

Завьялова Е. А., Гулюкин М. И., Карпова М. А., Богданова П. Д., Дрошнев А. Е.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ (IPNV) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко» ФАНО России, 109428, г. Москва

Инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых рыб (IPN), вызываемый безоболочечным бирнавирусом, – одна из наиболее серьезных проблем лососеводства. В Российской Федерации утвержденным диагностическим методом является вирусыведение в чувствительных культурах клеток. В представленном исследовании показаны результаты разработки диагностического теста для выявления вируса IPN (IPNV) методом антигенсвязывающего иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА). Разработанный тест дополняет спектр диагностических методов и позволяет уточнять спорные результаты, полученные классическими методами.

Ключевые слова: *инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых; иммуноферментный анализ; лабораторная диагностика.*

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 42–45. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-42-45

Zavyalova E.A., Gulyukin M.I., Carpova M.A., Bogdanova P.D., Droshnev A.E.

IDENTIFICATION OF THE INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV) USING THE ENZYME IMMUNOASSAY

Ya.R. Kovalenko All-Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia

The infectious pancreatic necrosis (IPN) caused by a non-enveloped virus of the Birnaviridae family is one of the most important loss factors in the salmonid aquaculture. Virus isolation in the sensitive cell cultures has been approved in the Russian Federation as the diagnostic method for determination of IPNV antigen. This work gives the results of the development of the diagnostic test to reveal IPNV using the antigen-bound ELISA (sandwich ELISA). The developed test supplements a new diagnostic method and verifies some disputable results obtained with classical methods.

Key words: *infectious pancreatic necrosis (IPN); enzyme immunoassay; laboratory diagnosis.*

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 42–45. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-42-45

For correspondence: Elena Zavyalova, Candidate of biological Sciences; e-mail: aquazeda@mail.ru

Received 13.03.14

Вирус инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) – один из наиболее изученных патогенов рыб; он опасен для лососевых рыб, включая атлантического лосося (семгу), радужную, ручьевую и озерную форель. IPNV относится к роду *Aquabirnavirus* семейства Birnaviridae, группе вирусов, которые инфицируют рыбу и другие гидробионты [1]. Это достаточно мелкий безоболочечный вирус, имеющий икосаэдрический капсид диаметром около 60 нм, состоящий из 5 структурных полипептидов, внутри него заключен геном из двух сегментов двуцепочечной РНК (А и В). Капсид состоит из структурных белков разного размера: среднего полипептида VP2 (54 кДа) и маленького VP3 (31 кДа). Эти два протеина закодированы в сегмент А, который дополнительно кодирует неструктурные белки, а именно протеазу (VP4) и белок с невыясненной функцией VP5. Сегмент В – один большой полипептид VP1 (94 кДа) представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу [2].

Традиционными методами диагностики IPN во всем мире являются вирусыведение в культуре клеток и последующая серологическая идентификация со специфической сывороткой в реакции нейтрализации (РН). Дополнительно в диагностических лабораториях вирус выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции гемагглютинации или такими современными молекулярными методами, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) [3]. В будущем, возможно, молекулярные методы приобретут еще большее значение, по крайней мере для изучения генетического профиля вирусов и определения вирулентности [4].

За рубежом проблема IPN носит комплексный многогранный характер, но пока остается много нерешенных вопросов, касающихся резервуаров патогена, вертикальной и горизонтальной передачи, патогенности и вирулентности вируса, защиты рыб и взаимоотношений возбудитель–хозяин и т. п. [5].

В нашей стране первоочередной задачей является организация мониторинга, который позволит получить объективные данные о распространении данной болезни. Лабораторная диагностика болезни путем вирусыведения в культурах клеток сама по себе занимает много времени (от 21 до 31 дня), затратно, субъективна, так как зависит от качества применяемых культур клеток, а также опыта и компетенции специалиста, проводящего работу. Поэтому к ней прибегают только в двух-трех крупных научно-исследовательских институтах Центрального федерального округа, в результате официальная статистика недополучает данные о возникновении болезни в других субъектах РФ [5].

В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов отсутствуют диагностикумы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное высокую чувствительность, – тест-системы для выявления возбудителя IPN иммуноферментным методом (ИФА), которые могут быть использованы более широко – в региональных лабораториях ветеринарной службы. Кроме того, данная реакция может быть стандартизована, что, принимая во внимание серьезность мер, которые следуют в результате положительного диагноза, позволит максимально исключить возможность ошибки.

Для корреспонденции: Завьялова Елена Александровна, канд. биол. наук, зав. лабораторией ихтиопатологии; e-mail: aquazeda@mail.ru

По этой причине целью настоящего исследования является разработка диагностической тест-системы на основе сэндвич-ИФА для выявления вируса-возбудителя IPNV, позволяющей в течение 3 ч определить наличие антигена в вирусосодержащих препаратах и биологическом материале, а также дифференцировать его от вирусов других видов.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген IPNV из штамма N07-1, в качестве положительного контроля использовали культуральные вирусы IPNV, а также гетерологичные вирусы: VHSV – геморрагической септицемии лососевых, IHNV – инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ. Вирусы размножали в культурах клеток эпителиальной папилломы карпов EPC (ЕСАСС № 93120820) и гонады радужной форели OMG (патент РФ № 2495120).

Животные. Для получения гипериммунной сыворотки против IPNV использовали кроликов в возрасте 8–10 мес массой 3–3,5 кг. Иммунизацию проводили на опытной базе в Вышневолоцком филиале ВИЭВ (о. Лисий). По окончании опытов животных тотально обескровливали, предварительно наркотизировав эфиром, после чего умерщвляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 742 от 13.11.1984).

Антитела для сенсibilизации планшетов (антигенсвязывающие) и антигендетектирующие вирусспецифические кроличьи антитела к IPNV были получены в ходе настоящего исследования.

Неспецифические компоненты: субстрат – тетраметилбензидин (ТМБ), «стоп-раствор» – 2 М серная кислота, отмывочный фосфатно-солевой буфер с твином (ФСБ-Т), рН 7,4–7,6.

IgG выделяли из иммунных сывороток путем высаливания раствором сернокислого аммония с последующей гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка [6, 7].

Конъюгат специфических антител. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами выполняли ковалент-

ным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по методике Wilson и Nakane [8]. В качестве ферментативной метки использовали пероксидазу хрена (ПХ) RZ > 3,1.

Позитивный и негативный порог (ПНП) реакции рассчитывали по методу Snyder [9]. Сумма среднего значения и 2 стандартных отклонений являлась верхней границей отрицательных значений, а сумма среднего значения и 3 стандартных отклонений – нижней границей положительных значений.

РН ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с постоянной дозой вируса 100 ТЦД₅₀/0,1 см³. За титр вируснейтрализующих антител принимали конечное разведение сыворотки, которое полностью ингибировало цитопатическое действие (ЦПД) вируса. При исследовании патологического материала в РН брали деконтаминированную 10% суспензию, при этом идентификация вируса достигалась одновременно с его выделением на культуре клеток.

ПЦР. Суммарную РНК из вирусосодержащих образцов и биоматериала выделяли с помощью набора Рибо-преп («ИнтерЛабСервис», Москва). Подбор синтетических олигонуклеотидов проводили с использованием компьютерных программ Primer Select (Laser Gene 7.0) и Oligo 7.0 (США) на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и проанализированных с помощью пакета программ DNASTar Lasergene (США).

Результаты и обсуждение

Основная задача при разработке и производстве иммунобиологических препаратов – получение высокоактивных и специфичных иммунных сывороток. Это сложный многоэтапный процесс, который зависит от выбора рациональной схемы иммунизации, включающей дозы, способы, интервалы и кратность введения антигена, продолжительности иммунизации, которые находятся в тесном взаимодействии. Поэтому на первом этапе исследования определяли оптимальные соотношения этих факторов для получения сывороток с высоким титром за сравнительно короткий срок.

Таблица 1

Схемы опытов по получению антисыворотки против IPNV

Схема/количество белка	№ инъекции	Интервал между инъекциями, сутки	Объем антигена, см ³	Область введения	Способ введения	Присутствие адьюванта, адьювант: антиген	Титр антител (n = 5)
№ 1/1540 мкг/см ³	1	-	1	Бедро	в/м	ПАФ 1:1	1:256
	2	7	1,5	Ухо	в/в	-	
	3	7	1,5	"	в/в	-	
	4	7	1,5	"	в/в	-	1:512
	5	21	1,5	"	в/в	-	
	6	7	1,5	"	в/в	-	
	7	7	1,5	"	в/в	-	
№ 2/500 мкг/см ³	1	-	2,0	Спина	п/к	ПАФ 1:1	1:1400
	2	5	0,5	Ухо	в/в	-	
	3	5	1,0	"	в/в	-	1:1600
	4	5	2,0	Спина	п/к	ПАФ 1:2	
	5	5	1,5	Ухо	в/в	-	
	6	5	2,0	"	в/в	-	
№ 3/500 мкг/см ³	1	-	1,0	Спина	п/к	-	1:1400
	2	7	1,5	"	п/к	ПАФ 1:1	
	3	7	2,0	"	п/к	НАФ 1:1	1:2048
	4	7	1,0	Ухо	в/в	-	
	5	7	1,5	"	в/в	-	

Примечание. в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно; п/к – подкожно.

Иммунизацию кроликов выполняли по 3 схемам (табл. 1), различающимся количеством вводимого белка и интервалами между инъекциями. Опыты проведены не одновременно, а последовательно, в середине каждого опыта делали пробный забор крови для определения титра антител в РН, тотально обескровливали животных через 7 дней после последней инъекции.

В результате по схеме № 1 через 56 дней была получена сыворотка с титром после 7 инъекций 1:512 в РН ($n = 5$). Сейчас данная сыворотка используется в лаборатории для диагностических работ, однако за счет небольшого титра ее не применяли как сырье для конструирования иммунобиологического препарата.

В последующих опытах схема введения антигена была изменена, поскольку известно, что уровень продукции вируснейтрализующих антител можно повысить постепенным увеличением белка в прививочной дозе и многократным введением адъювантов, а на качество сывороток влияет число инъекций и продолжительность иммунизации. Для стимуляции иммуногенеза применяли полный (ПАФ) и неполный адъювант Фрейнда (НАФ), а также комбинированное – внутривенное и подкожное введение антигена для активации разных звеньев иммунитета.

Доза белка была снижена до 500 мкг/см³ с постепенным увеличением объема вводимого антигена от 0,5 до 2,0 см³, дополнительно в схеме № 2 были сокращены интервалы между инъекциями до 5 дней, а в схеме № 3 уменьшено количество инъекций до 5. В результате получены сыворотки, в которых титр вируснейтрализующих антител значительно выше – 1:1600 и 1:2048 ($n = 5$) по схемам № 2 и 3 соответственно.

Таким образом, была разработана схема иммунизации кроликов, позволившая получить специфичные антисыворотки против IPNV с высоким титром антител, которые в последующем были использованы для получения

иммунологических реагентов: IgG для сорбции планшетов и конъюгата.

Очищенные антитела сорбировали на планшет в карбонат-бикарбонатном буфере и методом шахматного титрования подбирали концентрацию специфических IgG и рабочее разведение конъюгата. Для оптимизации реакции, увеличения точности и чувствительности метода определяли оптимальный диапазон оптической плотности (ОП), оптимальное рабочее разведение вирусспецифических антител, при котором наблюдалась максимальная разница между средними значениями ОП положительных и отрицательных контролей, а также диагностические характеристики метода.

Для поиска оптимального соотношения иммуноглобулинов к ПХ конъюгирование проводили в нескольких вариантах: на начальном этапе как 4 ПХ:1 IgG исходя из молекулярной массы биомолекул (ПХ- 40 кДа, IgG в пределах 160 кДа), 2 ПХ:1 IgG как в наиболее распространенных протоколах [10]. Однако в обоих случаях конъюгат вызывал развитие неспецифических фоновых реакций, а блокирование непрореагировавших альдегидных групп пероксидазы боргидритом натрия приводило к снижению чувствительности реакции. Впоследствии эмпирически была подобрана концентрация 1 ПХ:2 IgG, которая высокоэффективно взаимодействовала с антигеном IPNV с образованием минимального фона реакции в рабочем разведении 1:30 000.

Для определения концентрации антигенсвязывающих антител, сенсibilизированных на планшеты, их титровали с положительными и отрицательными контролями. Разведения антител начиная с концентрации 100 мкг/мл с шагом 10 адсорбировали в лунках планшет в течение 18 ч при 4°C. В 5-кратно отмытые ФСБ-Т и высушенные планшеты добавляли по 100 мкл положительных и отрицательных образцов, планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре (20–22°C), после чего промывали. Добавляли конъюгат в объеме 100 мкл на лунку, инкубировали, промывали. Реакцию проявляли субстратным раствором ТМБ 25 мин и после остановки 2 М серной кислотой измеряли значения ОП при длине волны 450 нм.

Оптимальное разведение антител, обеспечивающее достаточное различие результатов с положительными и контрольными образцами, составило 20 мкг/мл.

Для определения ПНП реакции в ИФА титровали 120 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,012 оптической единицы (о. е.), что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение ОП образцов, которое составило 0,230 о. е., и прибавляли удвоенное значение стандартного отклонения 0,012 о. е. ПНП, представленный в виде прямой, отражал верхнюю границу отрицательных величин 0,254 о. е., а ОП, соответствующая наименьшему положительному значению, равнялась 0,545 о. е.

Для определения чувствительности тест-системы проводили титрование 3 штаммов IPNV с инфекционной активностью $10^{8,20-8,50} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. Минимальное значение ОП, при котором результат был положительным, составило 0,62 о. е., что соответствует титру вируса $10^{2,0} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

В тесте на воспроизводимость определяли статистические характеристики для положительных и отрицательных контрольных

Таблица 2

Выявление антигена IPNV методами ИФА, РН и ПЦР

Испытуемый материал	ИФА		Результат РН	Результат ОТ-ПЦР
	ОП, о. е.	результат		
1 IPNV штамм Ab (ATCC 13-19, референсный)	1,376	+	+	+
2 IPNV штамм GP01	1,079	+	+	+
3 IPNV штамм VT06	1,214	+	+	+
4 IPNV штамм SK07	1,406	+	+	+
5 IPNV штамм RKT09	1,622	+	+	+
6 IPNV штамм G2/11	1,962	+	+	+
7 IHNV штамм KKK10	0,253	-	-	-
8 VHSV штамм S7/10	0,229	-	-	-
9 Гомогенат внутренних органов семги	0,205	-	-	-
10 Гомогенат внутренних органов карпа	0,207	-	-	-
11 Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV(естественная инфекция)	1,333	+	+	+
12 Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV(экспериментальное заражение)	1,412	+	+	+
13 <i>Yersinia ruckeri</i> штамм RMS10-7/3	0,230	-	-	-
14 Культура клеток EPC	0,209	-	-	-
15 Культура клеток OMG	0,205	-	-	-

Примечание. № 1–4 – гомологичные вирусы, разные штаммы, хранившиеся в лиофилизированном виде; № 5, 6 – гомологичные вирусы после пассажа в культуре клеток, нативные; № 7, 8 – гетерологичные вирусы после пассажа в культуре клеток, нативные; № 9–12 – пробы внутренних органов разных видов рыб; № 13 – суспензия бактериальных клеток; № 14, 15 – неинфицированные культуры клеток.

препаратов при исследовании их в 5 повторностях. Показано, что взаимодействие тест-системы с препаратами гетерологичных вирусов и неинфицированными клетками/тканями было на уровне фона. При этом коэффициент вариации между лунками на планшете составил 2–4%, между отдельными планшетами он не превышал 4%, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности сэндвич-ИФА.

На следующем этапе оценивали возможность разработанной тест-системы выявлять искомый антиген в биологическом материале.

Сравнительная оценка обнаружения IPNV-антигена методами ИФА, РН и обратнотранскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) представлена в табл. 2.

Полученные данные позволяют утверждать, что разработанная тест-система специфично выявляет IPNV в нативной и лиофилизированной культуральной жидкости зараженных клеток, а также в биологическом материале от естественно и искусственно инфицированных рыб.

При сравнительном исследовании материала тремя методами на наличие вируса IPN отмечена корреляция показателей. Однако при исследовании в РН биологического материала (гомогенизированных органов форели) результат был получен через 10 дней одновременно с выделением вируса в культуре клеток, что, несомненно, увеличивает время диагностики. При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, в пробах, отрицательных по результатам ИФА и РН, вирус не обнаруживали. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

Таким образом, нами разработана тест-система на основе сэндвич-ИФА, в которой в качестве антигенсвязывающих и антигендетектирующих антител были использованы кроличьи антитела к вирусу IPN. Диагностику позволяет специфично выявлять IPNV в титре $10^{2.0}$ ТЦД_{50/см³ и выше, при этом данные положительно коррелируют с результатами, полученными в РН и ОТ-ПЦР, следовательно, разработанная тест-система может быть применена для выявления IPNV при скрининговых исследованиях или в дополнение к другим диагностическим методам.}

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 8, 9 см. REFERENCES)

- Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломьцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России (2001–2011 гг.). *Ветеринария*. 2011; 8: 3–7.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Издательство «Мир»; 1991.
- Северин С.Е., Соловьева Г.А., ред. *Практикум по биохимии*. М.: Издательство МГУ; 1989.
- Остерман Л.А. *Хроматография белков и нуклеиновых кислот*. М.: Издательство «Наука»; 1985.

REFERENCES

- Johansen L.H., Sommer A.I. Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolt affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 2001; 47(2): 109–17.
- Pedersen T., Skjesol A., Jørgensen J.B. VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interact with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J. Virol.* 2007; 81(12): 6652–63.
- OIE Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 5th edition. 2006.
- Evensen Ø., Skjelstad B., Rimstad E., Brun E., Johansen L.H., Stagg R. et al. *IPN in salmonids. A review*. The Fisheries and Aquaculture Industries Research Fund (FHIF); 2003.
- Gulyukin M.I., Zav'yalova E.A., Droshnev A.E., Kolomytsev S.A. The analysis of epizootic diseases of fish in Russia (2001–2011). *Veterinariya*. 2011; 8: 3–7. (in Russian)
- Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K. *Handbook of Biochemist [Spravochnik biokhimiya]*. Moscow: Izdatel'stvo «Mir»; 1991. (in Russian)
- Severin S.E., Solov'eva G.A., eds. *Workshop on Biochemistry [Praktikum po biokhimii]*. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 1989. (in Russian)
- Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., eds. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Vienna, Austria: Elsevier/North-Holland; 1978; 215–44.
- Van der Marel P., Snyder D.B., Luticken D. Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1990; 97(2): 81–3.
- Osterman L.A. *Chromatography of Proteins and Nucleic Acids [Khromatografiya belkov i nukleinovyykh kislot]*. Moscow: Izdatel'stvo «Наука»; 1985. (in Russian)

Поступила 13.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.81.083.2

Гулий О. И.¹⁻³, Караваева О.А.¹, Великов В. А.^{1,4}, Соколов О. И.¹, Павлий С.А.⁴, Ларионова О.С.², Буров А. М.¹, Игнатов О. В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ БАКТЕРИОФАГА ФАВ-SP7 НА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP7

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН, Саратов; ²ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова»; ³ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт»;

⁴ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского»

Из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 выделен бактериофаг ФАВ-Sp7. Описана его морфология, дана характеристика «негативных колоний» бактериального газона, определен диапазон литического действия в отношении других штаммов и видов азоспирилл. Выделена ДНК фага, проведен ее электрофоретический и рестрикционный анализ, определен размер генома, который составляет примерно 50 тыс. пар нуклеотидов. Проведено электронно-микроскопическое изучение адсорбции выделенного бактериофага ФАВ-Sp7 на поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*; бактериофаг; электрофорез; ДНК; электронная микроскопия; адсорбция.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 45–48. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-45-48

Для корреспонденции: Гулий Ольга Ивановна, д-р. биол. наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: guliy_olga@mail.ru