatitis type 1 [82, 83, 99, 116, 129, 130]. Различают три различных генотипа, называемых – вирус гепатита уток А типа 1, 2 и 3 [135, 146].

Международный Комитет по Таксономии вирусов (Sixth ICTV Report) создал новый род *Avihepatovirus* в семействе *Picornaviridae*, который включает три серотипа вируса гепатита утят типа 1, и обозначил их как DHAV-1, DHAV-2 и DHAV-3 (Resolution adopted by the world assembly of delegates of the oie in May, 2010) [76].

Вирус гепатита утят типа 1 имеет сферическую форму, размер 20-40 нм. А.М. Erfan и С.Ф. Li [80, 102] в тонких срезах печени при исследовании методом электронной микроскопии наблюдали частицы размером 30 нм, а позднее методом фильтрации подтвердили, что размер вируса не менее 50 нм.

Вирусы гепатита утят типа 2 и 3 (DHV-2 и DHV-3) были классифицированы как семейство *Aviastrovirus* уток и переименованы в *Astrovirus* типа 1 и 2 соответственно [100, 127]. Они отличаются от вируса гепатита уток В, относящегося к роду *Avihepadnavirus*, не вызывающего существенного клинического заболевания у уток [146].

1.3. Симптомы и патология у птиц при вирусном гепатите типа 1

В большинстве случаев отмечаются сверхострая и острая формы течения болезни [47, 125, 129]. Также описано хроническое течение и атипичная форма вирусного гепатита утят типа 1. При естественном заражении инкубационный период болезни варьирует от 1 до 5 суток. При экспериментальном заражении инкубационный период составляет от 1 до 8 суток. Инкубационный период сокращается при пероральном, интраназальном и аэрогенном заражении по сравнению с парентеральным методом введения [23, 24, 25, 47, 49].

В неблагополучных утководческих хозяйствах острое течение болезни характеризуется непродолжительным инкубационным периодом, который составляет от 1 до 7 суток, реже - до 12-13 суток и очень короткой продолжительностью болезни в пределах 1-3 часов, реже - 4-5 часов. Вначале больные утята держатся отдельно от остальных особей выводка. Спустя короткое время они перестают двигаться и сидят с полузакрытыми глазами. Утята падают набок, судорожно дергают нижними конечностями и гибнут, откинув голову назад (опистотонус). Гибель наступает приблизительно через час после появления симптомов.

Заболеваемость достигает 100%, а смертность у молодых утят, инфицированных вирусом гепатита уток типа 1, варьирует. У некоторых утят моложе 1 недели смертность может достигать 95%. Среди утят 1-3 – недельного возраста — 50% и менее. У 4-5 – недельных утят уровень заболеваемости и смертности низкие или отсутствуют [49, 95, 100].

Полное выздоровление отмечается редко. Переболевшие утята остаются вирусоносителями. При хроническом течении болезни утята отстают в росте и развитии [24, 47, 49, 123].

Хроническое течение болезни чаще наблюдается у утят 3-4 – недельного возраста. Продолжительность болезни составляет 10-20 суток и более и проявляется пингвиноподобной походкой, малоподвижностью, диареей, опуханием суставов. Патологоанатомические признаки при хроническом течении болезни характеризуются увеличением печени и селезенки с очагами некроза, периаартритами [24].

При субклиническом течении болезнь у утят протекает бессимптомно [56].

Выжившие утята после выздоровления практически не отличаются от здоровых птиц. Однако из образцов патологического материала (печень, головной мозг), полученных от переболевших утят, можно изолировать вирус, а в образцах сыворотки крови выявить специфические антитела.

Вирусный гепатит утят часто протекает в ассоциации с болезнями вирусной, бактериальной и грибковой этиологии, таких как: грипп, сальмонеллез, микоплазмоз, колибактериоз, аспергиллез. При этом ведущую роль в патогенезе ассоциированных инфекций играет возбудитель вирусного гепатита утят. Результаты исследований И.И. Паникар и А.Т. Налеза [47] показывают, что в Украине ВГУ-1 в большинстве случаев характеризуется ассоциированным течением с сальмонеллезом или аспергиллезом, реже – с колибактериозом. Гибель утят в разных группах составляла от 15,4 до 90%. При этом признаки сальмонеллеза выявляли в количестве от 10 до 50% случаев, аспергиллеза – от 10 до 60% случаев. В одном случае признаки аспергиллеза были установлены у 100% особей.

Характерными патологоанатомическими изменениями для вирусного гепатита утят являются изменения в печени. Печень обычно увеличена, дряблой консистенции, охряно-желтого или серовато-глинистого цвета. По всей поверхности печени отмечаются множественные кровоизлияния различной формы: от мелких точечных кровоизлияний до экхимозных кровотечений,

проникающих в толщу паренхимы. Желчный пузырь переполнен желчью, в связи с чем участки печени, прилегающие к желчному пузырю, приобретают темно-зеленоватую окраску.

Кроме этого, у павших утят можно обнаружить геморрагический асцит, отек легких, перикардит и фибринозный аэросаккулит. В некоторых случаях отмечается кровенаполнение почек. При исследовании головного мозга выявляют сильную инъекцию сосудов мозговых оболочек и наличие мелких точечных кровоизлияний. Изменения в селезенке нехарактерны. Цвет селезенки может варьировать от бледно-розового до темно-красного. Селезенка может быть увеличена, иногда – быть бугристой или крапчатой. Сердечная мышца в состоянии дегенерации, бледного цвета, отмечаются застойные явления и серозный перикардит. У павших утят часто отмечается катаральное воспаление кишечника, в большинстве случаев - в результате осложнений, вызванных бактериальной флорой, прежде всего сальмонеллами.

Указанные патологоанатомические признаки были неоднократно воспроизведены на утятах в экспериментальных условиях. При этом результатами патоморфологических исследований подтверждается, что при вирусном гепатите утят типа 1 основные патологические изменения происходят в печени и головном мозге. В интервале между 1–18 часами в гепатоцитах можно обнаружить вирусоподобные частицы. Через 24 часа после заражения в печени наблюдаются первичные изменения в виде некробиоза и апоптоза гепатоцитов, иногда отмечаются обширные некротические очаги, геморрагии [87].

В дальнейшем внутри долек и около синусоидных капилляров можно обнаружить мелкоочаговые пролифераты и распад пораженных клеток. Периваскулярная инфильтрация по ходу кровеносных сосудов и желчных протоков представлена гранулоцитами, лимфоцитами и плазматическими клетками. Начало регенеративных процессов в паренхиме печени соответствует началу периода выздоровления [57, 58, 143].

Патоморфологические изменения в селезенке утят можно обнаружить уже через 6 часов после инфицирования, через 24 часа после инфицирования выявляются некротические изменения в ядрах и цитоплазме спленоцитов [47,58].

Патоморфологические изменения в фабрициевой сумке представлены гиперемией, повышенной инфильтрацией серозным экссудатом, пролиферацией плазматических клеток и гемоцитобластов, которая усиливается спустя 3 суток после инфицирования в связи с иммунологической реакцией на вирусный антиген. При увеличении продолжительности инфекционного процесса на 2-3 недели в фабрициевой сумке и в селезенке происходит увеличение в 3-4 раза количества плазматических клеток. В тимусе каких-либо существенных изменений не наблюдается. Характер изменений в головном мозге соответствует серозному энцефалиту [47, 58].

У инфицированных вирусом гепатита эмбрионов, замерших на 20-25 сутки инкубации, отмечаются кровенаполнение сосудов желточного мешка, застойные явления и отечность подкожной клетчатки в области головы, шеи и спины, реже - конечностей, нередко - массовые петехии. Патологические изменения у павших эмбрионов через 15 суток инкубации характеризуются гиперемией сосудов желточного мешка и аллантаоиса, наличием в аллантаоисной полости прозрачной тягучей, иногда - опалесцирующей жидкости зеленоватого цвета. У эмбрионов часто отмечается такой признак как «карликовость», а в некоторых случаях - атрофия мышц конечностей. Печень увеличена, неравномерно окрашена. Цвет печени варьирует от светло-коричневого до темно-зеленого цвета. Чередование пораженных и нормальных участков паренхимы придает печени мраморный вид. На поверхности печени выявляются некротические очаги [45, 47, 58].

При гистологическом исследовании срезов печени погибших эмбрионов констатируют дегенерацию клеток печени, очаговые некрозы, лимфоидную инфильтрацию и пролиферацию гранулоцитов внутри долек и вблизи синусоидных капилляров, а также гиперплазию желчных протоков [34, 45, 62, 81].

1.4. Иммунопрофилактика вирусного гепатита утят типа 1

Иммунная система представляет собой совокупность лимфоидной ткани, структурно-функциональная организация которой обеспечивает выполнение ряда важных функций по поддержанию гомеостаза внутренней среды организма. Функционирование иммунной системы тесно связано с системой кроветворения, пищеварительной, нервной, эндокринной и другими системами. Иммунная система птиц отличается от иммунной системы млекопитающих отсутствием выраженной системы лимфатических узлов и сосудов. Однако, как и у млекопитающих, лимфоидные органы птиц по степени функциональной активности и значимости при формировании иммунных реакций условно подразделяются на первичные, или центральные, и вторичные, или периферические.

К первичным, или центральным, лимфоидным органам, являющимся источником стволовых клеток и не дифференцированных лимфоцитов, относятся эмбриональный желточный мешок, костный мозг, тимус и фабрициева сумка.

Периферические лимфоидные органы представлены селезёнкой, лимфоидными узелками слепых отростков и лимфоидными образованиями кишечника, гардировой (слёзной) железой, фарингиальными скоплениями лимфоидных элементов в подслизистой оболочке респираторного тракта. Лимфоидные образования также расположены в слёзном протоке и протоках латеральных носовых желёз. Они представлены в тканях либо в форме центров скопления средних и больших лимфоцитов округлой формы, либо в форме диффузной инфильтрации тканей малыми лимфоцитами. Специфические участки скопления лимфоидной ткани или клеток присутствуют в подслизистом слое пищеварительного тракта, а также в печени, коже, лёгких, поджелудочной железе, других органах и тканях.

Особая роль в устойчивости организма к различным патогенам принадлежит макрофагам. Макрофаги являются первичными факторами неспецифической защиты. Они способны захватывать и переваривать

микроорганизмы, антигены, иммунные комплексы. Макрофаги выделяют растворимые медиаторные субстанции – монокины, которые являются активаторами Т-лимфоцитов. После того, как антиген, передаваемый от макрофага Т-лимфоциту, проходит идентификацию клетками-реципиентами, начинается формирование специфического иммунного ответа.

Процесс формирования клеточного иммунитета представляет собой ряд сложных процессов, которые включают активизацию клеточных взаимодействий многих компонентов, таких как: специфические рецепторы лимфоцитов, главный комплекс гистосовместимости, дендрирующие лимфофолликулы, Т - и В - клетки, медиаторы иммунитета (лимфокины и монокины). Сенсibilизированные Т-лимфоциты, способные синтезировать и выделять медиаторы, а также участвующие в регуляции синтеза антител, играют решающую роль как в реакциях клеточного иммунитета, так и в иммунологических реакциях организма в целом. Взаимодействие всех этих элементов приводит к элиминации антигена из организма [26].

Важную роль в формировании местного клеточного иммунитета играют иммуноглобулины класса А (IgA). IgA фиксируются на клетках ресничного эпителия респираторного тракта и на эпителиальных клетках пищеварительного тракта, тем самым препятствуют проникновению вирусов и бактерий через эпителиальные барьеры. Неспецифическая резистентность и специфический иммунитет определяют состояние иммунной системы и, соответственно, общую реактивность организма.

Иммунная система суточных утят зрелая лишь отчасти и потому неспособна обеспечивать полную защиту от возбудителей инфекционных болезней. Адаптивные иммунные реакции развиваются лишь в течение первых нескольких недель после вылупления, поэтому передача материнских антител помогает защищать потомство. Из желточного мешка антитела поступают в кровотоки эмбриона и вылупившегося утенка. Этот феномен и используется в стратегиях вакцинации птиц против вирусных болезней в промышленном птицеводстве. Вакцинация молодняка птиц перед яйцекладкой обеспечивает защитный уровень

антител в течение периода продуктивности и передачу материнских антител потомству.

Особую роль в профилактике инфекционных болезней молодняка птиц играет пассивный иммунитет, обусловленный материнскими антителами. Так, утята, получившие трансовариально материнские антитела от иммунных родителей, защищены от полевого вируса. Невосприимчивость молодняка старше 6 – недельного возраста к вирусу гепатита утят обусловлена возрастной устойчивостью к данному патогену. В крови переболевшего молодняка циркулируют постинфекционные вируснейтрализующие антитела, которые обеспечивают устойчивость к повторному инфицированию [128].

Для создания пассивного иммунитета утятам можно вводить сыворотку крови от переболевших уток [45, 49].

У молодняка, вакцинированного против вирусного гепатита утят типа 1, вируснейтрализующие антитела появляются в сыворотке крови на 4-е сутки после иммунизации. Поствакцинальный иммунный ответ достигает пика на 7 – 9 сутки [4, 31, 48, 49, 60, 70, 91, 142].

Исследования по разработке вирусвакцины из аттенуированных штаммов вируса гепатита утят были проведены И.И. Паникар [48, 49, 96, 126], а результаты о производственных испытаниях вирусвакцины сообщили И.Ю. Безрукавая и Г.В. Малиновская [1, 35].

Предложенная вирусвакцина из аттенуированного штамма вируса FC64 индуцировала выработку специфических антител в высоких титрах у утят, которые были устойчивы к заражению вирулентным штаммом SH [124, 125, 126].

Многими исследователями установлено стимулирующее действие тиосульфата натрия на формирование поствакцинального иммунитета при вирусном гепатите утят типа 1 [16, 28, 29, 30, 50, 51, 52, 77].

R.E. Cough и D. Spackman [86] сообщили, что эффективность вакцинации утят может быть обеспечена посредством введения трех доз инактивированной масляно-эмульсионной вакцины на основе вируса гепатита утят типа 1. Эти

авторы также отметили, что можно проводить вакцинацию живой вакциной на основе вируса гепатита утят типа 1 в 2-3 – суточном возрасте с последующей ревакцинацией инактивированной вакциной на 22 неделе. При такой схеме вакцина индуцирует выработку более высокого уровня титров вируснейтрализующих антител, чем при трехкратном введении инактивированной вакцины. Авторы установили, что при изготовлении инактивированной вакцины из вируса, культивированного в утиных эмбрионах, титры антител выше, чем при использовании вируса, культивированного в куриных эмбрионах.

P.R. Woolcock и G. Fabricant [141, 143] испытали инактивированную вакцину против ВГУ-1 на маточном поголовье и установили, что при иммунизации утят 12 – недельного возраста аттенуированной вакциной и ревакцинации инактивированной вакциной в 18 – недельном возрасте происходит выработка антител, уровень которых в 16 раз превышает уровень титров антител, полученных при вакцинации только вирусвакциной. Такой уровень антител оказался достаточным для защиты утят в течение 8 месяцев продуктивного периода. Инактивированные вакцины, приготовленные из культурального или из эмбрионального вируса гепатита утят типа 1, оказались равно эффективными. Авторы разработали различные схемы иммунизации с использованием инактивированного вируса. Контроль вируснейтрализующих антител в сыворотке крови утят провели в реакции нейтрализации с применением первичных клеток печени утиного эмбриона. Только у 7 (11%) утят были обнаружены антитела в титрах $6 \log_2$ и выше. Это рассматривается как минимальный защитный уровень. Такой уровень антител был только у птиц, подвергшихся многократной вакцинации инактивированной вакциной [142].

R.E. Gough и D. Spackman [86] также показали, что комбинированное применение живой и инактивированной вакцин вызывает высокий иммунный ответ.

В последнее десятилетие вирусный гепатит А утят - наиболее опасная болезнь в Китае. Быстрая мутация и широкое распространение вируса гепатита А типа 1 и типа 3 уток (DHAV-1 и DHAV-3) приводят к огромным экономическим

потерям в утководческих хозяйствах.

M. Kang et. al. [97] разработали двухвалентную аттенуированную вакцину против DHAHV-1 и DHAHV-3 и сообщили о высокой эффективности и безопасности вакцины. В суточном возрасте утят вакцинировали двухвалентной вакциной посредством внутримышечной инъекции. Иммунизированные утята были устойчивыми к заражению вирулентными штаммами DHAHV-1 и DHAHV-3 через 2 или 3 суток после вакцинации. Более того, у утят регистрировали высокий гуморальный иммунный ответ, который достигал пика через 3 недели и сохранялся в течение 6 недель после вакцинации.

F. Yin [148] предложил для борьбы с инфекциями DHAHV-1 и DHAHV-3 двухвалентную инактивированную вакцину. Вакцина была эффективной и надежной, вируснейтрализующие антитела были обнаружены на 7-е сутки, а уровень иммунной защиты достигал с 14-х по 21-е сутки 90-100%. Более того, невосприимчивость к полевому вирусу у утят длилась более пяти недель. Авторы рекомендуют новую вакцину для профилактики и контроля за распространением DHAHV.

1.5. Диагностика вирусного гепатита утят типа 1

Диагностика вирусного гепатита утят проводится комплексно на основании результатов анализа эпизоотологической ситуации, клинических симптомов болезни, патоморфологических изменений, вирусологических исследований с использованием биопробы на утиных или куриных эмбрионах и утятах.

В первую очередь необходимо учитывать внезапное появление клинических признаков и стремительное распространение инфекции среди утят 4-недельного возраста, а также высокую смертность среди утят 1-10 – суточного возраста в течение 2-3 часов после появления первых признаков болезни.

Основное внимание при проведении патологоанатомического исследования в случае острого течения болезни обращают на наличие геморрагического и некротического гепатита, гломерулонефрита, серозного энцефалита и

миокардиодистрофии. При подостром течении болезни характерным признаком является катаральный энтерит. У утят до 3 – недельного возраста патогномичным признаком является наличие геморрагий различной формы и интенсивности на всей поверхности печени.

Для проведения вирусологических исследований отбирают кусочки пораженных органов: печени, селезенки, почек, головного мозга, а также кровь. Из отобранных органов и тканей готовят гомогенат. Надосадочную жидкость вводят в аллантаисную полость 8-9 – суточных куриных или 10-12 – суточных утиных эмбрионов. Зараженные эмбрионы погибают через 2-4 суток после инфицирования. При вскрытии у эмбрионов находят отек подкожной клетчатки с геморрагиями, некротический гепатит и нефрозо-нефрит. Поражения у утиных эмбрионов характеризуются более ранним замиранием и более выраженными поражениями по сравнению с куриными эмбрионами. При проведении повторных пассажей перечисленные изменения становятся более яркими. Для эмбрионов, замерших на 5-8 сутки после инфицирования, характерным признаком является «карликовость» [49, 87].

Вирусемию устанавливают с использованием метода прямого выделения возбудителя из крови, а также методом предварительного расщепления вирус-антительного комплекса [49].

Вируснейтрализующие свойства сыворотки крови, полученной от переболевших или гипериммунизированных птиц, позволяют использовать ее в качестве референтной сыворотки в реакции нейтрализации для идентификации изолятов и титрации штаммов вируса.

Диагноз на вирусный гепатит утят может быть поставлен в короткие сроки (в течение 3 часов) и с высокой точностью путем индикации вирусного антигена методом флюоресцирующих антител (МФА) [24].

Для постановки биопробы также используют 1-3 – суточных утят из благополучных по вирусному гепатиту утководческих хозяйств. Утятам иннокулируют суспензию, приготовленную из тканей печени и головного мозга. Суспензию предварительно деконтаминируют от бактериальной флоры

антибиотиками. Вирусосодержащий материал утятам вводят интраназально по 2-3 капли в каждое носовое отверстие или внутримышечно в дозе 0,5 см³. Через 1-5 суток, реже - позднее, у утят наблюдаются характерные для ВГУ-1 клинические признаки.

Ретроспективную диагностику с целью обнаружения специфических антител в сыворотке крови уток проводят путем постановки РН с эталонным штаммом вируса гепатита [86, 125].

P. R. Woolcock et al. [140] впервые описали реакцию ингибирования бляшек вируснейтрализующими антителами. Этот метод оказался гораздо более чувствительным, чем реакция нейтрализации вируса в эмбрионах.

Позднее P. R. Woolcock [141] сообщил о результатах реакции ингибирования бляшек в культуре клеток печени утиного эмбриона. При этом автор показал, что антисыворотка не нейтрализовала вирус гепатита утят типа 2 и 3. Автор также отметил, что 50-процентная вирусная нейтрализация 1:64 в куриных эмбрионах эквивалентна 50-процентной вирусной нейтрализации 1:3200 и более в клетках печени утиного эмбриона.

Е. F. Kaleta [96] описал реакцию микронейтрализации при вирусном гепатите утят типа 1 в культуре клеток почек утиного эмбриона. Автор утверждает, что этот метод практичнее, быстрее и экономичнее по сравнению с другими альтернативными методами. В то же время автор считает, что метод ингибирования бляшек является более чувствительным. P. R. Woolcock [141] адаптировал метод микронейтрализации для контроля вакцины в лабораторных условиях.

Данные методы диагностики широко применяются в лабораторной практике благодаря простоте их исполнения и доступностью. Несмотря на это, данные методы имеют ряд недостатков. По совокупности таких критериев, как чувствительность, специфичность и быстрота получения окончательного результата, перечисленные выше методы не являются оптимальными.

В настоящее время для выявления антител при вирусном гепатите типа 1 в основном применяют метод иммуноферментного анализа. X. Zhao et al. [151]

провел сравнение твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), реакции нейтрализации вируса и реакции преципитации в агаровом геле для определения антител к вирусу гепатита утят типа 1 в сыворотке крови. Автор сообщил о схожести иммуноферментного анализа и реакции нейтрализации вируса по степени чувствительности. В то же время автор не провел количественный анализ своих результатов в реакции нейтрализации вируса и в иммуноферментном анализе. Реакция преципитации оказалась значительно менее чувствительной [151].

В. Бондаренко [6] разработал иммуноферментный метод выявления специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 в сыворотке крови и показал его высокую чувствительность и специфичность.

S. Mao et al. [111], учитывая важность гуморального иммунного ответа при DHAV-1, разработали непрямые методы ИФА для выявления сывороточных Ig G, Ig M и Ig A. Авторы показали, что корреляция между непрямым иммуноферментным анализом и реакцией нейтрализации составила 95,2% для Ig G и Ig A, и 75% для Ig M. Авторы считают, что новый непрямой ИФА (I-ELISA) оказался потенциально удобным методом для изучения состояния гуморального иммунного ответа на DHAV-1.

В последние годы разработаны косвенные варианты ИФА с использованием VP1 и VP3 белков DHAV-1 в качестве сорбирующих антигенов для обнаружения вирусспецифических антител [104, 109, 122]. Этот подход в разработке иммуноферментного анализа более быстрый, простой и практичный, чем классический [151].

M. Liu et al. [109] разработали иммуноферментную тест-систему (VP1-ELISA) для обнаружения антител к вирусу гепатита утят типа 1, используя клонированный и экспрессированный белок VP1 в *Escherichia coli* в качестве сорбирующего антигена. По сравнению с реакцией нейтрализации специфичность и чувствительность VP1-ELISA составила 92,5% и 96,7%. VP1-ELISA не реагирует с анти-сывороткой на другие вирусные инфекции уток, так как этот белок специфичен для распознавания антител к DHAV-1. Авторы считают, что

VP1-ELISA является высокочувствительным и специфическим тестом, который может быть использован для скрининга на инфекцию, вызываемую DHAV-1, и контроля титров антител к вирусу гепатита утят типа 1.

Y. Shen et al. [122] впервые разработал непрямой метод иммуноферментного анализа на основе рекомбинантного белка VP3 вируса гепатита утят А типа 1 (DHAV-1). Авторы установили, что новый метод непрямого иммуноферментного анализа способен одновременно обнаруживать антитела к DHAV-1 и DHAV-3. Результаты оценки специфичности показали, что к другим распространенным патогенам, к которым чувствительны утки, не было обнаружено перекрестной реакции, за исключением вируса гепатита утят А 3-го серотипа (DHAV-3), автор полагает, что это может быть общим подходом для одновременного обнаружения антител к DHAV-1 и DHAV-3. Коэффициенты вариации (CVs) для всех тестируемых образцов были ниже 10%. Корреляция между непрямым ИФА на основе субъединицы VP3 DHAV-1 и на основе целой частицы DHAV-1 составляла 96%. Эти результаты показывают, что метод непрямого иммуноферментного анализа на основе VP3 обладает высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью, и столь же эффективен, как метод непрямого иммуноферментного анализа на основе вируса гепатита утят типа 1 для серологических исследований. Автор считает, что это может быть удобным и новым методом обнаружения антител к DHAV-1 и эпидемиологического надзора за распространением вирусного гепатита утят.

Благодаря развитию иммунологии и молекулярной биологии, в последние годы для лабораторной диагностики были разработаны новые тесты. К таким тестам относится полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая в настоящее время широко используется для индикации и идентификации инфекции DHAV-1 [71, 82, 99, 100].

В Китае вирус гепатита утят ассоциируется с тремя типами вирусов: DHAV-1, DHAV-3 и DAsV-1 [76, 78, 82, 92, 135, 149]. Утята, инфицированные любым из этих трех вирусов, могут проявлять одинаковые симптомы, такие как короткий инкубационный период, внезапное начало, высокая смертность, опистотонус и

увеличенная печень с выраженными кровоизлияниями. Предполагаемый диагноз вирусный гепатит утят типа 1 может быть поставлен на основе клинических симптомов и патологоанатомической картины, но трудно определить, какой тип (или типы) вируса вызывает инфекцию. В 2008 году была разработана мультиплексная полимеразно-цепная реакция для дифференциации между штаммами DHAV-1 и DHAV-3 [100], а в последнее время исследователи разработали улучшенный дуплексный метод - полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-PCR), который облегчает быстрое и экономичное лабораторное обнаружение смешанных инфекций, вызванных различными штаммами DHAV-1 и DHAV-3 у утят [76]. Однако ни один из этих мультиплексных ПЦР-анализов не мог обнаружить DAstV-1.

L. Chen et al. [75] впервые разработали мультиплексный анализ - полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией, который может обнаруживать одновременно DHAV-1, DHAV-3 и DAstV-1 в клинических образцах. Авторы показали, что мультиплексный метод RT-PCR является специфическим для вируса вирусного гепатита утят и не выявляет геномную ДНК или РНК других утиных патогенов. Его предел обнаружения оценивается как 10 пг общей РНК ткани печени, или 10² копии каждой вирусной РНК DHAV-1, DHAV-3 и DAstV-1. Кроме того, дифференциальная диагностика DHAV-1, DHAV-3 и DAstV-1 может быть получена в одной реакции в течение нескольких часов, тогда как дифференцировка трех вирусов, за которыми следуют тесты с перекрестной нейтрализацией, занимает несколько дней. Таким образом, мультиплексная ПЦР-реакция представляет собой быстрый, эффективный и практичный метод для дифференциальной диагностики смешанных инфекций с тремя типами вирусов ВГУ и для эпизоотологического надзора за вирусным гепатитом утят типа 1.

Все молекулярно-биологические методы диагностики вирусного гепатита утят типа 1, которые широко используются в настоящее время, постоянно пополняются новыми исследованиями. Так, в связи с постоянно меняющейся эпизоотической ситуацией в Юго-Восточной Азии, связанной с циркуляцией

вирусов гепатита утят DHAV-1 и DHAV-3, S. L. Lin et al. [107] разработали дуплексный анализ ПЦР в режиме реального времени для одновременного количественного определения DHAV-1 и DHAV-3.

Y. Wang et al. [137] разработали мультиплексный метод ПЦР для быстрого обнаружения вируса гепатита утят А типа 1, вируса чумы утки, парвовируса и реовируса мускусной утки и вируса птичьего гриппа утки H9N2. Авторы установили, что мультиплексная ПЦР-система может быть использована для обнаружения вирусных нуклеиновых кислот в утиных эмбрионах, зараженных шестью распространенными вирусами и в клинических образцах. Авторы считают, что разработанный мультиплексный метод ПЦР может выполнять специфическое, чувствительное и высокопроизводительное обнаружение шести утиных вирусов и может применяться для клинической идентификации и диагностики вирусной инфекции уток [106].

Следует отметить, что имеющиеся молекулярно-биологические методы не могут дифференцировать вакцинный штамм вируса DHAV-1 от полевого вируса. Только K.P. Li et al. [106] удалось разработать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени (Real-time RT-PCR) и анализ с высокой разрешающей способностью (HRM) для быстрого обнаружения и дифференциации вакцинного штамма вируса DHAV-1 от полевого вируса. Этот анализ очень специфичен для DHAV-1, а предел обнаружения составляет около 100 копий вирусной РНК. Авторы показали, что вирус гепатита А типа 1 может быть обнаружен в фекальных образцах уже через 6 часов после инфицирования утят вирусом гепатита типа 1. Таким образом, авторы считают, что разработанный анализ Real-time RT-PCR и HRM, может быть полезен для диагностики и контроля за распространением инфекции DHAV-1.

1.6. Иммуноферментный анализ

Методы иммуноферментного анализа в диагностике инфекционных болезней получили широкое распространение. В отличие от классических

методов, в ИФА для определения иммунного комплекса используется молекула фермента – функционально активная биологическая молекула. Данная особенность определяет высокую чувствительность метода [21]. Чувствительность иммуноферментного анализа при обнаружении веществ очень высока, вплоть до 10-21 молей в образце [17, 53, 68].

Разработка иммуноферментных методов началось с момента, когда биохимики начали ковалентно соединять молекулы ферментов с молекулами иммуноглобулинов, что и определяет большое количество вариантов этого метода.

Конкурентный метод иммуноферментного анализа был разработан E. Engvall и P. Perlmann [79] и позднее B.K. Van Weeman и A.H.W.M. Schuurs [131]. В ходе иммунной реакции анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментом, конкурируют за центры специфического связывания. Чем больше исследуемого антигена содержит раствор, тем меньше количество связывающегося стандартного меченого антигена. Анализ такого типа часто используется для определения антигенов, присутствующих в относительно высоких концентрациях, или гормонов, низкомолекулярных белков, которые имеют только один антигенсвязывающий центр [21].

Методы этой категории просты в исполнении, но не нашли широкого применения в биологии [21].

Неконкурентные методы ИФА в последние годы особенно широко применяются в биологии и вирусологии [67]. Предложено большое количество различных модификаций ИФА, характерной особенностью которых является то, что один из компонентов иммунного комплекса иммобилизируют на твердом носителе.

«Сэндвич» - метод определения антигенов является наиболее простым и широко распространённым. Метод был разработан в 1975 г. [132]. Ферментативная активность носителя пропорциональна концентрации определяемого антигена. Метод обладает специфичностью и высокой чувствительностью по сравнению с другими вариантами ИФА. В настоящее время иммуноферментные тест-системы разработаны и широко применяются, в том

числе в производственных условиях, для диагностики многих вирусных болезней животных [27, 36, 42, 43].

Непрямой «сэндвич» - вариант ИФА используется для определения антигенов, но требует меченых ферментом антивидовых антител. Чувствительность непрямого «сэндвич» - варианта иммуноферментного анализа идентична чувствительности прямого варианта [21], а в некоторых случаях превосходит его в 2-4 раза.

Прямой метод иммуноферментного анализа был разработан D.E. Vorde et al. [133] для выявления антител и заимствован из радиоиммунного анализа (РИА) [69]. Достоинством метода является универсальность конъюгата, который может быть применен для обнаружения различных антигенов. Метод специфичен и достаточно высокочувствителен [21].

Твердофазный метод иммуноферментного анализа для выявления антител был разработан в начале 70-х гг. К иммобилизованному антигену добавляют исследуемую сыворотку и после удаления не связавшихся компонентов проводят выявление специфических иммунокомплексов с помощью меченых ферментом антивидовых антител [79].

Построение иммуноферментных тест-систем для серологической диагностики вирусных болезней проводится аналогичным образом. Для этого готовится иммуносорбент (антиген, сорбированный на твердом носителе), с которым контактируют выявляемые антитела. Иммунный комплекс обычно определяется с помощью антивидовых конъюгатов. Антиген иммобилизуют на твердый носитель прямой сорбцией [61] или за счет ковалентной связи, а для предотвращения неспецифической адсорбции конъюгата носитель обрабатывают раствором альбумина [40].

Иммуноферментные методы при серологической диагностике болезней вирусной природы отличаются многими параметрами, в первую очередь - твердым носителем, на котором иммобилизуются антигены или антитела. В настоящее время наиболее часто применяется полистирол и поливинилхлорид в виде плоскодонных плашек. Применение плашек позволяет проводить все

операции твердофазного иммуноферментного анализа, включая регистрацию субстратной смеси и возможность автоматизации практически всех этапов анализа.

Большое внимание при постановке ИФА уделяется выбору фермент-субстратной системы. В современных иммуноферментных тест-системах используются разнообразные ферменты и субстраты. Принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток в иммуноферментном анализе обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью регистрации ферментов в растворе.

Для фермент-субстратной пары, используемой в конкретной тест-системе на основе твердофазного иммуноферментного анализа, необходима стабильность в процессе анализа и хранения, а также наличие соответствующего спектрофотометра.

Специфичность диагностической тест-системы не зависит от выбора фермент-субстратной пары, а определяется чистотой и гомогенностью используемых при разработке тест-системы антигенов и антител.

В настоящее время особенно популярны иммуноферментные конъюгаты на основе пероксидазы хрена. Фермент доступен, легко очищается, высоко стабилен и имеет большое количество субстратов. Каталитическая активность конъюгатов достаточно высока, так как при окислении активный центр фермента не затрагивается [84].

Тем не менее, следует отметить, что щелочная фосфатаза и β -галактозидаза в некоторых случаях имеют целый ряд преимуществ перед пероксидазой. Субстраты имеют высокую стабильность, растворимость и не являются токсичными. Их применение резко повышает чувствительность анализа.

Субстраты для пероксидазы в растворе могут спонтанно окисляться, поэтому процесс замедляют добавлением водорастворимых полимеров [85,117,134].

Чувствительность разрабатываемой тест-системы лишь частично зависит от фермент-субстратной пары. В основном она определяется способом синтеза

конъюгата, гомогенностью и удельной активностью используемых для конъюгации антител и антигенов.

Для введения фермента в молекулы антигена и антител используют глутаровый альдегид и периодат натрия [53, 68]. Конъюгаты, полученные с помощью глутарового альдегида в два этапа, имеют большие размеры и могут затруднять определение тестируемых веществ [53].

Методом периодатного окисления конъюгат был разработан Р.К. Nakane и А. Kawaoi [113], а позднее модифицирован Р.К. Nakane et al. [114, 139]. Эффективность связывания пероксидазы с глобулинами в данной методике достигает 70-90% [21]. Приготовленные с помощью периодатного метода конъюгаты активны и стабильны [5, 44].

К. Kato et al. [98] в 1975 г. предложил конъюгировать иммуноглобулины с ферментом β -Д галактозидазой. Такие конъюгаты были устойчивы к химическим воздействиям и повышали чувствительность анализа [3].

Д. Кэтти [32] конъюгировала антитела, иммобилизованные на иммуносорбенте. Синтезированный таким способом конъюгат сохранял исходную активность антител.

Повышение чувствительности, специфичности и экспрессивности иммуноферментного анализа происходит за счет совершенствования методов очистки антигенов и антител, а также получения более активных и чистых конъюгатов [11].

В настоящее время разработаны и разрабатываются иммуноферментные тест-системы, в которых для изготовления конъюгата используют белок А золотистого стафилококка [112, 115, 118, 121]. Этот белок взаимодействует с Fc-фрагментами молекул иммуноглобулинов различных видов животных, что позволяет создать универсальные диагностические тест-системы для выявления различных вирусных и бактериальных болезней.

Анализ результатов многочисленных исследований по применению иммобилизованных систем [8, 9, 15, 74] показал, что иммобилизованные биокатализаторы способствуют повышению эффективности биотехнологических

процессов. Магнитные носители позволяют проводить разделение компонентов в анализируемой смеси во многих образцах одновременно без применения центрифугирования [14].

Специфичность любой серологической реакции определяется диагностической сывороткой. Для получения диагностической сыворотки, содержащей высокие титры антител, лабораторных животных подвергают иммунизации. Стандартных схем с целью получения высокоактивной и специфичной сыворотки не существует, их получают самыми разнообразными способами [7, 20, 37, 38].

Необходимо учитывать, чтобы антигены для иммунизации были предельно чистыми, схема иммунизации должна быть простой и легко воспроизводимой. Высокие дозы антигена вызывают выработку низко аффинных антител. При иммунизации в ранние сроки, сыворотки также имеют низкую аффинность. Активность (титр) антител в сыворотке крови определяют через 14 дней после последней иммунизации в реакции радиальной иммунодиффузии или реакции нейтрализации [2]. Титр антител исследуемых сывороток крови в реакции преципитации должен быть не ниже 1:16–1:32.

Антигены в диагностических целях используют при идентификации выделенного антигена и при выявлении антител. При получении диагностических сывороток и антительных препаратов антигены должны быть высокоактивными, иммуногенными и максимально очищенными от балластных белков и чужеродных антигенов.

При вирусном гепатите утят, как и при других вирусных болезнях, для получения антигена необходима наработка вирусосодержащего материала, его концентрирование и очистка. Для получения вирусосодержащего материала можно использовать развивающиеся утиные эмбрионы или культуру фибробластов утиных эмбрионов [34]. Метод дифференциального центрифугирования помогает сконцентрировать вирусосодержащий материал, а центрифугирование в градиенте плотности и методы колоночной хроматографии помогают очистить антигенные препараты от примесей [12].

1.7. Заключение по обзору литературы

Вирусный гепатит утят типа 1 имеет широкое распространение во всех странах мира, протекает остро и характеризуется высокой заболеваемостью и смертностью, которая может достигать 90-100%. Анализ литературных данных показал, что вирусный гепатит утят типа 1 занимает одно из приоритетных мест среди вирусных инфекций этого вида птицы по распространению, заболеваемости и летальности. Санитарным кодексом Международного эпизоотического бюро (МЭБ) (2008) вирусный гепатит утят типа 1 включен в перечень особо опасных болезней.

Эпизоотологический анализ, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения не позволяют поставить точный диагноз из-за схожести признаков с другими вирусными болезнями утят. Для серодиагностики ВГУ-1 разработаны реакция диффузионной преципитации (РДП), метод флуоресцирующих антител (МФА) с использованием специфических сывороток и антигенов [18, 56]. Широко используют реакцию нейтрализации в культуре клеток, которая высоко специфична [34, 100, 120]. Зарубежные авторы для диагностики вирусного гепатита утят предложили метод ELISA для обнаружения антител в исследуемых пробах [6, 109, 122, 151].

Своевременная диагностика ВГУ-1 является важным условием ликвидации и контроля болезни. Иммуноферментный анализ является современным и перспективным методом, поэтому разработка высокочувствительного и специфичного метода серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 является актуальным направлением исследований.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

Работа выполнена в период с 2016 по 2018 гг. в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно – исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с научно-исследовательской программой НИР № 0599-2014-0221. Соисполнителями в работе по получению антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов специфичных к IgG уток были сотрудники ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

При выполнении работы использовали:

Вирус гепатита утят типа 1, штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП; яйца уток из фермерского хозяйства, эмбрионы уток (УЭ), инкубированные в лабораторных условиях; утята из фермерского хозяйства.

Питательные среды: питательная среда Игла MEM или DMEM, жидкая, с L-глутамином; питательная среда 199, жидкая, с L-глутамином, производства ООО «Биолот».

Сыворотку крови крупного рогатого скота неконсервированная для культур клеток, производства ООО «Биолот».

Растворы: трипсина раствор 0,25% фирмы «US BIO»; версена раствор 0,02%; Хенкса раствор фирмы «Nucclone», производства ООО «Биолот».

Сыворотки, исследуемые в непрямом варианте ИФА, не должны быть контаминированы бактериальной и грибковой флорой, а также гемолизированными и гиперлипидными.

Оборудование и приборы: 1- 8- канальные полуавтоматические дозаторы для ИФА с объемом от 0,5 до 1000 мкл; 96-луночные полистироловые плашки «Nunc», Дания; иммуноферментный анализатор «Униплан», Россия; перистальтический насос PD 5001, Heidolph, Германия; спектрофотометр UNICO-2800, США.

Реактивы: калий фосфорнокислый однозамещенный, ч., ГОСТ 4198, ОАО «Реактив»; калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, х. ч, ГОСТ 2493; карбонат-бикарбонатный буфер производства ООО «Биолот»; фосфатно-солевой буфер производства ООО «Биолот»; фосфатно-цитратный буфер производства ООО «Биолот»; натрия хлорид (NaCl), х.ч., ГОСТ 4233, ОАО «Реактив»; перекись водорода производства ОАО «Татхимфармпрепараты»; ортофенилендиамин (ОФД) производства фирмы Sigma; твин 20 (P7949) производства фирмы Sigma.

Микробиологические среды: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (среда Китта-Тароцци), агар Сабуро.

Яйцо инкубировали в лабораторных условиях в термостате. Эмбрионы в возрасте 11-12 суток инокулировали в аллантоисную полость вирусом в дозе 3,0 lg ЭЛД₅₀ в 0,2 см³. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубировали при температуре (37,5±0,5) °С в течение 2-3 суток, с ежедневным овоскопированием. Павшие эмбрионы охлаждали в холодильнике при 2-8°С в течение 10-12 часов, затем собирали аллантоисную жидкость.

Утят 1-20-суточного возраста доставляли из хозяйства, благополучного по инфекционным болезням птиц.

Определение инфекционной активности вируса проводили на 11-12 – суточных развивающихся утиных эмбрионах. Перед заражением эмбрионы овоскопировали с целью выявления их жизнеспособности. Предварительно на растворе Хенкса с антибиотиками готовили десятикратные ($10^{-1} - 10^{-8}$) разведения вируса. Эмбрионы заражали в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³/эмбрион, по 4 эмбриона для каждого разведения. Инкубировали эмбрионы в термостате при температуре (37±0,5) °С в течение 5 суток. Расчет инфекционного титра проводили по методу L.J. Reed и H. Muench (1938) [60], величину которого выражали в десятичных логарифмах эмбриональных летальных доз в 0,2 см³ (lg ЭЛД₅₀/0,2 см³).

Культуру фибробластов готовили из кожно-мышечной ткани 14-15 – суточных утиных эмбрионов по общепринятой методике [60]. Раствор для

трипсинизации ткани состоял из 0,25% раствора трипсина, 0,02% раствора версена и раствора Хенкса в соотношении 1:2:2, соответственно. Диспергирование измельченной ткани проводили на магнитной мешалке при температуре 36-37°C до полного расщепления фрагментов ткани на отдельные клетки. Действие трипсина в клеточной суспензии нейтрализовали сывороткой крови крупного рогатого скота до конечной концентрации 10%. Клетки осаждали центрифугированием при 900-1000 об/мин. в течение 20 мин., и осадок ресуспензировали ростовой питательной средой до концентрации 650-750 тыс. кл/см³.

Ростовая питательная среда состояла из среды Игла MEM/DMEM и среды 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензилпенициллина 100 ЕД/см³ и стрептомицина сульфата — 100 мкг/см³.

Клеточную суспензию разливали в пробирки или матрасы и инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С. Клеточный монослой на поверхности стекла формировался в течение 48 часов.

Вирус титровали в культуре клеток методом десятикратных разведений и с соответствующим контролем по общепринятой методике [2]. Специфичность цитопатогенного действия (ЦПД) подтверждали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой.

Реакцию нейтрализации проводили по общепринятой методике [2]. При постановке РН использовали сыворотки, свободные от термолabile ингибиторов. Смеси вируса соответствующих разведений и сыворотки специфической и нормальной выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин., а затем в объеме 1,0 см³ вносили в 4 пробирочные культуры. Результаты РН оценивали по титру антител (β-вариант) и по вируснейтрализующей активности сыворотки (α-вариант).

Очистка вируса. Вирусосодержащую инактивированную аллантоисную жидкость осаждали методом дифференциального центрифугирования с последующей гelfильтрацией на колонке с макропористым стеклом (МПС),

марки 1000 ВГХ и уравнивали 0,01М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,3-7,5 [54].

Предварительно макропористое стекло марки 1000 ВГХ активировали концентрированной соляной кислотой (НСl) в соотношении 1:2 по объему и выдерживали при температуре 20-22°C в течение 24 часов, периодически встряхивая. Далее НСl сливали и макропористое стекло промывали дистиллированной водой, затем его обрабатывали равным объемом смеси Комаровского (6% раствор H_2O_2 в 6М растворе НСl в соотношении 1:1) при нагревании на водяной бане при 56°C в течение 2 часов в вытяжном шкафу. После чего МПС промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, под вакуумом удаляли воздух из пор и заливали МПС 4% раствором поливинилпирролидона (ПВП), перемешивая на качалке в течение 4-5 ч. Колонку размером 80×2см заполняли модифицированным МПС и уравнивали 0,01М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,3-7,5. Элюцию вируса осуществляли тем же буфером с использованием перистальтического насоса и прибора РЭПС-1М со скоростью 0,7-1,0 см³/мин. Вирус собирали отдельной фракцией, который регистрировался на ленте самописца первым пиком, а вторым пиком выделялись примесные белки.

Вирус инактивировали АЭЭИ (ООО «Биохим ресурс», Россия) в конечной концентрации 0,1% при температуре (37,0±0,5) °С и экспозиции 24 часа.

Иммуноглобулины G получали из сыворотки крови клинически здоровых уток, свободных от антител к вирусу гепатита. Суммарные иммуноглобулины осаждали 30% раствором сернокислого аммония, который добавляли по каплям при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Сыворотку выдерживали 2 часа и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 мин. Осадок иммуноглобулинов разводили 0,01М фосфатно-солевым буфером, рН 7,3-7,5, в объеме в 5 раз меньше исходного объема сыворотки и проводили диализ против трех смен 0,01М фосфатно-солевого буфера, рН 7,3-7,5.

Фракцию IgG выделяли методом гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200. В качестве элюата использовали 0,01М фосфатно-солевой буфер рН 7,3-

7,5, со скоростью элюции 28-30 см³/ч на 1 см² сечения колонки. Фракции собирали по 5 см³, используя для этой цели автоматический коллектор фракций.

Концентрацию иммуноглобулинов G определяли на спектрофотометре марки UNICO-2800 (США) при длине волны 280 нм.

Фракции, содержащие белок, объединяли, концентрировали путем диализа против 0,01М фосфатно-солевой буфер рН 7,3-7,5 в течение 24 часов при температуре 4-6°С.

Антивидовые иммуноглобулины G получали на кроликах весом 2,5 - 3 кг породы Шиншилла, которых иммунизировали IgG подкожно в области паха, в объеме по 1,0 см³ (с содержанием белка 5 мг/см³ IgG уток) на кролика. Пробы крови отбирали спустя 7 суток после последнего введения антигена из ушной вены с частотой 2-3 раза в неделю в течение двух недель.

Каждую порцию крови инкубировали 1 час при 37°С, обводили тонкой стеклянной палочкой и оставляли в бытовом холодильнике на 16 часов при температуре 4-8°С. Сыворотку отделяли от сгустка, осветляли центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об/мин. Антивидовые IgG выделяли методом ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Содержание белка определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Иммуноглобулины из желтков яиц уток выделяли в несколько этапов. На первом этапе к желтку добавляли 5 объемов дистиллированной воды, тщательно перемешивали 30 минут и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут. При этом иммуноглобулины переходили в жидкую фазу, которую отделяли, и проводили фракционирование Ig Y с использованием хлороформа. К надосадочной жидкости, полученной при водной отмывке, прибавляли равный объем хлороформа, тщательно перемешивали 30 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15-20 мин. Жидкость расслаивалась на 3 фракции, в верхней водной фазе содержались Ig Y. Содержание антител определяли в непрямом варианте ИФА.

Конъюгаты антител с пероксидазой (Serva, ФРГ) получали методом периодатного окисления по М.В. Wilson, Р.К. Nakane [114] при совместной работе с ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

Иммуноанализ антител проводили методом непрямого варианта ИФА [79] на 96-луночных полистироловых планшетах «Nunc». В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин (Sigma). Для сенсibilизации поверхности лунок планшета использовали очищенный антиген вируса гепатита утят в оптимальной концентрации, разведенный 0,01М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,3-7,5. Сорбцию антигена проводили в течение 16-20 часов при температуре 4-8°C. Несвязавшийся антиген отмывали трехкратно в объеме 0,2 см³ 0,01М калий-фосфатным буфером, содержащим 0,5М раствор хлорида натрия с 0,1% конечной концентрацией твина-20 (ФБРТ), рН 7,0-7,4. Контрольные (положительную и отрицательную) и исследуемые сыворотки крови уток (утят) вносили в планшет по 0,1 см³ в разведении 1:400. Планшет помещали в термостат при 37°C на 30 минут, содержимое лунок планшета удаляли, и планшет трехкратно отмывали в объеме 0,2 см³ от не связавшихся антител.

Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток, в рабочем разведении вносили в лунки планшета по 0,1 см³, ставили в термостат на 30 минут при 37°C и отмывали лунки планшета трехкратно в объеме 0,2 см³ ФБРТ. Затем добавляли по 0,1 см³ субстратно-индикаторной смеси и помещали планшет в темное место при комнатной температуре на 3-5 минут. Реакцию останавливали 0,05 см³ 10 % H₂SO₄ и считывали поглощение (оптическую плотность) на иммуноферментном анализаторе «Униплан» при длине волны 492 нм.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами оценки дисперсии, стандартного отклонения и доверительного интервала варьирующих переменных, устанавливали количественные показатели связи зависимых переменных в виде коэффициентов корреляции или коэффициентов регрессионных уравнений. Для соответствующих вычислений применяли компьютерную программу Microsoft Excel.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Получение иммуноспецифических компонентов для иммуноферментного анализа

2.2.1.1. Получение вирусосодержащего материала

Вирус гепатита утят типа 1, штаммов «ВГНКИ-К» и «ЗМ-УНИИП» культивировали на развивающихся 11-12 – суточных утиных эмбрионах, а также в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость собирали от павших эмбрионов с характерными изменениями для вируса гепатита утят.

После формирования монослоя клеток, в культуру вносили вирус гепатита утят в дозах 0,1-1,0 ТЦД₅₀ на клетку и адсорбировали в течение 60 минут при 37°С. Затем добавляли поддерживающую среду с антибиотиками (без сыворотки).

Цитопатогенное действие проявлялось через 18 часов в виде округления клеток и появления зернистости в цитоплазме, а через 48-72 часа наблюдали полную дегенерацию клеточного пласта с образованием синцития.

Вирусосодержащий материал (ВСМ) однократно замораживали и оттаивали, затем его осветляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Инфекционную активность определяли путем исследования надосадочной жидкости на культуре утиных фибробластов по общепринятой методике. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Данные, приведенные в таблице 1, показали наибольшую степень репликации штаммов вируса в развивающихся утиных эмбрионах, причем штамм «ЗМ-УНИИП» вируса гепатита утят был более активным, что и послужило основанием для использования его в разработке иммуноферментной тест-системы.

Биологическая активность вакцинных штаммов ВГУ (n=8)

Биологическая модель	Активность вируса, lg ЭЛД ₅₀ /см ³	
Утиные эмбрионы	ВГНКИ-К	ЗМ-УНИИП
	7,0±0,3	7,25±0,25
Культура утиных фибробластов	Активность вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³	
	ВГНКИ-К	ЗМ-УНИИП
	6,0±0,1	5,5±0,3

Примечание: n – определений.

2.2.1.2. Инактивация вируса гепатита утят аминоэтилэтиленимином

Эмбриональный вирусосодержащий материал из штамма «ЗМ-УНИИП» с инфекционным титром $7,5 \pm 0,1$ lg ЭЛД₅₀/см³ инаktivировали аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ) в конечных концентрациях 0,02, 0,05 и 0,1% при температуре $(37,5 \pm 0,5)^0$ С, рН 7,2-7,4, постоянно перемешивая. Пробы вирусосодержащего материала отбирали через 6, 12, 18 и 24 часов для определения титра вируса в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Для нейтрализации остаточного АЭЭИ использовали тиосульфат натрия, который добавляли в каждую пробу. Результаты инаktivации вирусосодержащего материала представлены в таблице 2.

Данные, приведенные в таблице 2, показывают, что АЭЭИ в концентрациях 0,02 и 0,05% инаktivировал инфекционную активность штамма «ЗМ-УНИИП» в течение 24 часов на 53,1 и 75,0% соответственно, с кинетической скоростью инаktivации $9,2 \times 10^{-4}$ и $4,9 \times 10^{-4}$ lg/ч. При обработке вируса АЭЭИ в концентрации 0,1% константа его скорости инаktivации через 24 часа равнялась нулю (lg K=0), что подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса. Полученные результаты показали прямую зависимость процесса инаktivации вируса гепатита

утят от концентрации инактиванта в вирусосодержащем материале.

Таблица 2

Чувствительность вакцинного штамма вируса к действию АЭЭИ (n=3)

Штамм вируса	Концентрация АЭЭИ, %	Инфекционный титр вируса, lg ЭЛД ₅₀ /см ³				Константа скорости инактивации через 24 ч, lg
		Экспозиция инактивации, ч				
		6	12	18	24	
ЗМ-УНИИП	0,02	7,5±0,1	6,7±0,1	5,7±0,2	3,7±0,1	9,2×10 ⁻⁴
	0,05	6,5±0,2	6,3±0,3	5,3±0,3	2,0±0,3	4,9×10 ⁻⁴
	0,10	5,7±0,3	4,5±0,2	2,0±0,1	0,0	0,0
Контроль вируса		7,5	7,25	6,75	6,5	

Примечание: n – определений.

Полноту инактивации вируса проверяли методом трехкратных пассажей на утиных эмбрионах. Инактивированный вирус гепатита утят вводили в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³ и инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С в течение 5 суток. Отсутствие характерных для вируса гепатита утят изменений в эмбрионе, а также отсутствие гибели эмбрионов подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса.

2.2.1.3. Получение очищенного антигена вируса гепатита утят типа 1

Вирусосодержащую инактивированную аллантоисную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут и концентрировали ВСМ методом дифференциального центрифугирования при 60000 g в течение 1,0, 1,5 и 2,0 часов. Данные показали, что полностью без потерь вирус был осажден в течение 1,5 часов. Осадок ресуспендировали в 5,0 см³ 0,01 М фосфатно-солевого

буфера и очищали гельфильтрацией на колонке с макропористым стеклом марки 1000 ВГХ. Результаты гельхроматографии представлены на рисунке 1.

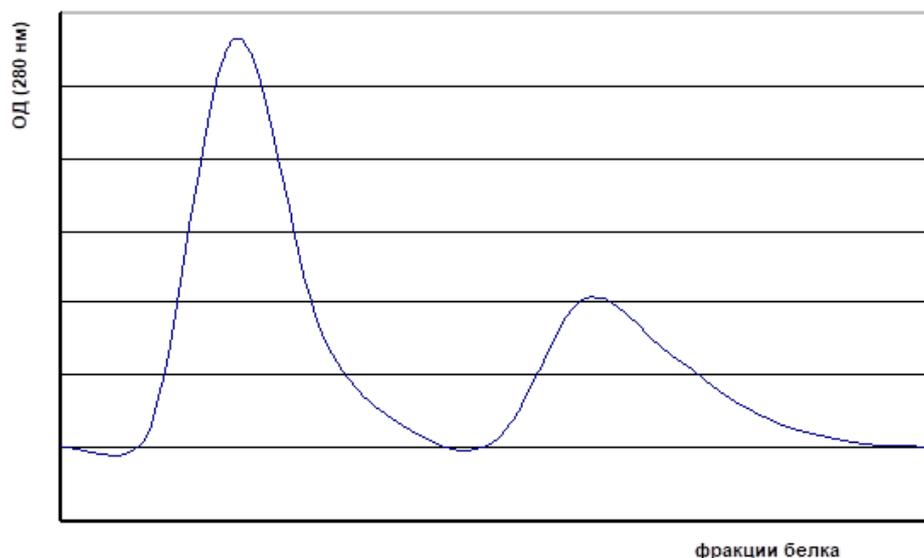


Рисунок 1. Хроматограмма очистки вируса гепатита утят: первый пик - вирусный белок (1); второй пик - примесный белок (2).

Колонка: 2×90 см, объем вирусосодержащей жидкости $1,0 \text{ см}^3$, объем очищенного вируса 15 см^3 ; скорость элюции $1-2 \text{ см}^3/\text{см}^2/\text{мин}$.

Степень очистки вируса составила $98,7\%$, с концентрацией белка $60-80 \text{ мкг}$ в $1,0 \text{ см}^3$ [110].

Высокая степень очистки препарата позволила использовать его для иммобилизации полистироловых планшет для иммуноферментного анализа и получения гипериммунной сыворотки крови утят.

2.2.1.4. Получение специфической сыворотки крови к вирусу гепатита утят

Не менее ответственным моментом при создании иммуноферментной тест-системы является получение нормальной и специфической сыворотки крови уток. Для этих целей использовали клинически здоровых утят 10-суточного возраста, не имеющих антител к возбудителям вирусных болезней. Для получения

специфической сыворотки использовали разные схемы иммунизации, при которых титры полученных сывороток зависели от чистоты антигена вируса и кратности его введения. Трехкратная иммунизация утят нарастающими дозами очищенного вируса гепатита позволила получить высокоактивную специфическую сыворотку. Для определения титра сыворотки крови использовали реакцию нейтрализации. Данные об уровне титра антител гипериммунной сыворотки крови утят представлены в таблице 3.

Таблица 3

Активность специфической сыворотки в реакции
нейтрализации, ($P < 0,05$)

Штамм вируса	Активность сыворотки в РН	
	α -вариант, lg	β -вариант, \log_2
3М-УНИИП	$3,0 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,1$

Титр вируснейтрализующих антител полученной гипериммунной сыворотки крови утят составил $8,5 \pm 0,1 \log_2$, индекс нейтрализации составил $3,0 \pm 0,2 \lg$.

Нормальную сыворотку крови утят использовали для получения антивидового иммунопероксидазного конъюгата.

2.2.1.5. Выделение иммуноглобулинов

Выделение IgG из нормальной сыворотки крови утят проводили сульфатно-риваноловым методом. К 0,3% водному раствору риванола при постоянном перемешивании по каплям добавляли сыворотку без консерванта с рН 7,1 для удаления альбумина. Риванол из надосадочной жидкости удаляли порошком активированного угля (АУ) марки «Merck Medicine» путем фильтрации через хроматографическую бумагу. Объем смеси измеряли и устанавливали рН 7,1 добавлением 1М NaOH.

Осаждение глобулинов проводили при 45% насыщении 30% раствором

сернокислого аммония. Осадок глобулинов формировался при температуре 4°C в течение 10-15 часов. Его отделяли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 минут. Сернокислый аммоний удаляли гельфильтрацией на сефадексе G-25.

Фракцию IgG очищали методом ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом G-200, выход гомогенного IgG составил 10,5 мг/см³. Чистую фракцию IgG использовали для получения антивидовой сыворотки.

2.2.1.6. Получение антивидовой сыворотки

Антивидовую сыворотку получали на кроликах. В качестве антигена для их иммунизации использовали иммуноглобулины G утки. За неделю до иммунизации в подколенные лимфатические узлы кроликов вводили неполный адъювант Фрейда в дозе 1,0 см³. Кроликов весом 2,5 – 3,0 кг породы Шиншилла иммунизировали IgG подкожно в области паха, в объеме по 1,0 см³ (с содержанием белка 5 мг/см³ IgG уток) на кролика в комплексе с равным объемом полного адъюванта Фрейда.

Схема иммунизации включала в себя 2 цикла, каждый из которых состоял из трехдневной иммунизации. Перерыв между циклами составлял 4 суток. Далее иммунизацию повторяли с интервалом в 45 и 60 суток. Титр антивидовых антител определяли в реакции нейтрализации. Вируснейтрализующая активность сыворотки составляла от 3,0- 4,0 lg.

2.2.1.7. Получение и контроль иммунопероксидазного конъюгата

Иммуноглобулины из антивидовой сыворотки выделяли путем трехкратного осаждения общей фракции иммуноглобулинов с помощью насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄. Фракцию, содержащую иммуноглобулины G, очищали гельхроматографией на сефадексе G-200 и идентифицировали иммуноэлектрофорезом. Было очищено 2 серии антивидовых IgG. Результаты

исследований показали, что активность выделенных антивидовых IgG составила от 3,0-4,0 Ig, сравнимую с исходными сыворотками.

Конъюгацию антител с пероксидазой хрена проводили методом периодатного окисления. Было получено две серии иммунопероксидазного конъюгата. Конъюгат очищали от несвязавшейся пероксидазы методом ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

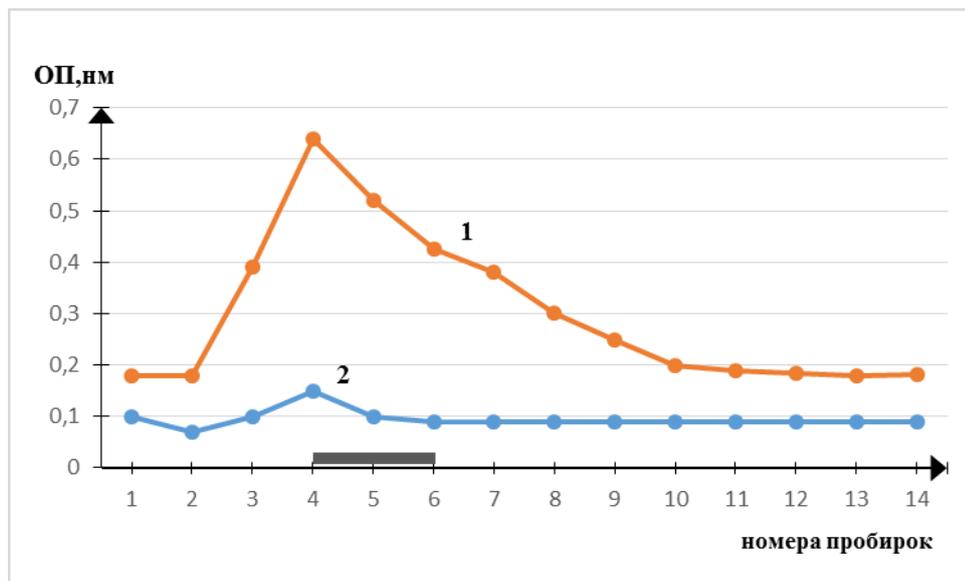


Рисунок 2. Кривые элюции антивидового конъюгата, полученного на нормальный IgG утки

1— показатели оптической плотности фракций при длине волны 280 нм;

2— показатели оптической плотности при длине волны 403 нм;

■ - 4-6 активные фракции конъюгата.

Очищенные конъюгаты собирали фракциями и определяли оптическую плотность (ОП) каждой фракции при длине волны 280 нм и 403 нм.

Расчет коэффициента связывания (К) проводили по формуле:

$$K = \frac{D_{403}}{D_{280}} \quad (2)$$

Конъюгаты пиковых фракций с показателем коэффициента связывания 0,4-0,6 и вышедшие первым основным пиком, объединяли и стабилизировали 0,05% раствором органического бактериостатика ProClin 300 (Sigma-Aldrich).

Конъюгат хорошо сохранялся в нативном виде от 1 до 3 лет при температуре 2 - 8°C в бытовом холодильнике. Активность конъюгата оценивали в прямом методе иммуноферментного анализа, которая составила 1:12800.

Конъюгат, полученный описанным способом, был использован при разработке иммуноферментной тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита утят типа 1.

2.2.2. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1

2.2.2.1. Определение оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов

Известно, что при многоэтапной постановке иммуноферментного анализа имеют место специфическое и неспецифическое взаимодействия компонентов тест-системы. Специфическое взаимодействие (антиген-антитело) обуславливает специфичность тест-системы. Неспецифические взаимодействия резко снижают чувствительность диагностических тест-систем. Поэтому при разработке данной тест-системы проводили оптимизацию условий проведения иммуноферментной реакции, которая заключалась в экспериментальном выборе значений параметров реакции, обеспечивающих необходимую степень чувствительности и специфичности теста.

2.2.2.1.1. Определение концентрации антигена

Концентрация вирусного антигена, иммобилизованного на полистироле, – это величина, которая ограничивается поверхностью, сорбционной емкостью

материала и существенно зависит от условий проведения процесса адсорбции, а также является одним из важных факторов, лимитирующих чувствительность иммуноферментного анализа.

Определение иммобилизованной концентрации очищенного антигена проводили в диапазоне от 1,0 мкг до 10 мкг на лунку. Сенсибилизирующая активность антигена была различной. Результаты исследований представлены на рисунке 3.

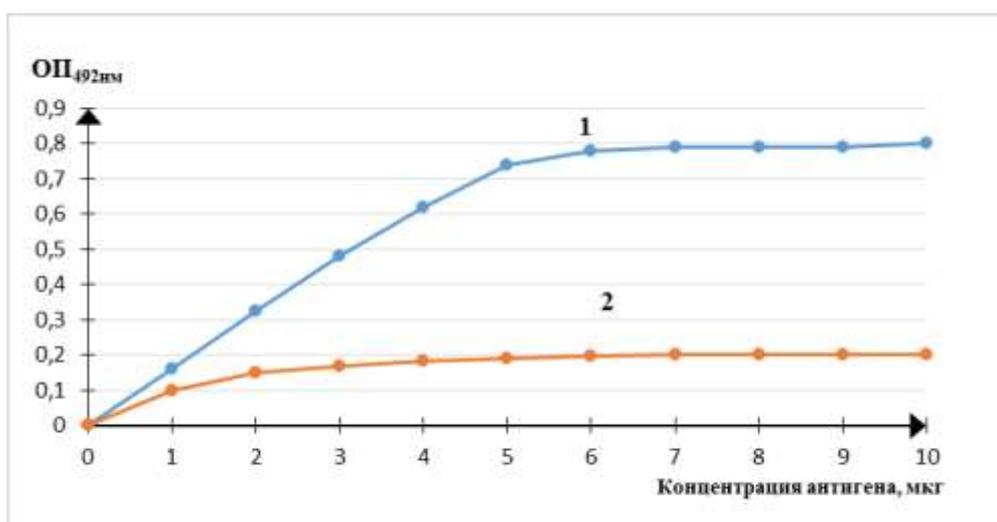


Рисунок 3. Определение сенсибилизирующих доз антигена в ИФА

- по оси абсцисс – концентрация антигена ВГУ;

- по оси ординат – значения ОП₄₉₂

1. Показатель ОП положительной сыворотки;

2. Показатель ОП отрицательной сыворотки.

Из рисунка 3 видно, что зависимое от концентрации антигена связывание антител происходило в пределах от 5,0 до 9,0 мкг на лунку. При этих концентрациях иммобилизованного антигена изолинии выходили на прямую линию, что свидетельствует о достаточном покрытии поверхности лунок белком. Увеличение концентрации антигена более 9,0 мкг на лунку не давало возрастания активности иммунособрента. При концентрации белка менее 5,0 мкг имело место значительное снижение величин оптической плотности, вследствие чего

отмечалось уменьшение чувствительности анализа за счет неспецифического взаимодействия.

2.2.2.1.2. Определение рабочего разведения конъюгата

Рабочее разведение антивидового конъюгата определяли при оптимальной концентрации иммобилизованного антигена вируса гепатита на полистироловый планшет. Контрольные сыворотки (специфическую и нормальную) вносили в разведениях от 1:50 до 1:6400 и инкубировали 30 минут при 37°C. Антивидовой конъюгат использовали в разведениях, близких к предварительно оттитрованным со стандартными (специфической и нормальной) сыворотками. За рабочее разведение конъюгата принимали разведение, при котором выявляли антитела специфической сыворотки в наибольшем разведении при минимальной ОП в лунках с нормальной сывороткой. Рабочее разведение полученных антивидовых конъюгатов варьировало от 1:100 до 1:400.

2.2.2.1.3. Определение времени и температуры иммобилизации антигена

Влияние продолжительности инкубации и температуры на иммобилизацию антигена изучали с использованием оптимальной его концентрации в 0,01 М ФСБ, рН 7,3-7,5. Антиген ВГУ-1 сорбировали при 4° С и при 37° С в течение 18 и 2 часов. Результаты определения температуры инкубации сыворотки с адсорбированным антигеном представлены на рисунке 4.

Из рисунка 4 видно, что при данных режимах иммобилизации антигена вируса гепатита утят типа 1, определяемая величина оптической плотности была практически одинаковой. Однако при температуре 37°C в течение 2 часов наблюдалось увеличение уровня неспецифического взаимодействия.

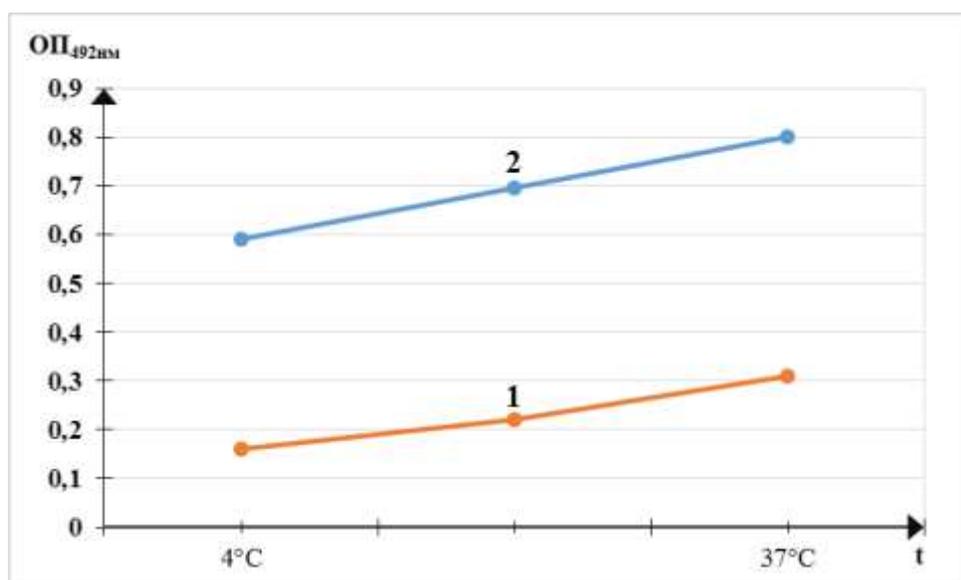


Рисунок 4. Определение температуры инкубации сыворотки с адсорбированным антигеном при 4°C и 37°C.

1 – показатели оптической плотности отрицательной сыворотки в разведении 1:400;

2 – показатели оптической плотности положительной сыворотки в разведении 1:400.

При разработке иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1 иммобилизацию антигена на планшеты проводили в течение 16-18 часов при 4°C в условиях бытового холодильника.

2.2.2.1.4. Определение температуры и времени инкубации сыворотки с иммобилизованным антигеном

Инкубацию сыворотки крови утят с иммобилизованным в оптимальной концентрации антигеном вируса гепатита утят проводили при температуре 37° С в течение 30, 45 и 60 минут. Результаты исследований представлены на рисунке 5. В аналогичном режиме проводили и инкубацию иммунопероксидазного конъюгата.

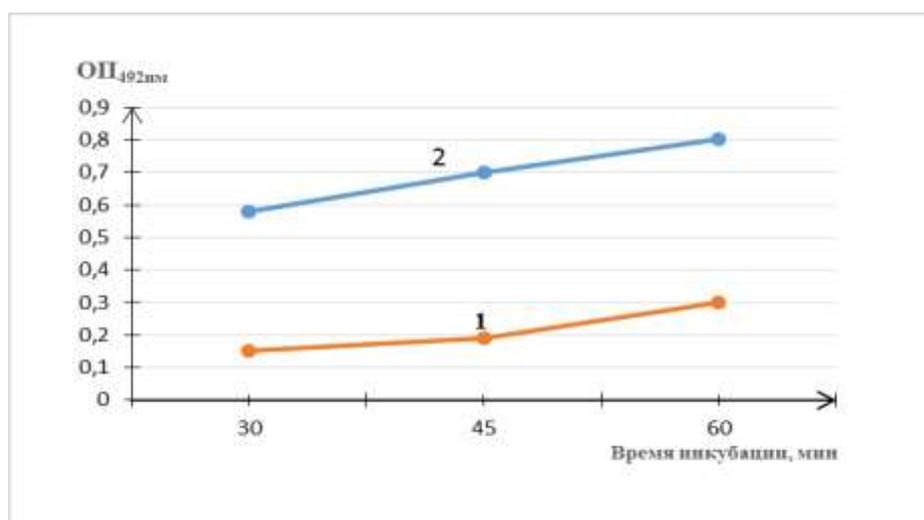


Рисунок 5. Зависимость времени от температуры инкубации сыворотки с адсорбированным антигеном вируса гепатита.

1 – показатели оптической плотности отрицательной сыворотки в разведении 1:400;

2 – показатели оптической плотности положительной сыворотки в разведении 1:400.

Данные, представленные на рисунке 5, иллюстрируют наступающее равновесие иммунного комплекса при температуре 37° С уже через 30 минут. При 45 и 60-минутной инкубации величины оптической плотности возрастают на 15 и 20% соответственно, но при этом увеличивается неспецифическое взаимодействие.

Таким образом, при разработке иммуноферментной тест-системы на этапах инкубации исследуемой сыворотки крови утят и иммунопероксидазного конъюгата использовали время контакта 30 минут при температуре 37°С.

2.2.2.1.5. Определение специфичности разрабатываемой иммуноферментной тест-системы

Важной задачей при разработке твердофазного варианта ИФА является максимальное снижение связывания конъюгата и других компонентов с поверхностью носителя. Способностью к адсорбции соединений различной природы в условиях проведения иммунохимического анализа обладают все применяемые в иммуноферментном анализе носители.

Наиболее эффективным путем подавления связывания компонентов с носителем является проведение анализа в буфере, содержащем неионные детергенты, в частности, твин-20. По мнению разных исследователей, подобными свойствами обладают инертные белки в концентрациях 1-2% и высокие концентрации хаотропных ионов типа Cl^- [37,41].

С этой целью при разработке иммуноферментной тест-системы в качестве промывочного буфера использовали:

- 0,01М ФСБ рН 7,3-7,5 с 0,15 М NaCl;
- 0,01М ФСБ рН 7,3-7,5 с 0,15М NaCl и 0,05% твин-20;
- 0,01М ФСБ рН 7,3-7,5 с 0,5 М NaCl и 0,1% твин-20.

Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Оценка промывочных буферных систем (n=5)

Характеристика промывочной буферной системы	Специфический ответ *	Неспецифическая сорбция**
0,01М ФСБ рН 7,3-7,5+0,15 М NaCl	0,715	0,236
0,01М ФСБ рН 7,3-7,5+ 0,15 М NaCl + 0,05% твин-20	0,506	0,160
0,01М ФСБ рН 7,3-7,5 + 0,5М NaCl + 0,1%. твин-20	0,907	0,110

Примечание: * — значения ОП₄₉₂ положительной сыворотки к вирусу гепатита утят;

** — значения ОП₄₉₂ при постановке ИФА «контроль конъюгата».

Данные, представленные в таблице 4, показали, что промывочный буфер 0,01 М ФСБ рН 7,3-7,5, содержащий 0,5 М NaCl с 0,1% конечной концентрацией детергента твин-20, подавляет неспецифическое взаимодействие, поэтому его и использовали при разработке иммуноферментной тест-системы.

2.2.2.1.6. Определение диагностического титра в ИФА

С целью определения диагностического титра в иммуноферментном анализе, при оптимальных концентрациях и условиях взаимодействия компонентов разрабатываемой тест-системы, были исследованы предварительно раститрованные, начиная с разведения 1:100, различные сыворотки крови:

- сыворотки из утководческих хозяйств, благополучных по вирусному гепатиту утят, 20 проб;
- гипериммунная сыворотка крови утят к ВГУ-1;
- нормальная (контрольная) сыворотка крови утят;
- гетерологичные сыворотки крови к возбудителю реовирусного теносиновита кур, вирусам инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни, парвовирусу гусей;
- 5 проб сыворотки крови уток, привитых инактивированной эмульгированной вакциной против вирусного гепатита утят типа 1;
- 5 проб сыворотки крови утят, полученных от вакцинированных родителей.

Результаты исследований сывороток крови представлены в таблице 5.

Титры антител, выявляемые иммуноферментной тест-системой (n=5)

№ проб сыворотки	Сыворотка крови	Титр	Интерпретация результатов
1-20	Сыворотка крови утят из благополучных по ВГУ хозяйств	1:125	отр.
21	Сыворотка крови к реовирусу	1:128	отр.
22	Сыворотка крови к вирусу инфекционного бронхита кур	1:125	отр.
23	Сыворотка крови к вирусу ньюкаслской болезни	1:132	отр.
24	Сыворотка крови к парвовирусу гусей	1:118	отр.
25	Гипериммунная сыворотка к вирусу гепатита утят типа I	1:3265	пол.
26	Нормальная сыворотка крови утят	1:115	отр.
27	Сыворотка крови утят, полученная от вакцинированных уток	1:655	пол.
28		1:416	пол.
29		1:753	пол.
30		1:806	пол.
31		1:545	пол.
32	Сыворотка крови от вакцинированных уток	1:2124	пол.
33		1:3288	пол.
34		1:4093	пол.
35		1:2252	пол.
36		1:4158	пол.

Анализ полученных результатов показал, что разработанная иммуноферментная тест-система обладает специфичностью, поскольку

иммобилизованный антиген вируса гепатита утят положительно связывался только со специфическими антителами и не взаимодействовал с антителами нормальной сыворотки крови утят и с антителами к другим вирусам. В сыворотке крови уток, однократно привитых инактивированной эмульгированной вакциной, специфические антитела определяли в титрах от 1:2124 до 1:4158.

При исследовании сыворотки крови утят, полученной от вакцинированных родителей, титр специфических антител к вирусу гепатита утят находился в пределах от 1:416 до 1:806.

Сыворотки с титром антител 1:400 и выше считали положительными, ниже – отрицательными.

Таким образом, при проведении серологического мониторинга в утководческих хозяйствах на наличие антител к вирусу гепатита утят, сыворотки крови следует тестировать, начиная с разведения 1:100, а разведение 1:400 считать диагностическим титром на вирусный гепатит утят типа 1.

2.2.2.2 Расчет титра антител по одному разведению

Положительные пробы сыворотки крови уток разной активности титровали на иммуноферментном планшете (n=3). Для разведений сывороток 1:200, 1:400 и 1:800 рассчитывали S/P – отношение по формуле:

$$S/P = \frac{\text{ОП}_{492} \text{ исследуемой пробы} - N}{P - N}, \text{ где} \quad (3)$$

N – среднее значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля;

P – среднее значение оптической плотности (ОП) положительного контроля.

По показателям оптической плотности исследуемых проб, специфической и нормальной сывороток крови проводили регрессионный анализ и находили

коэффициенты линейной регрессии для $\lg S/P$ и $\lg T$. Результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6

Коэффициенты линейной регрессии и корреляции для исследуемых разведений сыворотки

Разведение	A	B	R
1:200	1,58978	3,51489	0,95983
1:400	1,36458	3,53402	0,99798
1:800	1,18324	3,56654	0,96569

Примечание: A, B – коэффициенты линейной регрессии;
R – коэффициент корреляции.

Высокое значение коэффициента корреляции наблюдалось для разведения сыворотки 1:400. График зависимости величин $\lg T$ от $\lg S/P$ для рабочего разведения сыворотки представлен на рисунке 6.

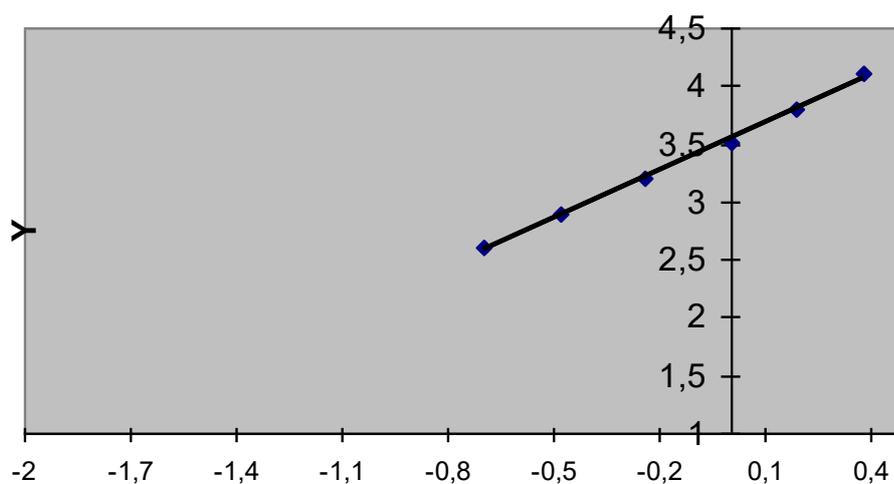


Рисунок 6. График зависимости величин $\lg T$ от $\lg S/P$ для рабочего разведения сыворотки

* - линия данных для разведения 1:400 (выбранное разведение)

Уравнение линейной регрессии $\lg T = 1,36089 \lg (S/P) + 3,53062$ связывает S/P-отношение при разведении 1:400 с конечным титром.

Расчет титра (уровень антител) исследуемой сыворотки по одной формуле справедлив для определенных значений ОП контрольных сывороток, поэтому ОП как отрицательного, так и положительного контролей в разведениях 1:400 исследовали в 40 повторностях. Средние значения показателей оптической плотности для отрицательного и положительного контролей представлены в таблице 7.

Таблица 7

Средние значения ОП отрицательного и положительного контролей

Значения ОП отрицательного контроля	Значения ОП положительного контроля
0,132; 0,144; 0,155; 0,120; 0,165;	0,638; 0,652; 0,545; 0,629; 0,527;
0,124; 0,097; 0,158; 0,107; 0,108;	0,605; 0,686; 0,554; 0,555; 0,572;
0,105; 0,122; 0,075; 0,103; 0,110;	0,651; 0,620; 0,545; 0,527; 0,580;
0,132; 0,155; 0,129; 0,095; 0,100;	0,474; 0,504; 0,505; 0,602; 0,608;
0,121; 0,135; 0,120; 0,113; 0,124;	0,670; 0,768; 0,648; 0,584; 0,655;
0,116; 0,105; 0,135; 0,092; 0,123;	0,547; 0,528; 0,440; 0,538; 0,661;
0,115; 0,127; 0,132; 0,109; 0,126;	0,561; 0,525; 0,533; 0,632; 0,751;
0,134; 0,125; 0,138; 0,152; 0,145	0,712; 0,540; 0,757; 0,602; 0,870

Анализ полученных данных показал, что достоверные результаты реакции с использованием разработанной тест-системы могут быть получены, если средняя ОП отрицательного контроля находится в интервале от 0,075 до 0,165, а средняя ОП положительного контроля находится в интервале от 0,440 до 0,870. Установлены пороговые S/P-отношения, разграничивающие отрицательную,

сомнительную и специфическую реакции. S/P-отношение для отрицательной реакции составило 0,20, для положительной реакции – 0,24, а промежуточные величины 0,21-0,23 соответствовали сомнительным результатам.

2.2.2.3. Оценка чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы

С целью оценки чувствительности и специфичности разработанной иммуноферментной тест-системы, сыворотки крови уток для сравнения исследовали в реакции нейтрализации. Сыворотки, исследуемые предложенным способом, были подобраны так, что все они были апробированы на наличие антител к вирусу гепатита утят в РН. Тест нейтрализации является классическим тестом диагностики вирусных заболеваний, в том числе и вирусного гепатита утят.

Результаты исследования сывороток крови уток в реакции нейтрализации и в ИФА представлены в таблице 8.

Данные, представленные в таблице 8, свидетельствуют о том, что разработанная иммуноферментная тест-система выявляла специфические антитела к вирусу гепатита утят в гипериммунной сыворотке, в пробах сыворотки вакцинированных уток и суточных утят, полученных от вакцинированных родителей.

Корреляция между результатами исследований сывороток крови, полученных в иммуноферментном анализе с использованием разработанной тест-системы и в реакции нейтрализации составила 98%, 90% и 87% соответственно. С отрицательными и гетерологичными сыворотками крови результаты в обоих тестах были отрицательными ($P < 0,05$). Таким образом, полученные результаты указывают на высокую чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы.

Активность сывороток крови в реакции нейтрализации и
иммуноферментной тест-системе (n = 3)

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови	Активность сывороток		Коэффициент корреляции, -r
		РН, log ₂	ИФА*	
1.	Гипериммунная сыворотка крови (положительный контроль)	9,0	3850	0,98
2.	Отрицательная сыворотка (отрицательный контроль)	0,75	155	—
3.	Сыворотка крови от не вакцинированных уток	0,75	186	—
4.	Сыворотка крови от вакцинированных уток	8,5	3125	0,90
5.	Сыворотка крови суточных утят, полученных от вакцинированных родителей	5,8	535	0,87
6.	Гетерологичные сыворотки к вирусам: - реовирусу кур - парвовирусу гусей	— —	145 173	— —

Примечание: * - титры антител в обратных величинах.

2.2.2.3.1. Оценка воспроизводимости результатов иммуноферментного анализа

Оценку воспроизводимости результатов иммуноферментного анализа проводили путем двукратных исследований с интервалом 4 часа одних и тех же проб сыворотки крови утят, полученных на 21 сутки после иммунизации вирусвакциной производства ВНИВИП, подкожно, в дозе 0,6 см³. Сыворотки исследовали в течение дня при использовании компонентов иммуноферментной тест-системы одной и той же серии. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Данные, представленные в таблице 9, показывают, что при исследовании проб сыворотки крови утят в одном разведении с использованием компонентов

иммуноферментной тест-системы одной серии для определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа получены воспроизводимые результаты.

Таблица 9

Результаты исследований сывороток крови утят с целью оценки воспроизводимости результатов ИФА

№ пробы	Титр сыворотки в ИФА*	
	Первое исследование	Второе исследование
1	1821	1822
2	1767	1758
3	1504	1509
4	1458	1450
5	2569	2558
6	2108	2103
7	2009	2014
8	1992	1967
9	2361	2368
10	1911	1921

Примечание: * - титры в обратных значениях.

2.2.2.3.2. Оценка стабильности тест-системы

Одним из критериев оценки разработанной иммуноферментной тест-системы было определение условий и сроков хранения компонентов. Исследования проводили методом титрации и методом постановки ИФА в одном разведении.

При постановке иммуноферментного анализа методом титрации, начиная с разведения 1:100, результаты исследований по стабильности компонентов иммуноферментной тест-системы при условии хранения в защищенном от света месте при температуре 4-8° С в течение 12 месяцев представлены в таблице 10.

Результаты исследований контрольных сывороток в ИФА
в зависимости от сроков хранения набора

Контрольные сыворотки	Оптическая плотность (ОП) при длине 492 нм		
	Срок хранения набора, мес.		
	4	8	12
Положительная	0.905	0.897	0.873
Отрицательная	0,134	0,132	0,131

Данные, приведенные в таблице 10, свидетельствуют о сохранении активности антигена вируса гепатита утят, сорбированного в лунках планшета для иммуноферментного анализа, и активности контрольных сывороток и конъюгата при хранении компонентов тест-системы в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

При постановке иммуноферментного анализа в одном разведении 1:400 результаты исследований активности положительной, отрицательной контрольных сывороток и конъюгата в зависимости от времени и условий хранения, представлены в таблице 11.

Таблица 11

Результаты исследований контрольных сывороток в ИФА
в одном разведении

Контрольные сыворотки	Результаты ИФА, ОП ₄₉₂ , первичное исследование	Результаты ИФА, ОП ₄₉₂ , через 15 суток хранения разведенных сывороток и конъюгата при температуре минус 10°С
Положительная	0,915	0,905
Отрицательная	0,134	0,138

Данные, представленные в таблице 11, показывают, что положительную, отрицательную контрольные сыворотки после разведения 1:400, а также рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре минус 10°C в течение 15 суток (срок наблюдения). В течение срока годности размораживание допускается один раз.

Таким образом, соблюдение данных режимов хранения компонентов иммуноферментной тест-системы дает возможность использовать ее на протяжении 12 месяцев и получать воспроизводимые результаты иммуноферментного анализа.

2.2.3. Апробация иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа I

2.2.3.1. Изучение динамики формирования антител у вакцинированных утят в лабораторных условиях

Исследования проводили на утятах 14-суточного возраста, полученных из хозяйства, благополучного по острым инфекционным болезням уток. Перед иммунизацией сыворотку крови утят исследовали на отсутствие антител к вирусу гепатита утят типа 1. Утят опытной группы в количестве 15 голов вакцинировали подкожно в область нижней трети шеи, в объеме 0,6 см³, однократно, вирусвакциной производства ВНИВИП. Утят контрольной группы в количестве 5 голов не прививали.

Антигенную активность препарата оценивали по титрам поствакцинальных антител с использованием разработанной иммуноферментной тест-системы на 7-, 14-, 21- и 30-е сутки после иммунизации. Данные по антигенной активности представлены в таблице 12.

Данные, представленные в таблице 12, показали, что специфические антитела в сыворотке крови утят были выявлены уже на 7-е сутки после вакцинации, их средний титр составил 592 ± 36 ($P < 0,05$). К 14 суткам средний титр антител составил 790 ± 33 , а на 21-е сутки он был в два раза выше (1912 ± 143), чем

на 14-е сутки. На 30-е сутки титр антител в сыворотке крови вакцинированных утят составил 2504 ± 73 (срок наблюдения).

Таблица 12

Уровень специфических антител у привитых утят (n=8)

Наименования групп	Титр антител в ИФА, $M \pm m$				$P \leq$
	Сроки после вакцинации, суток				
	7	14	21	30	
Вакцинированные утята	592 ± 36	790 ± 33	1912 ± 43	2504 ± 73	0,05
Контрольные утята	157 ± 18	156 ± 29	156 ± 15	155 ± 17	0,05

Примечание: титры антител выражены в обратных величинах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная тест-система обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при определении уровня антител к вирусу гепатита утят.

2.2.3.2. Изучение поствакцинального иммуногенеза у уток в производственных условиях

Изучение формирования поствакцинального иммунитета у уток в производственных условиях проводили путем серологических исследований проб сыворотки крови уток, полученных из ООО «Племзавод Благоварский», где применяется эмбриональная вирусвакцина против вирусного гепатита утят типа 1 производства ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных» (ВНИИЗЖ).

В соответствии с инструкцией по применению вирусвакцины уток иммунизируют в 60-70 суток с последующей ревакцинацией в 140-150 суток,

дважды с интервалом 15 суток в объеме 1,0 см³, внутримышечно в бедренную мышечную группу.

Для исследования были получены:

- сыворотки крови уток 140-суточного возраста перед вакцинацией – 25 проб;
- сыворотки крови суточных утят от вакцинированных родителей – 25 проб;
- сыворотки крови уток 190-суточного возраста после вакцинации – 25 проб.

Результаты исследований сывороток крови представлены в таблице 13.

Таблица 13

Результаты исследований проб сыворотки
крови в иммуноферментной тест-системе (n=25), P <0,05

№ п/п	Наименования групп	Обратная величина среднего титра	Число положительных проб (ПР), %
1	Сыворотка крови уток перед вакцинацией (возраст 140 суток)	530±54	100%
2	Сыворотка крови от вакцинированных уток (возраст 190 суток)	4930±216	100%
3	Сыворотка крови суточных утят, полученных от вакцинированных родителей	1897±125	100%

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови уток показали, что средний титр специфических антител к вирусу гепатита утят в сыворотке крови уток до вакцинации составил 1:530 (P <0,05). После вакцинации эмбриональной вирусвакциной производства ВНИИЗЖ уровень антител в сыворотке крови уток через 30 суток составил 1:4930 (P <0,05). У утят, полученных от вакцинированных родителей, средний титр антител в

имуноферментном анализе составил 1:1897 ($P < 0,05$), что обеспечивало защиту от полевого заражения.

Апробация разработанной диагностической тест-системы во всех вариантах ее практического использования показала высокую чувствительность и специфичность при определении специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1.

2.2.3.3. Изучение динамики материнского иммунитета против вирусного гепатита в производственных условиях

Напряженность материнского иммунитета у утят в производственных условиях изучали путем проведения серологических исследований проб сыворотки крови утят, полученных из ООО «Племптицезавод Благоварский», где применяется эмбриональная вирусвакцина производства ВНИИЗЖ, согласно инструкции по применению. Для исследования были получены пробы сыворотки крови от утят 1-, 3-, 10- и 20 – суточного возраста по 15 проб каждого возраста и яйцо от уток-несушек родительского стада в количестве 30 штук для определения антител к вирусу гепатита утят в экстрактах желтка яиц. Наличие специфических антител к вирусу гепатита утят определяли методом иммуноферментного анализа с использованием разработанной тест-системы. Результаты исследований представлены в таблице 14.

Таблица 14

Кинетика материнских антител у утят, (n=15)

Наименования группы	Титр антител в ИФА, $M \pm m$				$P \leq$
	Возраст утят, суток				
	1	3	10	20	
Утята, от вакцинированных родителей	2334 \pm 136 100%	2236 \pm 103 80%	1152 \pm 63 26,7%	704 \pm 43 13,3%	0,05

Примечание: титры антител выражены в обратных величинах; число положительно реагирующих проб в %.

Результаты исследований, представленные в таблице 14, показывают, что уровень пассивных антител в сыворотке крови растущих утят постепенно снижается. У суточных утят, полученных от вакцинированных родителей, материнский иммунитет составил 100%. При исследовании сывороток крови от 3-х и 10-суточных утят количество положительных проб составило 80,0 и 26,7% соответственно. При исследовании сывороток крови, полученных от 20-суточных утят, количество положительно реагирующих проб сыворотки крови утят составляло 13,3%.

Результаты исследований экстрактов желтка яиц в иммуноферментном анализе показали, что средний титр специфических антител в желтке яиц составил $1:3134 \pm 156$.

Регистрируемый уровень материнских антител в желтке яиц ($1:3134 \pm 156$) и в сыворотке крови суточных утят ($1:2334 \pm 136$) свидетельствует о том, что вакцина, применяемая в хозяйстве, обладает иммуногенной активностью, обеспечивает защиту утят от полевого вируса и потенциально увеличивает выживаемость потомства на ранних этапах жизни.

Апробация разработанной иммуноферментной тест-системы во всех вариантах ее практического использования показала высокую чувствительность и специфичность при определении специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) является высоко летальной, контагиозной и быстро распространяющейся инфекцией молодых утят, вызванной вирусом гепатита утят А, который принадлежит к роду *Avihepatovirus* семейства *Picornavirida* [82, 83, 99, 116, 129, 130]. Вирусный гепатит утят типа 1 является одним из наиболее распространенных заболеваний на утиных фермах и приводит к крупным экономическим потерям в утководстве [107].

Болезнь часто протекает в ассоциации с инфекциями вирусной, бактериальной и грибковой этиологии, и поэтому основой успешной борьбы с болезнью является лабораторная диагностика с использованием различных методов исследований [25, 99, 145].

Для своевременной постановки диагноза на вирусный гепатит утят типа 1 используют различные методы лабораторной диагностики [25, 99, 145]. Эпизоотологический анализ, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения не позволяют поставить точный диагноз из-за схожести симптомов многих инфекционных болезней уток. Достоверная диагностика основана на индикации вируса на утиных эмбрионах или в культуре клеток и его идентификации с помощью полимеразно-цепной реакции [71, 82, 99, 100] и серологических реакций. Для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 также применяются реакция диффузионной преципитации и метод флуоресцирующих антител [18, 56]. Также широко используют реакцию серонейтрализации в культуре клеток, которая является высокоспецифичной [34, 100, 120]. Диагностическая ценность этих методов различна. Одни из перечисленных методов длительны и трудоемки, другие имеют низкую чувствительность.

В течение последних десятилетий в диагностике инфекционных болезней широко применяется иммуноферментный анализ. В отличие от иммунологических методов, основанных на феноменах преципитации или агглютинации, при использовании иммуноферментного анализа инфекционный

агент выявляется на первой фазе взаимодействия антиген-антитело и при последующей фермент-субстратной реакции, что определяет высокую чувствительность метода. Высокая специфичность и чувствительность ИФА в сочетании с быстротой анализа имеет неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами [13, 55].

В настоящее время многие исследователи за рубежом успешно используют иммуноферментный анализ для контроля уровня специфических антител в сыворотке крови при вирусном гепатите утят [6, 109, 122, 151]. Высокая специфичность и чувствительность метода в сочетании с быстротой анализа имеет неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами [13, 55].

Очевидная перспективность и достоинства иммуноферментного анализа, а также отсутствие данных о диагностической ценности метода с целью выявления и определения уровня специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 послужили основанием для разработки твердофазной иммуноферментной тест-системы.

Создание иммуноферментной тест-системы для выявления и определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1 требует получения высокоактивного очищенного вируса, вирусспецифической и нормальной сыворотки крови и антивидового иммунопероксидазного конъюгата, специфичного к IgG уток.

Вирус гепатита утят культивировали на развивающихся 11-12 – суточных утиных эмбрионах. Максимальное накопление вируса происходило в течение 48-72 часов при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и при множественной инокуляции эмбриона в дозе 1000 ЭЛД₅₀. Инфекционный титр вируса равнялся $7,5 \pm 0,5 \lg$ ЭЛД₅₀/см³, что согласуется с данными большинства исследователей, полученными при изучении генетических маркеров вируса гепатита утят [34, 64].

Химическую инактивацию инфекционной активности вируса гепатита утят проводили водным раствором АЭЭИ в конечной концентрации 0,1%. Константа скорости инактивации через 24 часа равнялась нулю ($\lg K=0$). Вирус полностью терял инфекционную активность, что подтверждали результаты проверки его на

полноту инаktivации. Полученные результаты согласуются с данными ряда авторов [22, 33,39, 65], которые для инаktivации вирусов использовали производные азиридина (этиленимины), и, по их мнению, данные инаktivаторы имеют преимущества по сравнению с другими инаktivирующими агентами.

Очистку вируса гепатита утят, полученного из вирусосодержащей инаktivированной аллантоисной жидкости, проводили методом дифференциального центрифугирования с последующей гельфильтрацией на колонке с макропористым стеклом, марки 1000 ВГХ, которую уравнивали 0,01М фосфатно-солевым буфером, рН 7,3-7,5 [54].

Элюцию вируса осуществляли тем же буфером, наслаивая на колонку вирусный материал в объеме 1,0 см³ при высоте колонки 90 см, со скоростью элюции 1-2 см³/см² /мин. При этом происходило четкое разделение фракций вирусного и примесного белка (рис. 1).

Степень очистки вируса составила 98,7%, с концентрацией белка 60-80 мкг в 1,0 см³, что согласуется с результатами других авторов, при получении данным методом очищенных антигенов других вирусов [6, 19, 37]. Высокая степень очистки препарата позволила использовать его для иммобилизации полистироловых планшет для ИФА и получения гипериммунной сыворотки крови утят.

Не менее ответственным моментом при создании иммуноферментной тест-системы является получение нормальной и специфической сыворотки крови уток. Трехкратная иммунизация утят нарастающими дозами очищенного вируса гепатита утят, с интервалом 7 суток, позволила получить высокоактивную специфическую сыворотку. В реакции нейтрализации титр вируснейтрализующих антител полученной гипериммунной сыворотки крови утят имел значение $8,5 \pm 0,1 \log_2$, а индекс нейтрализации составил $3,0 \pm 0,2 \lg$.

Выделение IgG из нормальной сыворотки крови утят проводили сульфатно-риваноловым методом и очищали методом ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом G-200, выход гомогенного IgG составил 10,5 мг/см³. Чистую фракцию IgG использовали для получения антивидовой сыворотки.

Донорами для получения антивидовых антител в наших экспериментах служили кролики. Схема иммунизации включала в себя 2 цикла, каждый из которых состоял из трехдневной иммунизации. Перерыв между циклами составлял 4 суток. Далее иммунизацию повторяли с интервалом в 45 и 60 суток. Антивидовые сыворотки обладали высокой вируснейтрализующей активностью от 3,0- 4,0 lg₂.

Иммуноглобулины из антивидовой сыворотки выделяли путем трехкратного переосаждения общей фракции иммуноглобулинов с помощью насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄. Фракцию, содержащую иммуноглобулины G, очищали гельхроматографией на сефадексе G-200 и идентифицировали иммуноэлектрофорезом.

Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток, получали модифицированным методом периодатного окисления, который в настоящее время считается основным [21]. С выделенными IgG из сыворотки крови кролика и пероксидазой хрена (RS=3,0) было получено две серии иммунопероксидазного конъюгата. Конъюгат очищали от несвязавшейся пероксидазы методом ионообменной хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Пиковые фракции конъюгата с показателем коэффициента связывания 0,4-0,6 и вышедшие первым основным пиком, объединяли и стабилизировали 0,05% раствором органического бактериостатика ProClin 300. Хранили конъюгат при температуре 2 - 8°C в бытовом холодильнике.

Рабочее разведение антивидового конъюгата определяли при оптимальной концентрации иммобилизованного антигена вируса гепатита утят на полистироловый планшет непрямым методом иммуноферментного анализа. Рабочее разведение полученных антивидовых конъюгатов варьировало от 1:100 до 1:400

Известно, что при разработке твердофазных иммуноферментных тест-систем необходимо определить физико-химические параметры, влияющие на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа [37, 41]. Данные параметры контролировали по изменению величин оптической плотности

конечного продукта реакции при варьировании различных параметров постановки реакции. Кроме того, оценивали значимость буферных и промывочных систем.

Фактором, лимитирующим чувствительность ИФА, является концентрация антигена, которая ограничивается поверхностью лунки планшета, сорбционной емкостью материала и существенно зависит от условий проведения процесса адсорбции.

Определение иммобилизованной концентрации очищенного антигена проводили в диапазоне от 1,0 мкг до 10,0 мкг на лунку. Результаты исследований показали, что зависимое от концентрации антигена связывание антител происходит в пределах от 5,0 до 9,0 мкг на лунку. При этих концентрациях иммобилизованного антигена изолинии выходили на прямую линию, что свидетельствует о достаточном покрытии поверхности лунок белком (рис. 3).

При разработке иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1 иммобилизацию антигена на планшеты проводили в течение 16-18 часов при 4°C в условиях бытового холодильника, на этапах инкубации исследуемой сыворотки крови утят и иммунопероксидазного конъюгата использовали время контакта 30 минут при температуре 37°C, что согласуется с литературными данными [41].

Важной задачей при разработке твердофазного варианта иммуноферментного анализа является максимальное снижение связывания конъюгата и других компонентов с поверхностью планшета. С этой целью при проведении анализа в промывочный буфер вводили неионный детергент (твин-20) в различной концентрации и хаотропные ионы типа Cl^- в высоких концентрациях.

Результаты экспериментов показали, что промывочный буфер 0,01 М ФСБ рН 7,3-7,5, содержащий 0,5 М NaCl с 0,1% конечной концентрацией детергента твин-20, подавляет неспецифическое взаимодействие. По данным литературы, аналогичные промывочные буферные системы большинство исследователей используют в реакциях ИФА [37,41].

Для определения диагностического титра в ИФА различные пробы сыворотки крови утят и уток титровали, начиная с разведения 1:100, при стандартной концентрации сорбированного антигена. Результаты исследований показали, что антиген вируса гепатита утят положительно связывался только со специфическими антителами и не взаимодействовал с антителами нормальной сыворотки крови утят и с антителами к другим вирусам. Разведение сыворотки 1:400 дает возможность не пропустить слабоположительные сыворотки. Сыворотки с титром антител 1:400 и выше считали положительными, ниже – отрицательными.

При обследовании утководческих хозяйств с целью проведения диагностических или мониторинговых исследований на вирусный гепатит утят, сыворотки крови следует тестировать, начиная с разведения 1:100, а разведение 1:400 считать диагностическим титром на вирусный гепатит утят типа 1.

По оптической плотности исследуемых проб сыворотки крови уток разной активности, положительной и отрицательной сыворотки были найдены коэффициенты линейной регрессии для $\lg S/P$ и $\lg T$. Высокое значение коэффициента корреляции наблюдалось для разведения сыворотки 1:400. Полученное таким образом уравнение линейной регрессии $\lg T = 1,36089 \lg (S/P) + 3,53062$, связывает S/P -отношение при разведении сыворотки 1:400 с конечным титром.

При определении рабочего разведения исследуемой сыворотки метод регрессионного анализа совпал с методом последовательного титрования сывороток крови при определении диагностического титра антител. Полученные нами данные по оценке титра антител по уравнению линейной регрессии согласуются с данными других исследователей, которые разрабатывали и оценивали непрямые ИФА-тесты при обнаружении трех классов антител (IgG, IgM и IgA) [111].

Достоверные результаты реакции с использованием разработанной тест-системы могут быть получены, если средняя ОП отрицательного контроля

находится в интервале от 0,075 до 0,165, а средняя ОП положительного контроля находится в интервале от 0,440 до 0,870.

Оценку чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы проводили в сравнении с реакцией нейтрализации. Сыворотки крови, исследуемые предложенным способом, были подобраны так, что все они были апробированы на наличие антител к вирусу гепатита утят в реакции нейтрализации.

Установлено, что иммуноферментная тест-система обладает специфичностью, поскольку сорбированный антиген вируса гепатита утят положительно связывался только со специфическими антителами гипериммунной сыворотки, сыворотки крови вакцинированных уток и суточных утят, полученных от вакцинированных родителей. Корреляция между результатами исследований сывороток крови разработанной тест-системой и реакцией нейтрализации составила 98%, 90% и 87%, соответственно. С отрицательными и гетерологичными сыворотками крови результаты в обоих тестах были отрицательными ($P < 0,05$), что согласуется с данными зарубежных исследователей [6, 109, 122, 151].

Оценку воспроизводимости результатов иммуноферментного анализа проводили путем двукратных (через 4 часа) исследований одних и тех же проб сыворотки крови утят. Установлено, что при исследовании проб сыворотки крови утят в одном разведении с использованием компонентов тест-системы одной серии для определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа получены воспроизводимые результаты.

Иммуноферментную тест-систему оценивали по стабильности ее компонентов при условии хранения в защищенном от света месте при температуре 4-8°C в течение 12 месяцев. Результаты исследований показали, что активность антигена вируса гепатита утят, сорбированного в лунках планшета для иммуноферментного анализа и активность контрольных сывороток и конъюгата сохраняется при хранении компонентов тест-системы в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

При постановке иммуноферментного анализа в одном разведении 1:400 результаты исследований показали, что положительную, отрицательную контрольные сыворотки крови после разведения 1:400, а также рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре минус 10°C в течение 15 суток (срок наблюдения). В течение срока годности размораживание допускается только один раз.

Таким образом, соблюдение данных режимов хранения компонентов иммуноферментной тест-системы дает возможность использовать ее на протяжении 12 месяцев и получать воспроизводимые результаты иммуноферментного анализа.

Эффективность применения иммуноферментной тест-системы изучали по динамике формирования антител у утят, вакцинированных однократно опытной серией вирусвакцины, разработанной во ВНИВИП в лабораторных условиях. Иммуноферментная тест-система выявляла специфические антитела в сыворотке крови утят уже на 7-е сутки после вакцинации, а на 30-е сутки наблюдали значительное увеличение уровня антител в сыворотке крови вакцинированных утят.

Изучение формирования поствакцинального иммунитета у уток в производственных условиях проводили путем серологических исследований проб сыворотки крови уток, полученных из ООО «Племзавод Благоварский», где применяют эмбриональную вирусвакцину против вирусного гепатита утят производства ВНИИЗЖ, в соответствии с утвержденной инструкцией по применению.

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови уток показали, что уровень антител в сыворотке крови невакцинированных уток был 1:530 ($P < 0,05$), а после вакцинации на 30-е сутки уровень специфических антител в сыворотке крови составил 1:4930 ($P < 0,05$). У 2 – суточных утят, полученных от вакцинированных родителей, средний титр антител в иммуноферментном анализе составил 1:1897 ($P < 0,05$), что обеспечивало защиту утят от заражения полевым вирусом.

Напряженность материнского иммунитета к вирусу гепатита утят у потомства в производственных условиях изучали путем проведения серологических исследований проб сыворотки крови утят и экстрактов желтка яиц, полученных от родителей, вакцинированных эмбриональной вирусвакциной производства ВНИИЗЖ согласно инструкции по применению (ООО «Племптице завод Благоварский»). Результаты исследований экстрактов желтка яиц и проб сыворотки крови утят показали, что средний титр специфических антител в экстрактах желтка яиц составил $1:3134 \pm 156$, а в сыворотке крови суточных утят – $1:2334 \pm 136$.

Данные кинетики материнских антител у потомства показали, что у суточных утят, материнский иммунитет, составил 100%. В сыворотках крови 3-х и 10-ти суточных утят количество положительно реагирующих проб составило 80,0 и 26,7% соответственно. У утят 20-ти суточного возраста положительно реагирующих проб сыворотки крови утят было 13,3%, что свидетельствует о постепенном распаде материнских антител в организме утят.

Регистрируемый уровень материнских антител в желтке яиц ($1:3134 \pm 156$) и в сыворотке крови суточных утят ($1:2334 \pm 136$) свидетельствует о том, что вакцина, применяемая в хозяйстве, иммуногенна и обеспечивает защиту молодняка от полевого вируса и потенциально увеличивает выживаемость потомства на ранних этапах жизни.

Таким образом, результаты апробации разработанной иммуноферментной тест-системы свидетельствуют о ее высокой чувствительности и специфичности при определении специфических антител в процессе ретроспективной диагностики и определения уровня поствакцинального иммунитета при вирусном гепатите утят типа 1.

4. Выводы

1. Отработан метод концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 штамма «ЗМ-УНИИП» из аллантаоисной вирусосодержащей жидкости с помощью молекулярно-ситовой хроматографии на МПС, позволяющий получить препарат со степенью очистки на 98-99%.

2. На основе очищенных IgG уток, выделенных из нормальной сыворотки крови, получен активный, специфичный и стабильный при хранении в жидком состоянии антивидовой иммунопероксидазный конъюгат.

3. Оптимизированы условия проведения иммуноферментного анализа, позволяющие получать достоверные результаты индикации специфических антител к антигену вирусного гепатита утят типа 1.

4. Разработана и апробирована иммуноферментная тест-система для определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1. Показана высокая чувствительность и специфичность метода. Сравнение титров антител в иммуноферментном анализе и в реакции нейтрализации показало высокую корреляцию их значений ($r = -1,0$).

5. Показана диагностическая ценность иммуноферментной тест-системы для определения специфических антител при проведении ретроспективной диагностики и определения уровня поствакцинального иммунитета при вирусном гепатите утят типа I.

6. На основании проведенных исследований разработаны Методические положения «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28. 08. 2018 г. Получено решение о выдаче патента на изобретение Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» от 19.02.2019 г. (заявка № 2018117226/15(026852).

4.1. Практические предложения

Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» от 25. 01. 2016 г. и Методические положения «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28. 08. 2018 г. рекомендованы для использования ветеринарными специалистами региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и сотрудниками научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Разработанная ИФА тест-система для выявления и определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1 используется при проведении научно-исследовательских работ во ВНИВИП, а также при проведении мониторинговых исследований сывороток крови уток из утководческих хозяйств Российской Федерации.

Материалы, изложенные в диссертационной работе, используются в учебном процессе высших учебных заведений ветеринарного направления и на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей, работающих в промышленном утководстве.

СОКРАЩЕНИЯ

АЭЭИ – аминоэтилэтиленимин

ВГУ – вирус гепатита утят

ВГУ-1 – вирусный гепатит утят типа I

ВСЖ – вируссодержащая жидкость

ВСМ – вируссодержащий материал

ИФА - иммуноферментный анализ

МФА - метод флуоресцирующих антител

МПС – макропористое стекло

ОП - оптическая плотность

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

РН - реакция нейтрализации

УЭ – утиные эмбрионы

ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатогенная доза

ЦПД – цитопатогенное действие

ЭЛД₅₀ – 50% эмбриональная летальная доза

CVs – коэффициент вариации

DAstV – duck astrovirus (астровирус уток)

DHAV – duck hepatitis A virus (A – Avihepatovirus) (вирус гепатита утят)

DHV-1 – duck virus hepatitis 1 (вирусный гепатит утят типа 1)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (твердофазный иммуноферментный анализ)

Ig – логарифм по основанию 10

IgA - иммуноглобулины класса А

IgM - иммуноглобулины класса М

IgG - иммуноглобулины класса G

RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction (полимеразно-цепная реакция с обратной транскрипцией)

Real-time-RT-PCR – полимеразно-цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени

Rz - чистота конъюгата

ФБРТ – фосфатно-буферный раствор твина-20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безрукавая, И.Ю. Вакцина против вирусного гепатита утят из штамма 3М / И.Ю. Безрукавая // Пути обеспечения ветеринарного благополучия в промышленном животноводстве. – Киев. Южное отделение ВАСХНИЛ, 1978. – С. 90.
2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: 3-е изд., перераб. и доп. / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э. А. Преображенская. – М.: Колос, 2013. – 248 с.
3. Березин, И.В. Новые направления развития ИФА / И.В. Березин, А.М. Егоров // Вест. АМН СССР. - 1987. - № 12. - С. 72-78.
4. Бирман, Б.Я. Антигенная активность двух новых штаммов вирусного гепатита утят / Б.Я. Бирман, О.А. Бабушко, В.С. Прудников [и др.] // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск. – 1999. – Т. 35. – № 4.1. – С. 14 – 15.
5. Бобровская, И.В., Ярыгина Е.И., Лукина В.А., Румянцева И.В., Еремец В.И., Самуйленко А.Я. Способ изготовления иммунопероксидазных конъюгатов // Патент РФ № 2202369. 1986. – 02 – 27.
6. Бондаренко, В. Иммуноферментный метод диагностики вирусного гепатита утят / В. Бондаренко // Вет. мед. Украины. - 1998. - № 6. - С. 38 – 39.
7. Борисова, М.С. Серологическая диагностика аденовирусного гепатита с тельцами - включениями гидроперикардита методом непрямого иммуноферментного анализа: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / М.С. Борисова. – СПб., 2013. - 23 с.
8. Брыкалов, А.В. Получение биопрепаратов на основе методов аффинной сорбции и иммобилизации: дис. ... д-ра хим. наук / А.В. Брыкалов. - 1993. - СПб. – 330 с.
9. Брыкалов, А.В. Новые композиционные носители для иммобилизации ферментов / А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева // Современные достижения биотехнологии: Материалы Всерос. конф. – Ставрополь, 1996. - С. 279.

10. Бубашко, О.А. Вирусный гепатит утят в Республике Беларусь и его профилактика / О.А. Бубашко // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005. – № 1. – С. 25 – 28.
11. Ванеева, Л.И. Разработка методов получения моноспецифических ингредиентов для ИФА / Л.И. Ванеева, Н.Ф. Янкина // ЖМЭИ. - 1989. - № 5. - С.50 – 55.
12. Васильев, А. В. Проблемы молекулярной биологии и патологии сельскохозяйственных животных // Сб. науч. трудов. – Москва, 1998. – Т. 113. – С.71.
13. Верховский, О.А. Иммуноферментные тест-системы для оценки иммунологического статуса птиц / О.А. Верховский, Т.А. Тимофеева, С.Л. Кальнов // Био. – 2004. – № 5. – С.31.
14. Вудворд, Д. Иммуобилизованные клетки и ферменты / Д. Вудворд. - М.: Мир, 1988. - 161с.
15. Гаврилова, Е.М. Иммуноферментный анализ / Е.М. Гаврилова, Б.В. Дзантиев, А.М. Егоров // Получение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине: тез. докл. 3-го Всерос. науч. симп. - Л., 1980. - С. 37 - 38.
16. Громов, И.Н. Влияние натрия тиосульфата на морфологический состав крови утят, вакцинированных против вирусного гепатита / И.Н. Громов, Д.Т. Соболев, А.М. Курилович // Исследования молодых ученых в решение проблем животноводства: Сб. ст. Междунар. науч.-практич. конф., г. Витебск, 22 – 23 мая 2001 г. – Витебск, 2001. – С. 55 – 56.
17. Гусякова, О.А. Иммуноферментный анализ: учеб. пособие / О.А. Гусякова. - Самара: ГОУ ВПО «Сам ГМУ Росздрава», 2010. – 32 с.
18. Демаков, Г.П. Ускоренная диагностика вирусного гепатита утят с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител / Г.П. Демаков // Профилактика и лечение с-х животных. – Пермь, 1975. – С. 13 - 17.

19. Дмитриев, Д.В. Непрямой метод иммуноферментного анализа в диагностике метапневмовирусной инфекции птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук // Д.В. Дмитриев. - СПб., 2010. – 21с.
20. Джумаев, Ш.Н. Разработка ИФА-тест системы для диагностики и мониторинга чумы мелких жвачных животных: автореф. дис. ... канд. биол. наук // Д.Ш. Нурмуродович. – Москва, 2011. – 23с.
21. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев [и др.] - М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
22. Ирза, В.Н. Эмбриональная вакцина против ВГУ / В.Н. Ирза, В.Ю. Фоменко, С.В. Глейзер [и др.] // Достижения в современном птицеводстве: исследования и инновации: материалы XVI конф. - Сергиев Посад, 2009. – С. 362 – 364.
23. Князев, В.П. Некоторые аспекты диагностики, лечения и специфической профилактики вирусных инфекций уток / В.П. Князев, О.В. Белорыбкина, С.Р. Кременчугская [и др.]. - Владимир, 2003. – 60 с.
24. Князев, В.П. Болезни водоплавающих птиц: монография / В.П. Князев. - Владимир, 2010. – 160с.
25. Князев, В.П. Вирусный гепатит утят (уток) / В.П. Князев. - Владимир, 2013. – 325с.
26. Конопатов, Ю.В. Основы иммунитета и кормление сельскохозяйственной птицы // Ю.В. Конопатов, Е.Е. Макеева. - СПб: Петролазер, 2000. – 120 с.
27. Кошеметов, Ж.К. Разработка иммуноферментного анализа для диагностики и индикации вирусов чумы крупного рогатого скота и оспы овец. // Итоги выполнения РНТП Ц0252 «Научно-техническое обеспечение и организация производства биотехнологической продукции в Республике Казахстан» на 2001-2005 гг.: матер. республиканского науч.-практич. семинара. - Астана, 2005. - С.146 - 151.

28. Курилович, А.М. Диагностика и профилактика вирусного гепатита утят / А.М. Курилович, В.С. Прудников, Б.Я // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск. – 1999. – Т. 35. – № 4.1. – С. 74 – 76.

29. Курилович, А.М. Влияние иммуностимуляторов на напряженность гуморального иммунитета у утят, вакцинированных против вирусного гепатита / А.М. Курилович // Сб. статей Междунар. науч.-практич. конф., г. Витебск, 22 – 23 мая 2001г. – Витебск, 2001. – С. 139 – 141.

30. Курилович, А.М. Влияние иммуностимуляторов на напряженность гуморального иммунитета и показатели иммунной реактивности организма у утят, вакцинированных против вирусного гепатита / А.М. Курилович, В.С. Прудников // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2002. - № 1. – С. 10 – 12.

31. Курилович, А.М. Иммуноморфогенез у утят, вакцинированных против вирусного гепатита, и влияние на него натрия тиосульфата: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. / А. М. Курилович. – Витебск, 2003. – 20 с.

32. Кэтти, Д. Получение меченых антител посредством связывания антигена с носителем, связывания антител с антигеном и метки ферментом или флуоресцентной краской с последующим освобождением антител / Д. Кэтти // Антитела 2. – М.: Мир, 1991. - С. 210 – 212.

33. Лезова, Т.А. Вирулицидная активность координационных соединений этиленмина в отношении вирусов / Т.А. Лезова, В.В. Михалишин // Актуальные проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: матер. Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2003. – С. 483 - 487.

34. Леонов, И.К. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа 1: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / И.К. Леонов. – Спб., 2017. – 23 с.

35. Малиновская, Г.В. Усовершенствование серологической диагностики вирусного гепатита утят и оценки поствакцинального иммунитета: автореф. ... канд. вет. наук / Г.В. Малиновская. – Минск, 1981. – 21 с.

36. Мамадалиев, С.М. Применение метода ИФА для обнаружения антигена вируса чумы крупного рогатого скота / С.М. Мамадалиев, В.М. Матвеева, Ж.К. Кошеметов // Биотехнология основа повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и растений: матер. Междунар. науч.-практич. конф. (Бишкек 15-16 сентября 2005 г.). – Бишкек, 2005.

37. Маслов, Д.В. Серологическая диагностика вирусного энтерита гусей методом иммуноферментного анализа: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Д.В. Маслов. – СПб, 2006. – 17 с.

38. Матвеева, В.М. Получение диагностических сывороток против вируса чумы КРС, пригодных для постановки в ИФА / В.М. Матвеева, Ж.К. Мамадалиев, А.М. Кошеметов [и др.] // Актуальные вопросы диагностики болезней животных. Спец. вып.: матер. второй междунар. конф. – Алматы, 2005. - С. 265 – 268.

39. Михайлов, А.О. Чувствительность парвовируса гусей к формальдегиду и димерэтиленимину / А.О. Михайлов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2009. - № 4. – С.104 – 106.

40. Нго, Г.Т. Иммуноферментный анализ / Г.Т. Нго, Г.Т, Ленхофор. – М.: 1988. – С.25 – 167.

41. Никитина, Н.В. Влияние физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа / Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов, А.С. Лисенкова // Ветеринарная практика. – 2012. - № 2 (57). – С.36 – 39.

42. Никитина, Н.В. Применение «сэндвич» варианта ИФА при метапневмовирусной инфекции птиц / Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов, А.С. Лисенкова // Перспективы развития агропромышленного комплекса России в условиях членства в ВТО: матер. междунар. конгр. – СПб, 2013. – С.226.

43. Никонова, З.Б. Разработка и применение методов диагностики метапневмовирусной инфекции птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02 / З.Б. Никонова. – Владимир, 2012. – 25 с.

44. Новицкая, И.В. Конструирование и очистка иммунопероксидазных конъюгатов для использования в иммуноферментном анализе / И.В. Новицкая,

Ю.С. Татаренко, И.М. Корсакова // Инфекция и иммунитет. - 2016. - Т. 6. - № 3. – С.79.

45. Отрыганьев, Г.К. Болезни эмбрионов птиц / Г.К. Отрыганьев, Б.Ф. Бессарабов, Ю.В. Исаев. - М.: Россельхозиздат, 1981. – 136 с.

46. Паникар, И.И. Вирусный гепатит утят и его профилактика / И.И. Паникар - М.: Россельхозиздат, 1987. – 63 с.

47. Паникар, И.И. Клинико-эпизоотологическая и патологоанатомическая диагностика вирусного гепатита утят, протекающего в ассоциации с другими болезнями / И.И. Паникар, А.Т. Налеза // Интенсификация производства: сб. науч. тр. – Харьков, 1991. – С. 87 -90.

48. Паникар, И.И. Напряженность материнского поствакцинального иммунитета и профилактика вирусного гепатита у утят / И.И. Паникар, А.И. Решетило // Вирусные болезни сельскохозяйственных животных: тез. докл. Всерос. науч.-произв. конф. – Владимир, 1995. – С. 274.

49. Паникар, И.И. Вирусный гепатит утят: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика / И.И. Паникар // Проблемы зооинженерии и ветеринарной медицины: сб. науч. ст., посвящ. 150-летию со дня основания Харьковского зооветеринарного ин-та. - Харьков, 2001. - № 9 (33).- Ч. 1. – С.24 – 27.

50. Прудников, В.С. Показатели иммунной реактивности утят раннего возраста, вакцинированных против вирусного гепатита с применением иммуностимуляторов // В.С. Прудников, А.М. Курилович, С.А. Большакова [др.] // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: тез. докл. Междунар. науч.-практич. конф. молодых ученых. – Мн., 2000. – С. 386 – 387.

51. Прудников, В.С. Иммуноморфогенез у утят, вакцинированных против вирусного гепатита, и влияние на него натрия тиосульфата // В.С. Прудников, И.Н. Громов, А.М. Курилович [и др.] // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск. – 2001. – Т. 37. – Ч. 2. – С. 74 – 76.

52. Прудников, В.С. Оценка иммунного статуса утят, вакцинированных против вирусного гепатита утят жидкой дивой вирус-вакциной из штамма

«КМИЭВ-16» совместно с натрия тиосульфатом // В.С. Прудников, Б.Я. Бирман, А.М. Курилович // Международный аграрный журнал. – 2001. - № 11. – С. 34 – 37.

53. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д.М. Мейл. - М.: Мир, 2000. – 592 с.

54. Сергеев, В.Д. Методические рекомендации по очистке и концентрированию аденовирусов птиц / В.Д. Сергеев, И.К. Рождественский. - Ленинград, 1988. – 30 с.

55. Серова, Н.Ю. Серологические методы диагностики в промышленном птицеводстве / Н.Ю. Серова // Балтийский форум ветеринарной медицины и продовольственной безопасности: тез. конф. – СПб, 2014. – С. 178.

56. Сконсманас, И.П. Скрытая форма вирусного гепатита утят / И.П. Сконсманас, И.И. Паникар // Птицеводство. – 1966. – № 7. - С. 30-31.

57. Стрельников, А.П. Патоморфологическая характеристика вирусного гепатита утят / А.П. Стрельников // Ветеринария. – 1964. – № 1. – С.57.

58. Стрельников, А.П. Патоморфология вирусного гепатита утят: автореф. дис. ... канд. вет. наук. / А.П. Стрельников. – М., 1964. – 22 с.

59. Сухоруков, А.М. Изучение сорбционных свойств полистироловых планшетов, используемых в иммуноферментном анализе / А.М. Сухоруков, А.М. Пономарева // ЖМЭИ. - 1987. - № 9. - С.18 – 22.

60. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных: учеб. пособие / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев и др. - М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.

61. Тарун, Е.И. Влияние иммобилизации антител и пероксидазных конъюгатов на их реакции: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Е.И. Тарун. – Минск, 1993. – 19 с.

62. Трефилов, Б.Б. Биологические свойства вакцинных штаммов вируса гепатита утят / Трефилов Б.Б., Леонов И.К. // Матер. междунар. конгр. – СПб, 2014. – С. 90 – 91.

63. Трефилов, Б.Б. Антигенная специфичность вакцинных штаммов вируса гепатита утят типа 1 / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина [и др.] //

Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 4. - С. 47 – 49.

64. Трефилов, Б.Б. Культуральные и антигенные свойства вируса гепатита утят / Б.Б. Трефилов, И.К. Леонов, Н.В. Никитина // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 4. – С. 35 – 38.

65. Трефилов, Б.Б. Кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, И.К. Леонов // Вопросы вирусологии. - 2018. - № 63(3). – С. 135 – 138.

66. Троценко, Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко [и др.] - М.: Колос, 2000. - С. 272.

67. Хлюстов, С.В. Применение ИФА в целях диагностирования ретровирусной инфекции при лейкозе КРС / С.В. Хлюстов, Н.Д. Коломнец, А.Г. Коломнец // Теоретические и практические вопросы ветеринарии. – 1981. - Т. 2. - С. 25 – 31.

68. Цинкернагель, Р. Основы иммунологии / Р. Цинкернагель. - М.: Мир, 2008. – 135 с.

69. Чард, Г. Радиоиммунологические методы / Г. Чард. – М: Мир, 1981. – 248 с.

70. Anchun C. Study on bivalent attenuated vaccines against DP and DVH (duck virus hepatitis) / C. Anchun, W. Mingshu [et al.] // Chin. J. Anim. Vet. Sci. – 1996. – № 5. – Vol. 27. – P. 27.

71. Anchun C. Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1 / C. Anchun, W. Mingshu, X. Hongyi [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2009. – V. 77. – P. 332 – 336.

72. Anderson P. A novel and rapid method to quantify cytolitic replication of picornaviruses in cell culture / P. Anderson, S. Alm, K. Edman [et al.] // J. Virol. Methods. – 2005. – V. 130. – P. 117 – 123.

73. Bidin Z. Diseases of Poultry / Z. Bidin // Zagreb: University of Zagreb, 2008.

74. Cantorero L.A. The adsorptive characteristics of protein for polystyrene and their significance in solid phase immunoassay / L.A. Cantorero, J.E. Butler, J.W. Osborne // *Anal. biochem.* - 1980. - V. 105. - P. 375 – 382.
75. Chen L. Simultaneous detection of duck hepatitis A virus types 1 and 3, and of duck astrovirus type 1, by multiplex RT-PCR/ L. Chen, M. Ma, R. Zhang [et al.] // *Virologi Sinica.* – 2014. - V. 29 (3). – P. 196 – 198.
76. Chen L.L. Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings / L.L. Chen, Q. Xu, R.H. Zhang [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2013. – V. 192. – P. 12 – 17.
77. Chen Y. Comparison of bush sophora root polysaccharide and its sulfate's anti-duck hepatitis A virus activity and mechanism. / Y.Chen, W Xiong, L. Zeng [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – V. 102. - P. 333–340.
78. Ding C. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1 / C. Ding, D. Zhang // *Virology.* – 2007. – V. 361. – P. 9 - 17.
79. Engvall E. Enzyme linked immunosorbent assay. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin antigen-coated tubes / E. Engvall, P. Perlmann // *J. Immunol.* - 1972. - V. 109. - № 1. - P.129 - 135.
80. Erfan A.M. Epidemiology and molecular characterisation of duck hepatitis A virus from different duck breeds in Egypt / A.M. Erfan, A.A. Selim, M.K. Moursi [et al.] // *J. Vet. Microbiol.* – 2015. – V. 177. – P. 347 – 352.
81. Fitzgerald J.E. Histopathologic changes induced with duck hepatitis virus in the developing chicken embryo/ J.E. Fitzgerald, L.E. Hanson, J. Simon // *Avian Dis.* – 1969. – V. 13. – N. 1. – P. 147.
82. Fu Y. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens / Y. Fu, M. Pan, X. Wang [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2008. – V. 131. – P. 247–257.
83. Fu Y.Z. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 / Y.Z. Fu, Z.Y. Chen, C.F. Li [et al.] // *J. Vet. Microbiol.* – 2012. – V. 160. – P. 314 – 318.

84. Gallacher J. Partially oxidized enzyme conjugates / J. Gallacher // Patent №GB 2067572. – 1981 – 07 – 30.
85. Gallacher J. Stabilization of indicators for detecting enzyme activity / J. Gallacher // Patent №US 4615972. – 1986 – 10 – 07.
86. Gough R.E. Studies with in-activated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks / R.E. Gough, D. Spackman // Avian Pathol. – 1981. – V. 10. – P. 471 – 479.
87. Gough, R.E. Duck hepatitis virus type I influenza in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) / R.E. Gough, A.S. Wallis and I // Vet. Rec. – 1986. – V. 119. – P. 602.
88. Gough R.E. Picornaviridae / R.E. Gough, M.S. McNulty // In Poultry Diseases, 6th Edition. Eds Pattison M., McMullin P.F., Bradbury J.M., Alexander D.J. Elsevier / Butterworth-Heinemann. – 2008. – P. 350 – 358.
89. Gu C.Q. Cytokine gene expression in the liver of ducklings infected with duck hepatitis virus – 1 JX strain / C.Q. Gu, C.Q. Xei, X.Y. Hu [et al.] // Poultry Science. – 2012. – V. 91. – P. 583 – 591.
90. Guo Y. Preliminary identifications of the duck hepatitis virus serotypes isolated in Beijing, China. Chin. / Y. Guo, W. Pan // J. Vet. Med. (Zhongguo Shouyi Zazhi). – 1984. – V. 10. – P. 2 – 3.
91. Hassan, N.I. Studies on properties of duck virus hepatitis vaccine / N.I. Hassan, E.A. El-Ebiary [et al.] // Ass. Vet. Med. J. – 1992. – Vol. 26. – P. 52.
92. Hu Q. A one-step duplex rRT-PCR assay for the simultaneous detection of duck hepatitis A virus genotypes 1 and 3. / Q. Hu, D. Zhu, G. Ma [et al.] // J. Virol. Methods. – 2016. – V. 236. – P. 207 – 214.
93. Hu X.Y. Studies on histopathological changes of inoculated ducklings with DHV – 1. / X.Y. Hu, G.F. Cheng, S.Q. Zhou [et al.] // J. Huazhong Agric. Univ. – 2000. – V. 19. - P. 48 – 50.
94. Jia H.Y. Study on the changes of serum cytokines in patients with chronic hepatitis C before and after IFN treatment / H.Y. Jia, J.F. Sheng // Modern Medical Health. – 2006. – V. 22. – P. 1919 – 1921.

95. Jin X. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China / X. Jin, W. Zhang, W.P. Zhang [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2008. – V. 85. – P. 595 – 598.
96. Kaleta E. F. Duck viral hepatitis type I vaccination: monitoring of the immune response with a microneutralization test in Pekin duck embryo kidney cell culture / E.F. Kaleta // *Avian Pathol.* – 1988. - V. 17. – P. 325 – 332.
97. Kang M. Protective efficacy of a bivalent live attenuated vaccine against duck hepatitis A virus types 1 and 3 in ducklings / M. Kang, J. H. Roh, H. K. Jang // *Vet. Microbiol.* – 2018. – V. 214. – P.108 – 112.
98. Kato K.W. Coupling Fab-fragment of rabbit anti-human Ig G antibody to galactosidase and highly sensitive immunoassay of human Ig G / K.W. Kato, V. Hamaguchi, M. Fukui // *FEBS Lett.* - 1975. - № 56. - P. 370.
99. Kim M.C. Molecular analysis of duck hepatitis virus type I reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae / M.C. Kim, Y.K. Kwon, S.J. Joh [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V. 87. – P. 3307 – 3316.
100. Kim M. C. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1 like isolates using multiplex polymerase chain reaction / M. C. Kim, Y. K. Kwon, S. J. Joh [et al.] // *Avian Pathol.* – 2008. - V. 37. - P. 171 – 177.
101. Levine P.P. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America / P.P. Levine, J. Fabricant // *Cornell Vet.* – 1950. – V. 40. – P. 71 – 86.
102. Li C.F. High yield expression of duck hepatitis A virus VP1 protein in *Escherichia coli*, and production and characterization of polyclonal antibody. / C.F. Li, Z.Y. Chen, C.C. Meng [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2013. – V. 191. – P. 69 – 75.
103. Li C.F. Rapid detection of duck hepatitis A virus genotype C using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification / C.F. Li, Z.Y. Chen, C.C. Meng [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2014. – V. 196. – P. 193 – 168.

104. Li X. Evidence of VP1 of duck hepatitis A type 1 virus as a target of neutralizing antibodies and involving receptor-binding activity / X. Li, R. Zhao, W. Lin [et al.] // *Virus Research*. - 2017. - V. 227. - P. 240-244.
105. Li J. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China / J. Li, Y. Bi, C. Chen [et al.] // *Virus Res.* – 2013. – V. 178. – P. 211 – 216.
106. Li K.P. Detection and differentiation of the vaccine strain and field isolates of duck hepatitis a virus type 1 using real-time RT-PCR and high-resolution melting assays / K.P. Li, S.C. Ou, J.H. Shien [et al.] // *Taiwan Veterinary Journal*. – 2015. – V. 41. – P. 1 – 7.
107. Lin S. L. Circulation and in vivo distribution of duck hepatitis A virus types 1 and 3 in infected ducklings / S. L. Lin, R. C. Cong, R. H. Zhang [et al.] // *Archives of Virology*. - 2016. - V. 161. - P. 405 – 416.
108. Liu G.Q. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) isolated from southeast China is related to isolated attenuation / G.Q. Liu, F. Wang, Z. Ni [et al.] // *Virus Res.* – 2008. – V. 137. – P. 137 – 141.
109. Liu M. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus 3 / M. Liu, T. Zhang, Y. Zhang [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2010. – V. 169. – P. 66 – 69.
110. Lowry O.M. Protein measurment with the folin-phenol reagent / O.M. Lowry, W. Rosenbrough, A. Farr, R.V. Randall // *J. Biol. Chem.* - 1951. - P.193 - 235.
111. Mao S. Development and evaluation of indirect ELISAs for the detection of IgG, IgM and IgA1 against duck hepatitis A virus 1 / S. Mao, X. Ou, D. Zhu [et al.] // *J. Virol. Methods*. - 2016. – V. 237. – P. 79 – 85.
112. Mohanty P.K. Detection of swine pox and buffalo pox viruses in cell culture using protein A – horseradisch peroxidase conjugate / P.K. Mohanty, P.C. Verme // *Acta. Virol.* - 1989. - V. 33. - №3. – P.290 – 296.
113. Nakane P.K. New method of conjugation / P.K. Nakane, A.A. Kawoi // *J. Histochem. Cytochem.* - 1974. - V. 22. - P. 1084 - 1091.

114. Nakane P.K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review / P.K. Nakane, A.G. Farr // *J. Immunol. Methods.* - 1981. - № 47. - P. 129 - 144.
115. Nygren H. Conjugation of horseradish peroxidase staphylococcus protein A with benzoquinone, gluteraldehyde or periodate as cross-linking reagents. A comparative study / H. Nygren, H.A. Hansson // *Histochem. Cytochem.* - 1981. - V. 29. - № 2. – P. 266 - 270.
116. Pan M. Duck hepatitis a virus possesses a distinct type IV internal ribosome entry site element of picornavirus / M. Pan, X. Yang, L. Zhou [et al.] // *Journal of virology.* – 2012. – V. 86(2). – P. 1129.
117. Parham M. Assay of peroxidase enzyme activity / Parham M., Warren W // Patent №US4596770. – 1986 – 06 – 24.
118. Potgieter L.N.D. Enzyme-linked immunosorbent assay using staphylococcal protein A for detecting virus antibodies / L.N.D. Potgieter, B.T. Rouse, T.A Webb-Martin // *Amer. J. Vet. Res.* – 1980. – V. 41. - № 6. – P. 978 – 980.
119. Ramadori G. Cytokines in the liver / G. Ramadori, T. Armburst // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2001. – V. 13. – P. 777 – 784.
120. Sandhu T. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus / T. Sandhu, B. Calnek, L. Zeman // *Avian Dis.* – 1992. – V. 36. – P. 932 – 936.
121. Schilow W.E. Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten des ELISA in der veterinarmedizinischen Virusdiagnostik / W.E. Schilow, V. Meyer // *Mh. Vet. Med.* - 1985. - № 40. - P.186-189.
122. Shen Y. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies / Y. Shen, A. Cheng, M. Wang [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2015. - V. 225. - P. 30-34.
123. Sheng X. D. Apoptosis induction in duck tissues during duck hepatitis A virus type 1 infection. / X. D. Sheng, W. P. Zhang, Q. R. Zhang [et al.] // *Poult. Sci.* – 2014. – V. 93. – P. 527–534.

124. Song C. Complete sequence and analysis of duck hepatitis virus type 1 strain FC64 / C. Song, X. Han, X. Qiu [et al.] // *Prog Vet Med.* - 2011. - V. 32. – P.17 – 20.
125. Song C. Effect of age on the pathogenesis of DHV-1 in Pekin ducks and on the innate immune responses of ducks to infection / C. Song, S. Yu, Y. Duan [et al.] // *Arch. Virol.* – 2014. – V. 159. – P.905 – 914.
126. Song C. Virulent and attenuated strains of duck hepatitis A virus elicit discordant innate immune responses in vivo / C. Song, Y. Liao, W. Gao [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2014. – V. 95. – P. 2716 – 2726.
127. Todd D. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as Astroviruses / D. Todd, V.J. Smyth, N.W. Ball [et al.] // *Avian Pathol.* – 2009. – V. 38. – P. 21 – 30.
128. Toth T.E. Humoral immune response of the duck to duckhepatitis virus: virus-neutralizing vs virus-precipitating antibodies / T. E. Toth, N.L. Norcross // *Avian Dis.* – 1981. – V. 25. – P. 17 – 28.
129. Tsai P.R.W.a.H.-J. Viral infections of waterfowl. In: Swayne, D. E., Larry, J.R.G., McDougald, R., Nolan, Lisa K., Suarez, David L., Nair, Venugopal L. (Eds.), *Diseases of Poultry*. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK. – 2013. - V. 13. – P. 417-463.
130. Tseng C.H. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus / C.H. Tseng, N.J. Knowles, H.J. Tsai // *Virus Res.* - 2007. - V. 123. - P. 190 – 203.
131. Van Weemann B.K. ELISA. Highlights of the present state of the art / B.K. Van Weemann // *J. Virol. methods.* - 1985. - V. 10. - №. 4. - P.371-378.
132. Voller A. The use of microplatelets test of ELISA in some infection diseases / A. Voller, D.E. Bidwell, A. Bartlett // *Proc. int. symp. immunoenz. techniques.* - Paris, 2-4 Apr. - 1975. - № 4. – 1975.
133. Vorde D.E. Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme antibody immunocomplexes for labelling. I. measurement of human

choriogonadotropin / D.E. Vorde, E.A. Sasse, R. Hursa // Clin. chem. - 1976. - V. 22. - № 8. - P.1372-1377.

134. Wada H. Composition for assaying hydrogen peroxide / H. Wada, Y. Kosaka // Patent № DE 3443415. – 1986 – 02 – 27.

135. Wang L. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis / L. Wang, M. Pan, Y. Fu [et al.] // Virus Genes. – 2008. – V. 37. – P. 52 – 59.

136. Wang W. Establishment and characterization of duck embryo epithelial (DEE) cell line and its use as a new approach toward DHAV-1 propagation and vaccine development / W. Wang, A. Said, Y. Wang [et al.] // Virus Research. – 2016. – V. 213. – P. 260 – 268.

137. Wang Y. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks / Y. Wang, S. Zhu, W. Hong [et al.] // J. Virol. Methods. – 2017. – V. 248. – P.172 – 176.

138. Wen X.J. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay / X.J. Wen, A.C. Cheng, M.S. Wang // Poult. Sci. – 2014. – V. 93. – P. 2184 – 2192.

139. Wilson M.B. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies / M.B. Wilson, P.K. Nakane // Biomed. Press. - 1978. - P.215 – 244.

140. Woolcock P.R. A plaque assay for duck hepatitis virus/ P.R. Woolcock, W.S.K. Chalmers, D. Davis // Avian Pathol. – 1982. – V. 11. – P. 607-610.

141. Woolcock P.R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks / P.R. Woolcock // Avian Pathol. – 1991. – V. 20. – P. 509 – 522.

142. Woolcock P.R. Duck virus hepatitis / P.R. Woolcock, G. Fabricant // In Diseases of Poultry, 9th. – Ames, Iowa, 1991. – P. 597 – 608.

143. Woolcock P.R. Duck hepatitis / P.R. Woolcock, J. Fabricant // In Diseases of Poultry, 10th, ed by B.W. Calnek. – Ames, Iowa, 1997. – P. 661-673.

144. Woolcock P.R. Duck hepatitis / P.R. Woolcock, Y.M. Saif, A.M. Fadly [et al.] // In: Diseases of Poultry, 12th Edition. - Ames, Iowa, 2008. - P. 373 - 384.

145. Woolcock P.R. Duck Virus Hepatitis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / P.R. Woolcock // [Электронный ресурс]. – 2010. URL:http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.03.08_DVH.pdf. (25.11.2017).
146. Yang M. Development and application of a one-step real-time Taqman RTPCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 / M. Yang, A. Cheng, M. Wang, H.Y. Xing // J. Virol. Methods. – 2008. – V. 153. – P. 55 – 60.
147. Yao F. Replication cycle of duck hepatitis A virus type 1 in duck embryonic hepatocytes / F. Yao, Y. Chen, J. Shi [et al.] // J. Virology. - 2016. – V. 491. – P. 73 – 78.
148. Yin F. Development and evaluation of an inactivated bivalent vaccine against duck viral hepatitis / F. Yin, J. Li, S. Zhang, M. [et. al] // J. Chinese J. Biotechnology. – 2015. – V. 31 (11). – P. 1579 – 1588.
149. Yun T. Development of a one-step real-time RT-PCR assay using a minor-groove-binding probe for the detection of duck Tembusu virus / T. Yun, Z. Ni, J. Hua, [et al.] // J. Virol. Methods. – 2012. – V. 181. - P. 148 – 154.
150. Zhang R.H. Identification of a conserved neutralizing linear B-cell epitope in the VP1 proteins of duck hepatitis A virus rype 1 and 3 / R.H. Zhang, G.M. Zhou, Y.H. Xin [et al.] // Vet. Microbiol. – 2015. – V. 180. – P. 196 – 204.
151. Zhao X. Studies on detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay / X. Zhao, R.M. Phillips, G. Li [et al.] // Avian Dis. - 1991. – V. 35. – P. 778 – 782.

ПРИЛОЖЕНИЕ

«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
птицеводства» - филиал Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский
научно-исследовательский и технологический институт птицеводства»
Российской академии наук

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ВНИВИП
К.С. Налбандян
«28» августа 2018 года.



**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА УТЯТ
ТИПА I МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
(методические положения)**

Санкт-Петербург 2018

В методических положениях «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» подробно изложено приготовление реагентов, проведение иммуноферментного анализа, регистрация и оценка результатов. Методические положения предназначены для ветврачей-вирусологов региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Методические положения разработали:

Трефилов Борис Борисович – доктор ветеринарных наук, заведующий отделом вирусологии и опухолевых болезней птиц «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук;

Никитина Нина Васильевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук;

Дмитриев Константин Юрьевич — младший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.

Рецензенты:

Бакулин Валерий Александрович – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»;

Святковский Александр Владимирович – кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией фармакологии и токсикологии «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.

Методические положения рассмотрены и утверждены на Ученом совете ВНИВИП (28.09.2018 г., протокол №1).

Оглавление

Стр.

1. НАЗНАЧЕНИЕ	90
2. СОСТАВ НАБОРА.....	90
3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ.....	99
3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ	92
3.1.1. Приготовление рабочих растворов.....	93
3.1.2. Контрольные образцы.....	93
3.1.3. Рабочий раствор конъюгата	93
3.1.4. Раствор хромогена.....	93
3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА	94
3.2.1. Постановка ИФА в одном разведении	94
3.2.6. Постановка ИФА методом титрования.....	95
4. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ.....	96
4.1. Визуальный способ учета.....	96
4.2. Инструментальный спектрофотометрический способ учета	97

Диагностическая иммуноферментная тест-система «ИФА-антитела ВГУ-1» представляет собой набор, основой которого являются очищенный антиген вируса гепатита утят типа 1, иммобилизованный на поверхности лунок полистиролового планшета. Основным свойством тест-системы является способность выявлять в сыворотке крови утят (уток) специфические антитела к вирусу гепатита утят типа 1 (ВГУ-1) за счёт их взаимодействия с антигеном, иммобилизованным на поверхности лунок планшета. Образование комплекса «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Один набор рассчитан на исследование 176 проб сыворотки крови уток при исследовании в одном разведении 1:400 или на 20 проб - при разведении сыворотки двукратным шагом от 1:100 до 1:12800. Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких исследований по мере поступления биологического материала.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для определения антител к возбудителю вирусного гепатита утят типа 1 в сыворотке крови утят (уток) и рекомендуется для серологического контроля за распространением вирусного гепатита утят и оценки поствакцинального иммунитета против данной болезни.

2. СОСТАВ НАБОРА

Иммуноспецифические компоненты:

К. 1 — положительная сыворотка крови утят, содержащая специфические антитела к ВГУ-1 (положительный контроль), разведенная 1:100 0,15М раствором хлорида натрия с содержанием 1% фетальной сыворотки, лиофилизированная в объеме 1,0 см³ — 1 ампула или флакон;

К. 2 — нормальная сыворотка крови утят, не содержащая антител к вирусу гепатита утят (отрицательный контроль), разведенная 1:100 0,15М раствором

хлорида натрия с содержанием 1% фетальной сыворотки, лиофилизированная в объеме 1,0 см³ - 1 ампула или флакон;

К. 3 — планшеты с адсорбированным в лунках очищенным инактивированным антигеном ВГУ-I – 2 планшета;

К. 4 — конъюгат (антитела к IgG уток, меченные пероксидазой хрена), жидкий в объеме 0,2 см³ – 1 флакон;

Неспецифические компоненты:

К. 5 — концентрат фосфатно-солевого буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых сывороток, антивидового конъюгата и межэтапных промывок в объеме 5,0 см³ – 1 флакон;

К. 6 – набор солей для приготовления фосфатно-цитратного буферного раствора в таблетке по 0,63 г, - 2 шт.

К. 7 – детергент твина-20 в объеме 5,0 см³ – 1 флакон;

К. 8 – ортофенилендиамин (ОФД) в таблетке по 5 мг, 2 шт.;

К. 9 – гидроперит в таблетке по 1,5 г – 1 шт.;

К. 10 – хлорид натрия, кристаллический порошок 22,0 г – 1 флакон.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

При работе с исследуемыми и контрольными сыворотками следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов).

Внимание! Несоблюдение описанных ниже требований может привести к неправильному результату исследований при проведении иммуноферментного анализа:

— для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%;

- хранить образцы при (2-8) °С не более 5 суток, а при длительном хранении - при минус (20±3) °С;
- сыворотки, содержащие взвешенные частицы, следует центрифугировать 10-15 мин при 1000 об/мин;
- нельзя использовать сыворотки с бактериальной и грибковой контаминацией, гемолизированные и гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию;
- все компоненты тест-системы перед постановкой ИФА необходимо выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре (18-25) °С;
- контрольные сыворотки, рабочий раствор конъюгата должны быть приготовлены за 15 мин до их использования;
- растворы ОФД и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Раствор ОФД до использования, хранить в темном месте;
- при постановке иммуноферментного анализа нельзя использовать компоненты из тест-систем разных серий или смешивать их при приготовлении растворов.
- посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами, так как они не содержат инфекционного агента. Их промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой;
- посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с ОФД, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой;
- пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода и хлорсодержащие дезинфицирующие средства.

3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

3.1.1. Приготовление рабочих растворов

Раствор № 1 – буферный раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток, антивидового конъюгата и межэтапных промывок. Содержимое флаконов К.5 и К.10 растворить в 750,0 см³ дистиллированной воды, рН 7,3-7,5. Затем добавить содержимое флакона К.7. Хранение: при (2-8) °С не более 10 суток.

Раствор № 2 – 1 таблетку фосфатно-цитратного буферного раствора (К.6) растворить в 10,0 см³ дистиллированной воды, рН 4,9-5,0. Готовить перед использованием.

Раствор №3 – 1 таблетку гидроперита (К.9) растворить в 45,0 см³ дистиллированной воды. Хранение: при (2-8) °С не более 10 суток.

Раствор № 4 – стоп - раствор. 1,0 см³ концентрированной серной кислоты (в наборе отсутствует) растворить в 10,0 см³ дистиллированной воды. Хранение: во флаконе из темного стекла при (18-25) °С не более одного месяца.

3.1.2. Контрольные образцы

Растворить контрольные сыворотки добавлением в ампулы (флаконы) К.1 и К.2 1,0 см³ раствора № 1. Тщательно перемешать. Готовить перед использованием.

3.1.3. Рабочий раствор конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуется использовать одноразовые наконечники для пипеток. 0,1 см³ конъюгата (К.4) растворить в 10,0 см³ раствора № 1, тщательно перемешать пипетированием. Раствор готовить непосредственно перед использованием! Хранению не подлежит.

3.1.4. Раствор субстратно-индикаторной смеси

Внимание! Раствор ОФД готовить в пластиковой ёмкости, непосредственно перед использованием! Использовать одноразовые наконечники для работы с ОФД.

1 таблетку ОФД (К.8) растворить в 10,0 см³ раствора № 2, перемешать до полного растворения и добавить 0,4 см³ раствора № 3. Хранению не подлежит.

3.1.5. Исследуемые образцы.

3.1.5.1. **Внимание!** При постановке ИФА в одном разведении все испытуемые и контрольные сыворотки (положительную и нормальную) развести 1:400 раствором № 1.

Для контрольных к 0,3 см³ раствора №1 добавить 0,1 см³ сыворотки крови уток, для испытуемых к 1,0 см³ раствора №1 добавить 0,0025 см³ сыворотки крови уток и трижды пипетировать, используя для каждой пробы новый наконечник.

3.1.5.2. **Внимание!** При постановке ИФА методом раститровки контрольные пробы сыворотки (положительная и нормальная), приготовленные по п. 3.1.2, разведены 1:100. Готовы к использованию. Все испытуемые пробы сыворотки крови уток развести 1:100 раствором №1. Для чего к 1,0 см³ раствора №1 добавить 0,01 см³ сыворотки крови и трижды пипетировать, используя для каждой пробы новый наконечник.

3.2. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

3.2.1. При постановке ИФА в одном разведении в лунки планшета А1, В1, С1 внести положительную сыворотку (положительный контроль), подготовленную по п.3.1.5.1 в объеме 0,1 см³. В лунки планшета D1, E1, F1 внести нормальную сыворотку (отрицательный контроль), подготовленную по п.3.1.5.1 в объеме 0,1 см³. Лунки G1-H1 внести раствор №1 по 0,1 см³ (контроль конъюгата). В остальные лунки планшета внести исследуемые пробы сыворотки крови, подготовленные по п.3.1.5.1 в объеме 0,1 см³. Планшет осторожно

встряхнуть для перемешивания содержимого, накрыть крышкой и инкубировать в термостате при 37 °С в течение 30 мин.

3.2.2. По окончании инкубации лунки планшета освободить от содержимого резким встряхиванием и трехкратно промыть раствором № 1 (200-300 мкл в каждую лунку). По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

3.2.3. Во все лунки планшета внести по 0,1 см³ (100 мкл) конъюгата в рабочем разведении.

Внимание! Для приготовления рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ёмкость и одноразовые наконечники. Планшет накрыть крышкой и инкубировать 30 минут при 37 °С. По окончании инкубации промыть планшет 3 раза промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

3.2.4. Приготовить раствор субстратно-индикаторной смеси (п. 3.1.4) и внести во все лунки по 0,1 см³ (100 мкл).

Внимание! Для приготовления субстратно-индикаторной смеси использовать пластиковую ёмкость и одноразовые наконечники. Планшет поместить на 5-10 мин в защищённое от света место при температуре (18-25) °С.

3.2.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 0,05 см³ (50 мкл) стоп-реагента и немедленно измерить оптическую плотность (ОП).

Внимание! Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

3.2.6. При постановке иммуноферментного анализа **методом титрования** во все лунки рядов планшета В1-В12...Н1-Н12 внести по 0,1 см³ (100 мкл) раствора №1.

В лунку планшета А1 внести нормальную сыворотку (отрицательный контроль), подготовленную по п. 3.1.5.2 в объеме 0,2 см³. В лунку планшета А2 внести положительную сыворотку, подготовленную по п. 3.1.5.2. в объеме 0,2 см³. В остальные лунки планшета А3-А12 внести испытуемые пробы, подготовленные по п. 3.1.5.2 в объеме 0,2 см³. Провести раститровку по вертикальным рядам А1-

H1...A12-H12 с разведения 1:100 до 1:12800, перенося 0,1 см³ в очередную лунку вертикального ряда. Из последних лунок H1-H12 удалить по 0,1 см³.

Планшет осторожно встряхнуть для перемешивания содержимого, накрыть крышкой и инкубировать в термостате при 37°C в течение 30 мин. Дальнейшую постановку ИФА проводят аналогично по п. 3.2.2. – 3.2.5.

4. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов ИФА проводят визуально (по интенсивности цветового окрашивания содержимого лунок планшета) или инструментально – с помощью спектрофотометра (ридера) с вертикальным лучом света при длине волны 492 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

4.1. При визуальном способе учета первоначально оценивают контрольные лунки: положительный контроль (положительная сыворотка) при раститровке окрашивается в желтый цвет различной интенсивности, отрицательный контроль (нормальная сыворотка) остается неокрашенным или незначительно желтеет. Затем сравнивают окраску содержимого лунок планшета испытуемых проб с окраской лунок отрицательного контроля.

Титром испытуемой сыворотки считается ее предельное разведение, при котором наблюдают видимое глазом цветовое окрашивание, более интенсивное по сравнению с отрицательным контролем. Титр контрольной положительной сыворотки должен быть не менее 1:800.

4.2. Инструментальный спектрофотометрический способ учета результатов может быть использован как при постановке ИФА в одном разведении, так и при раститровке сыворотки крови. Он позволяет количественно оценить титры специфических антител в исследуемых пробах путем измерения значений оптической плотности (ОП_{492 нм}).

При правильной постановке ИФА и использовании качественных компонентов набора среднее значение ОП отрицательного контроля в разведении 1:400 не должно превышать 0,200. Разница показателей средних значений

оптических плотностей положительного и отрицательного контролей в разведении 1:400 должна быть в диапазоне 0,340-0,980. Если полученные данные выходят за пределы этих значений, результаты считаются недостоверными и реакцию повторяют.

Расчет титра сыворотки по одному разведению (1:400) проводят по формуле, которая связывает S/P-отношение с конечным титром:

$$\lg T = 1,36 (\lg S/P) + 3,53$$

Расчет S/P-отношения:

$$S/P = \frac{\text{ОП}_{492} \text{ исследуемой пробы} - N}{P - N}, \text{ где}$$

P – среднее значение ОП₄₉₂ положительного контроля; *N* – среднее значение ОП₄₉₂ отрицательного контроля.

При постановке иммуноферментного анализа **методом титрования** конечным разведением исследуемой сыворотки считается последнее ее разведение, в котором ОП₄₉₂ превышает ОП₄₉₂ отрицательного контроля в 2,0-2,1 раза.

При постановке ИФА **в одном разведении** (инструментальном методе учета) пробы сыворотки крови, содержащие антитела в титре 1:398 и ниже считаются отрицательными, 1:398-1:436 – сомнительными, а 1:457 и выше – положительными.

При определении в сыворотках крови утят разных возрастных групп, невакцинированных против вирусного гепатита, специфических антител в титрах 1:400 и выше у более, чем 50% исследуемых проб, дает основание считать хозяйство стационарно неблагополучное по вирусному гепатиту утят типа 1.

Для подтверждения диагноза проводят вирусологические исследования по выделению вируса из патологического материала (сердце, почки, селезенка, печень, головной мозг).

Оценкой эффективности применения вакцины является определение концентрации в сыворотке крови привитых уток специфических антител в титрах не ниже, чем 1:400 у 80% вакцинированной птицы.