

На правах рукописи



ДМИТРИЕВ КОНСТАНТИН ЮРЬЕВИЧ

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

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Санкт-Петербург - 2020

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: **Никитина Нина Васильевна**, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии и ОБП «ВНИВИП»

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: **Ирза Виктор Николаевич**, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится 24 февраля 2021 года в 15-00 на заседании диссертационного совета Д 220.038.07 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, корпус факультета ветеринарной медицины.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайтах: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина» – <http://www.kubsau.ru> и ВАК – <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Диана Петровна Винокурова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В условиях сосредоточения на ограниченной территории разновозрастных групп 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 (Kim M. C. et al., 2006, 2008; Tseng C.H. et al., 2007; Jin X. et al., 2008; Wang M.S., 2008). Этот факт объясняется длительной персистенцией возбудителя в организме переболевшей птицы, его генетической вариабельностью, а также стационарным характером болезни (Паникар И.И., 2001; Бубашко О.А., 2005; Gough, R.E., 2008), 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 (Ramadori G. a Armburst T., 2001; Jia H. Y. a Sheng J. F., 2006; Bidin Z., 2008; Gu C.Q. et al., 2012) и высокой смертностью до 95% утят (Курилович А.М., 2003; Бубашко О.А., 2005; Князев В.П., 2010, 2013; Hu X.Y. et al., 2000; Jin X. et al., 2008; Woolcock P.R. et al., 2008; Li J. et al., 2013).

Болезнь часто протекает в ассоциации с вирусной и бактериальной инфекцией, поэтому основой успешной борьбы с болезнью является лабораторная диагностика (Князев В. П., 2013; Kim M. C. et al., 2008; Woolcock P.R, 2010).

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 (Sandhu T. et al., 1992; Kim M. C. et al., 2008; Wang L. et al., 2008; Yang M. et al., 2008).

В настоящее время для контроля уровня иммунного ответа многие исследователи успешно используют метод ELISA (Князев В. П., 2010, 2013; Zhao X. et al., 1991; Liu M et al., 2010; Shen Y. et al., 2015; Wang W. et al., 2016). Данный метод обладает специфичностью, высокой чувствительностью и в сочетании с быстротой анализа дает ему неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами (Верховский О.А. и др., 2004; Серова Н. Ю., 2014). 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 специфичного 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 (Ирза В.Н. и др., 2009; Fu Y. et al., 2008; Chen; L. et al., 2014; Wen X.J. et al., 2014; Hu Q. et al., 2016).

В Российской Федерации для серологической диагностики ВГУ-1 применяют высокоспецифичную реакцию нейтрализации (Князев В. П., 2010; Трефилов Б. Б. и др., 2015; Zhao X. et al., 1991). 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 вируссодержащей 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 вируссодержащей 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 ИФА по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам тест-системы. Проведены сравнительные исследования по определению специфических антител в сыворотке крови в ИФА и РН. 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 изучении 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, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

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.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

2.1. Материалы и методы

При выполнении работы использовали:

Вирус гепатита утят типа 1, штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП; инкубационное яйцо уток из фермерского хозяйства, эмбрионы уток, 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 «Nuclone», 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: фосфатно-солевой буфер и фосфатно-цитратный буфер ООО «Биолот»; натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233; перекись водорода ОАО «Татхимфармпрепараты»; твин - 20 (P7949), 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 (УЭ). Расчет инфекционного титра проводили по методу Reed L. J. & Muench H. (1938) и его величину 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.

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

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по общепринятой методике. Результаты РН оценивали по титру антител (β -вариант) и по вируснейтрализующей активности сыворотки (α - вариант).

Очистка вируса гепатита. Вируссодержащую инактивированную аллантоисную жидкость осаждали методом дифференциального центрифугирования с последующей гельфильтрацией на колонке с макропористым стеклом (МПС), марки 1000 ВГХ и уравнивали 0,01М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,3-7,5 (Сергеев В.Д., Рождественский И.К., 1988). Элюцию вируса осуществляли тем же буфером с использованием перистальтического насоса и прибора РЭППС-1М.

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

Иммуноглобулины G (IgG) получали из сыворотки крови клинически здоровых уток, свободных от антител к вирусу гепатита. Суммарные иммуноглобулины осаждали 30% раствором сернокислого аммония. Фракцию IgG выделяли методом гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200.

Антивидовые иммуноглобулины G получали на кроликах весом 2,5 – 3,0

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. Антивидовые IgG выделяли методом гельхроматографии на колонке с сефадексом G-200. Содержание белка определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Конъюгаты антител с пероксидазой (Serva, ФРГ) получали методом периодатного окисления по Wilson M.B., Nakane P.K. (1981) при совместной работе с ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

Иммуноанализ антител проводили методом непрямого варианта ИФА (Engvall E., Perlmann P., 1981) на 96-луночных полистироловых планшетах «Nunc», (Дания). В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин (Sigma).

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. Штаммы «ВГНКИ-К» и «ЗМ-УНИИП» вируса гепатита утят культивировали на развивающихся 10-12 – суточных утиных эмбрионах, а также в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Результаты исследований показали наибольшую степень репликации штаммов вируса в развивающихся утиных эмбрионах, причем штамм «ЗМ-УНИИП» вируса гепатита был более активным ($7,25 \pm 0,25 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$), что и послужило основанием для использования его в разработке иммуноферментной тест-системы.

2.2.1.2. Инактивация вируса гепатита утят аминоэтилэтиленимином.

В опытах по изучению чувствительности вируса гепатита утят к действию аминоэтилэтиленимина использовали эмбриональный вируссодержащий материал штамма «ЗМ-УНИИП» с инфекционным титром $7,5 \pm 0,1 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$. При обработке вируса АЭЭИ в концентрации 0,1% константа его скорости инактивации через 24 часа равнялась нулю ($\lg K=0$), что подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса.

Полноту инактивации вируса проверяли методом трехкратных пассажей на УЭ заражением в аллантаисную полость в объеме $0,2 \text{ см}^3$ при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. Отсутствие характерных изменений для вируса гепатита утят в эмбрионе и их гибели подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса.

2.2.1.3. Получение очищенного антигена вируса гепатита утят типа 1.

Вируссодержащую инактивированную аллантаисную 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 $5,0 \text{ см}^3$ 0,01 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и очищали гельфильтрацией на колонке с макропористым стеклом (МПС) марки 1000 ВГХ. Степень очистки вируса составила 98,7%, с концентрацией белка 60-80 мкг в $1,0 \text{ см}^3$. Высокая степень очистки препарата позволила использовать его для иммобилизации полистироловых планшет для ИФА 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 утятах 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 использовали РН. Титр вируснейтрализующих антител полученной гипериммунной сыворотки крови утят был $8,5 \pm 0,1 \log_2$, а 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. Фракцию IgG очищали методом гельхроматографии на колонке с сефадексом G-200, выход гомогенного IgG составил $10,5 \text{ мг/ см}^3$. Чистую фракцию IgG использовали для получения антивидовой сыворотки.

2.2.1.6. Получение 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 $3,0$ - $4,0 \lg_2$.

2.2.1.7. Получение и контроль иммунопероксидазного конъюгата.

Иммуноглобулины из антивидовой сыворотки выделяли путем трехкратного осаждения общей фракции иммуноглобулинов с помощью насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2 \text{ SO}_4$. Фракцию, содержащую иммуноглобулины G, очищали гельхроматографией на сефадексе G-200 и идентифицировали иммуноэлектрофорезом. Активность выделенных антивидовых IgG составила от $3,0$ - $4,0 \lg$, сравнимую с исходными сыворотками.

Конъюгацию антител с пероксидазой хрена проводили методом периодатного окисления. Конъюгат очищали от не связавшейся пероксидазы методом гельхроматографии на колонке с сефадексом G-200. Активность конъюгата оценивали в прямом методе ИФА, которая составила $1:12800$.

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

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 в основе многоэтапной постановки ИФА лежат специфическое и неспецифическое взаимодействия. 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.

Определение концентрации антигена. Концентрация вирусного антигена, иммобилизованного на полистироле, величина которая ограничивается поверхностью, сорбционной емкостью материала, существенно зависит от условий проведения процесса адсорбции и является одним из важных факторов, лимитирующих чувствительность ИФА.

Определение иммобилизованной концентрации очищенного антигена проводили в диапазоне от 1,0 мкг до 10 мкг на лунку. Сенсибилизирующая активность антигена была различной. 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 ОП и, как следствие, уменьшение чувствительности анализа за счет неспецифического взаимодействия.

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.

Определение времени и температуры иммобилизации антигена. Продолжительность инкубации и температуры на иммобилизацию антигена изучали с использованием оптимальной его концентрации в 0,01 М ФСБ, pH 7,3-7,5. Антиген ВГУ-1 сорбировали при 4° и 37° С в течение 18 и 2 часов. При данных режимах иммобилизации антигена ВГУ-1, определяемая величина ОП была практически одинаковой. Однако при температуре 37°C в течение 2 часов наблюдалось увеличение уровня неспецифического взаимодействия.

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.

Определение температуры и времени инкубации сыворотки с иммобилизованным антигеном вируса. Инкубацию сыворотки крови утят с иммобилизованным в оптимальной концентрации антигеном вируса гепатита проводили при температуре 37°C в течение 30, 45 и 60 минут. В таком же режиме проводили и инкубацию иммунопероксидазного конъюгата. Данные показали, что равновесие иммунного комплекса в системе наступает при температуре 37°C 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°C.

2.2.2.2. Определение специфичности разрабатываемой иммуноферментной тест-системы

Важной задачей при твердофазном варианте 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 ИФА носители.

Наиболее эффективным путем подавления связывания с носителем является проведение анализа в буфере, содержащем не ионные детергенты, в частности, твина-20. По мнению других исследователей, подобными свойствами обладают инертные белки в концентрациях 1-2% и высокие концентрации хаотропных ионов типа Cl^- .

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 показали, что промывочный буфер 0,01 М ФСБ рН 7,3-7,5, содержащий 0,5 М NaCl с 0,1% конечной концентрацией детергента твина-20 подавляет неспецифическое взаимодействие. Поэтому его использовали при разработке иммуноферментной тест-системы.

2.2.2.3. Определение диагностического титра в ИФА

С этой целью при оптимальных концентрациях и условиях взаимодействия компонентов разрабатываемой тест-системы были исследованы, предварительно

растворенные, 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 вирусам: к реовирусному теносиновиру кур, к вирусам инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни кур и 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.

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 был от 1:416 до 1:806. Сыворотки с титром антител 1:400 и выше считали положительными, ниже – отрицательными. Таким образом, при обследовании утководческих хозяйств на вирусный гепатит сыворотки следует тестировать, начиная с разведения 1:100, а разведение 1:400 считать диагностическим титром на вирусный гепатит утят типа I.

2.2.3. Расчет титра антител по одному разведению

Положительные пробы сыворотки крови уток разной активности титровали на иммуноферментном планшете (n=3). Величину S/P рассчитывали для разведений сывороток 1:200, 1:400 и 1:800 (табл.1). По показателям ОП исследуемых проб, специфической и нормальной сывороток проводили

регрессионный анализ и находили коэффициенты линейной регрессии для $\lg S/P$ и $\lg T$. Результаты регрессионного анализа представлены в табл. 1.

Таблица 1 – 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.

Данные, представленные в таблице 1, показали, что 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 1:400 с конечным титром. 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.

2.2.4. Оценка чувствительности и специфичности иммуоферментной тест-системы

С этой целью сыворотки крови уток исследовали в реакции нейтрализации в сравнении с разработанной тест-системой. Сыворотки, исследуемые предложенным способом, были подобраны так, что все они были апробированы на наличие антител к вирусу гепатита в РН. Тест нейтрализации является классическим тестом диагностики вирусных болезней, в том числе и вирусного гепатита утят. Результаты исследования сывороток крови уток в РН и ИФА представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Активность сывороток крови в реакции нейтрализации и иммуноферментной тест-системе (n = 3)

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови	Активность сывороток		Коэффициент корреляции, -г
		РН, log ₂	ИФА*	
1.	Гипериммунная сыворотка крови (положительный контроль)	9,0	3850	0,98
2.	Отрицательная сыворотка крови (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 от суточных утят, полученных от вакцинированных родителей	5,8	535	0,87
6.	Гетерологичные сыворотки крови к вирусам: - реовирусу кур - парвовирусу гусей	– –	145 173	– –

Примечание: * - титры антител в обратных величинах.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что разработанная иммуноферментная тест-система выявляла специфические антитела к вирусу гепатита утят в гипериммунной сыворотке, в пробах сыворотки у вакцинированных уток и у суточных утят, полученных от вакцинированных родителей.

Корреляция между результатами исследований сывороток крови разработанной тест-системой и РН 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.

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

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

Иммунизацию утят 14-суточного возраста, серонегативных к вирусу гепатита, осуществляли подкожным введением вакцины производства ВНИВИП в дозе 0,6 см³, внутримышечно. 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 представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Уровень специфических антител у привитых утят (n=8)

Наименования групп	Титр антител в ИФА, М±m				P≤
	Сроки после вакцинации, сут				
	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 в обратных величинах.

Данные, представленные в таблице 3 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).

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

2.2.5.2. 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 производства ВНИИЗЖ, согласно инструкции по применению. Для исследования были получены: сыворотка крови уток перед вакцинацией – 25 проб; сыворотка крови уток после вакцинации – 25 проб; сыворотка крови суточных утят, полученных от вакцинированных родителей – 25 проб. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты серологических исследований проб сыворотки крови уток в ИФА (n=25), P <0,05

№ п/п	Наименования групп	Обратная величина среднего титра	Число положительно реагирующих проб (ПР), %
1.	Сыворотка крови уток перед вакцинацией (возраст 140 дней)	530±54	100%
2.	Сыворотка крови от вакцинированных уток (возраст 170 дней)	4930±216	100%
3.	Сыворотка крови суточных утят, полученных от вакцинированных родителей	897±56	100%

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови уток показали, что средний титр специфических антител в сыворотке крови уток до вакцинации составил 530 (P <0,05). После вакцинации эмбриональной вирусвакциной производства ВНИИЗЖ уровень антител в сыворотке крови уток через 30 суток составил 4930 (P <0,05). У утят, полученных от вакцинированных родителей, средний титр антител в ИФА составил 897 (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.

4. Выводы

1. Оработан 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 ИФА, позволяющие получать достоверные результаты индикации специфических антител к антигену ВГУ-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 ИФА и в РН 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 1.

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. Получен патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU.

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.

6. Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Трефилов, Б.Б. Получение иммуноспецифических компонентов для иммуноферментного анализа при вирусном гепатите утят/ Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, **К.Ю. Дмитриев**, Л.И. Явдошак // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - СПб, 2017. - № 2. - С. 44-46.

2. Трефилов, Б.Б. Чувствительность и специфичность ИФА при выявлении антител к вирусу гепатита утят типа I/ Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, **К.Ю. Дмитриев** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - СПб, 2018. - № 1. - С. 30-34.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

3. Трефилов, Б.Б. Получение антигена вируса гепатита утят для иммуноферментного анализа / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, **К.Ю. Дмитриев** // Современные тенденции развития науки и технологий. - 2016. - № 3-1. - С. 84-86.

4. Трефилов, Б.Б. Вирусный гепатит утят типа I (эпизоотология, патогенез и диагностика) /Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, **К.Ю. Дмитриев**, М.М. Трубицын // Эффективное животноводство. - 2017. - № 3(133). - С. 16-17.

5. Трефилов Б.Б. Генетические маркеры вируса гепатита утят типа I / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, В.С. Бочкарев, Л.И. Явдошак, **К.Ю. Дмитриев** // Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования: сб. ст. по материалам V-VI Международной научно-практической конференции «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования». М., Изд. «Интернаука», 2017. – № 5-6(3). – С. 23-29.

6. Трефилов, Б.Б. Вирусный гепатит утят типа I/ Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошак, **К.Ю. Дмитриев**, М.М. Трубицын // European Journal of natural history, № 1, 2018. – С. 59-61.

7. **Дмитриев, К.Ю.** Чувствительность клеточных культур к вирусу гепатита утят типа I / К. Ю. Дмитриев // Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке: сб. ст. по материалам Международной научно-практической конференции «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке». Смоленск, Изд. «Наукофера». – 2018. – Часть 1. – С. 21-23.

8. **Дмитриев, К. Ю.** Оценка эффективности вакцинации против вирусного гепатита типа I методом иммуноферментного анализа/ Дмитриев К.Ю., Трефилов Б.Б., Никитина Н.В. // Материалы VI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве». – Екатеринбург, 2018. – С. 168-171.

9. **Дмитриев, К. Ю.** Иммуноферментная тест-система для определения антител в сыворотке крови к вирусу гепатита утят типа 1. / Дмитриев К.Ю., Никитина Н.В. // Эффективное животноводство. – 2020. - № 4. – С. 26-27