

Карпова Марианна Алексеевна

**Разработка тест-системы
для выявления вируса инфекционного некроза
поджелудочной железы лососевых (IPNV)
иммуноферментным методом**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология;
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко»

Научные руководители: академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ Гулюкин Михаил Иванович и кандидат биологических наук Завьялова Елена Александровна

Официальные оппоненты:

Ларичев Виктор Филиппович, доктор медицинских наук, лаборатория биологии и индикации арбовирусов Подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, ведущий научный сотрудник

Бычкова Лариса Ивановна, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (ПКУ)», доцент кафедры

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ ««Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы исследования

Сельское хозяйство — неотъемлемая часть всей экономики страны, которая обеспечивает сырьем предприятия легкой и пищевой промышленности, является главным источником продовольствия. В условиях действующих санкций и обеспечения продовольственной безопасности страны, роль сельского хозяйства в современной экономике постоянно возрастает. От развития агропромышленного комплекса напрямую зависит жизненный уровень и благосостояние населения. В 2016 году доля аграрного сектора в структуре ВВП страны выросла до 3,9 %, что на 0,4% больше, чем годом ранее (Федеральная служба государственной статистики). Этот показатель является самым высоким после кризиса 2008–2009 годов. Одной из важнейших отраслей сельского хозяйства является аквакультура (Алексеев А.П., 2009). По данным ФАО, в общемировом объёме пищевой рыбы на долю выращиваемых биообъектов приходится почти половина. Ежегодно растет объем рыбодобываемой продукции. В связи с этим в процессе культивирования гидробионтов особенно актуальна борьба с инфекционными заболеваниями (St-Hilaire, 2002). Разнообразие заболеваний оборачивается серьезными экономическими и экологическими проблемами для народного хозяйства (Murray and Peeler, 2005). В России необходимо независимое производство сельскохозяйственной продукции, включая развитие внутреннего производства аквакультуры. Важнейшими государственными документами, которыми руководствуются рыбодобытчики страны, являются Продовольственная доктрина РФ, Государственная программа развития сельского хозяйства и Стратегия развития аквакультуры в РФ на период до 2020 года.

Однако интенсификация аквакультуры ставит ряд трудноразрешимых задач перед ветеринарной медициной в плане эффективной системы выявления, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, поражающих все возрастные группы рыб из-за высокой концентрации 8 поголовья на ограниченной площади, нарушения естественного баланса окружающей среды, нарушения режима выращивания, технологических стрессов и других условий (Мухина Л.Б., 2004).

Одно из опаснейших заболеваний — инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых (Infectious pancreatic necrosis, IPN) — высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая молодь культивируемых лососевых и некоторых других семейств, обитающих как в пресной, так и в морской воде (OIE, 2006; Ariel and Olesen, 2002; LaPatra S.E., 2013; Ortega C., 2016). Вызывает до 90% гибели поголовья в условиях индустриального рыбоводства. Против IPNV нет адекватной терапии (кроме уничтожения зараженной рыбы). Клинически IPN расценен как самое серьезное заболевание в производстве лососевых. Вирус нередко циркулирует в популяциях годами, не вызывая эпизоотии (Van Regenmortel et al., 2000).

В 2001 году впервые в России от мальков семги, полученных из оплодотворенной икры, завезенной из Норвегии, и в культуре клеток сердца кеты был выделен вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, представитель семейства *Birnaviridae* (Пичугина Т.Д. с соавт., 2005а). На сегодняшний день исследования, проводимые на культурах клеток, являются «золотым стандартом» в выделении и идентификации возбудителей вирусных заболеваний, незаменимым в таких областях биологических наук как цитология, вирусология, биотехнология (Gamil A.A., 2015). Применение в вирусологической практике клеточных линий позволило узнать биологию вирусов, понять взаимодействие с клеткой, изучить этиологию вирусных болезней, а так же помогло при создании противовирусных препаратов (Wolf K. et.al., 1980; Sasson A., 1987; Животная клетка в культуре, 2000).

Традиционными диагностическими методами на IPN во всем мире являются вирусывыделение в культуре клеток и последующая серологическая идентификация со специфической сывороткой в реакции нейтрализации. Дополнительно в диагностических лабораториях вирус, выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции гемагглютинации или современными молекулярными методами, такими как ПЦР (ОИЕ, 2006). В будущем, возможно, молекулярные методы приобретут еще большее значение, по крайней мере, для изучения генетического профиля вирусов и определения вирулентности (Evensen O., 2003).

За рубежом проблема IPN носит комплексный многогранный характер. Пока еще остается много нерешенных вопросов о резервуарах патогена, вертикальной и горизонтальной передаче, патогенности и вирулентности вируса, защите рыб, взаимоотношениях «возбудитель-хозяин» и т.п. (Evensen O., 2003).

В нашей стране первоочередной задачей является организация мониторинга, который позволит получать объективные данные о распространении данной болезни. Лабораторная диагностика болезни путем вирусывыделения в культурах клеток сама по себе занимает много времени (от 21 до 31 дня), затратна, субъективна, так как зависит от качества применяемых культур клеток, а также опыта и компетенции специалиста проводящего работу. Поэтому выполняется только в двух-трех крупных научно-исследовательских институтах Центрального региона страны, следовательно, официальная статистика недополучает данные о возникновении болезни в других субъектах Федерации (Гулюкин М.И. и др., 2011).

В последние годы в диагностике вирусных болезней человека и животных широко используется иммуноферментный анализ (ИФА). Его главные достоинства — высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других серологических методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти полностью автоматизировать процесс выявления антигенов без использования культур клеток.

1.2. Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлась разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя IPN рыб методом иммуноферментного анализа.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Выбрать криопротектор для хранения вируса в лиофилизированном виде. Изучить чувствительность разных культур клеток рыб и влияние рН на жизнеспособность вируса.
2. Получить перевиваемую линию клеток и определить ее чувствительность к вирусам различных таксономических групп.
3. Разработать метод получения очищенного и концентрированного вируса IPN, обеспечивающий максимальную чувствительность и специфичность тест-системы.
4. Получить иммуноспецифические компоненты: антиген, гиперимунные сыворотки и специфичные иммуноглобулины к вирусу IPN.
5. Получить иммунопероксидазный конъюгат.
6. Определить оптимальные условия постановки ИФА.
7. Определить чувствительность и специфичность тест-системы в сравнении с другими способами диагностики: выделение в культуре клеток, реакция нейтрализации и ПЦР.
8. Испытать тест-систему в практических условиях в некоторых лососеводческих хозяйствах РФ.

1.3. Степень разработанности темы исследования

Изучению вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых в России посвящены работы А.И. Канаева (1973), Т.Д. Пичугиной (2005) и Е.А. Завьяловой (2005, 2006, 2013), в которых представлены результаты изучения некоторых морфобиологических свойств вируса и частично раскрыты механизмы развития заболевания. В работах Т.Д. Пичугиной и Е.А. Завьяловой показаны возможности воспроизведения *in vivo* в лабораторных условиях и предложены перевиваемые линии клеток для выделения и культивирования вируса. В Чехии велась разработка тест-системы для выявления IPNV. Однако на отечественном рынке ветеринарных препаратов в настоящее время отсутствуют качественные диагностикумы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность, такие как иммуноферментный анализ. Не разработаны методы получения очищенного вируса, антител против вируса IPN и конъюгатов.

1.4. Научная новизна

- 10 октября 2013 года получен Патент РФ на изобретение №2495120 «Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)»;

- впервые в РФ разработана экономичная по времени и перспективная для полевых испытаний тест-система на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения антигена IPNV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб;
- разработана схема гипериммунизации получения антивидовых сывороток для серологических реакций (на основе штамма N07-1);
- оптимизированы методы накопления и очистки вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, получения иммунопероксидазного конъюгата.

1.5. Теоретическая и практическая значимость работы

- 16 марта 2010 года штамм постоянной линии клеток OMG из гонад радужной форели паспортизирован и депонирован в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Линии клеток присвоен коллекционный номер 75.
- Разработана и оптимизирована схема иммунизации кроликов.
- Определена схема накопления, очистки и концентрирования вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых
- По материалам диссертации разработаны и утверждены: «Наставления по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN)» от 10 октября 2013 года протокол № 4, «Инструкция по применению набора для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ» от 10 октября 2013 года и «Стандарт ГНУ ВИЭВ Набор для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ» (СТО 004961-65-00-2013) от 26 сентября 2013 года.

1.6. Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием современного оборудования и применением широкого спектра методов, включающих методики: очистки и концентрирования вируса, получения гипериммунных сывороток, выделения иммуноглобулинов, получения иммунопероксидазного конъюгата и другие.

1.7. Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Характеристика вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых.
2. Характеристика и биологические свойства перевиваемой культуры клеток OMG.
3. Характеристика иммунореагентов, разработанных для твердофазного иммуноферментного анализа и обнаружения специфических антигенов возбудителя в патологическом материале.

4. Результаты определения корреляционной зависимости при сравнении данных, полученных с использованием разработанной тест-системы и других методов диагностики.

5. Результаты испытания тест-системы в практических условиях.

1.8. Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко согласно заданию 08.02.01.13 НИР по РНТП. Отдельные этапы работы проводились совместно с сотрудниками института Е.А. Завьяловой, А.Е. Дрошневым, П.Д. Богдановой, Н.Ю. Кандриной, Н.Ф. Ломакиной. Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность руководителям: к.б.н. Е.А.Завьяловой, академику РАН М.И. Гулюкину, всем исполнителям и участникам за помощь в выполнении диссертационной работы.

1.9. Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. В работе использовалось сертифицированное откалиброванное оборудование. Научные положения, рекомендации и выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Статистический анализ и интерпретация результатов проведены с использованием современных методов статистического анализа и обработки информации.

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на МНПК «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчёл» (Москва, 2011), МНПК «Проблемы ветеринарной медицины и зооэкологии Российского и Азиатско-Тихоокеанского регионов» (Благовещенск, 2012), МНПК «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2012), 2-ая международная конференция молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности» (Казахстан, п.г.т. Гвардейский, 2014).

1.10. Публикации результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в девяти научных работах, в том числе четыре статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, а так же Патент РФ №2495120.

1.11. Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 страницах и включает введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы исследования и результаты), заключение, выводы, список литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 6 таблицами 6 рисунками. Список литературы включает 180 источников, в том числе 155 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

В качестве *испытуемого материал* использовали культуральные вирусы IPN из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ и пробы от лососевых рыб полученные в ходе мониторинга в некоторых регионах России.

Культуры клеток: EPC – Epithelioma papulosum cyprinid (*Cyprinus carpio*) – культура клеток из эпителиальной папилломы карпа, FHM – культура клеток из хвостового стебля черноголового голяна, RTG-2 – Gonadal tissue, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) культура клеток из гонад радужной форели, CHSE-214 – культура клеток из эмбриона чавычи, WSSK – культура клеток из кожи белого осетра, OMG – *Oncorhynchus mykiss gonade* (*Oncorhynchus mykiss*) – культура клеток из гонад радужной форели.

Вирус. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген IPNV штамм N07-1, выращенный на культуре клеток EPC и OMG.

Антитела для сенсibilизации планшетов. Для сенсibilизации планшетов использовали вирусоспецифические кроличьи антитела против IPNV штамм N07-1, полученные в нашей лаборатории по разработанной ранее схеме.

Ig из иммунных сывороток выделяли высаливанием раствором сернокислого аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка.

Конъюгат специфических антител. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали перйодат натрия по методике Wilson и др. В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ) $RZ > 3,1$.

Неспецифические компоненты: субстрат - ТМБ (тетраметилбензидин), «стоп-раствор» - 2М серная кислота, отмывочный буфер ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер с твином рН 7.4-7.6).

Позитивный и негативный порог (ПНП) реакции рассчитывали по методу D.B. Snyder.

Реакцию нейтрализации ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с серийными десятикратными разведениями вирусосодержащей суспензии от 10^1 до 10^{-9} и постоянной концентрацией сыворотки 1:100

2.2. Культивирование различных штаммов IPNV и чувствительность разных культур клеток рыб, влияние рН на жизнеспособность вируса

Данные о штаммах и результаты исследования представлены в таблице 1.

Большинство штаммов вируса IPN было выделено от радужной форели, кроме трёх: GP01/BC-1, GP07/BC-3, GP09/Синяя, которые были выделены от семги Биологическую активность (инфекционность) вирусов проверяли непосредственно после высушивания и через 0,5–2 года хранения.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика штаммов IPN

№ п/п	Штаммы IPN	Источник и год выделения	Культура клеток, исходный титр, lg ТЦД ₅₀ /мл	Дата лиофилизации	Среда лиофилизации	Титр в культуре клеток, lg ТЦД ₅₀ /мл				
						ЕРС	RTG-2	FHM	CHSE-214	OMG
1	Ab	рефентный	RTG-2, CHSE-214 8,0	05.2009	желтоза+сах	6,0	7,0*	6,0	6,0*	7,0
					NB1:1	5,0	8,0*	3,5	7,5*	н.и.
					среда №3	6,5	7,5*	6,5	6,5*	н.и.
2	GP01/ BC-1	сёмга, 2001	CHN-1 7,5	05.2009	желтоза+сах	7,0	8,0	7,0	8,0	н.и.
					сыв.КРС 1:1	6,0	-	-	-	н.и.
					среда №3	8,0	5,0	5,5	5,0	8,0
3	VT06/ B	форель, 2006	RTG-2, 7,0	02.2010	желтоза+сах	6,0	8,0*	8,0	5,5	7,5
					среда №3	в данной среде штамм не сохранился				
4	N07-1/ Ново-1	форель, 2007	ЕРС 7,0	01.2010	желтоза+сах	8,0*	6,0	7,0	6,5	7,0
					сыв.КРС 1:1	8,0*	-	-	-	н.и.
					среда №3	8,0*	-	3,0	-	н.и.
5	SK07/ Святое	форель, 2007	CHSE-214 6,0	12.2009	сыв.КРС 1:1	7,0	-	8,0	6,0*	8,0
					среда №3	в данной среде штамм не сохранился				
6	LRK07/ РКЛ	форель, 2007	FHM, 7,0	02.2010	желтоза+сах	7,5	6,5	7,0*	6,5	7,5
					среда №3	5,0	-	4,0*	-	н.и.
7	GP07/ BC-3	семга, 2007	CHSE-214 7,0	02.2010	желтоза+сах	4,5	7,0	7,0	-*	н.и.
					среда №3	3,0	8,0	4,0	-*	8,0
8	RKTV09/ ТоРк	форель, 2009	CHSE-214 7,0	02.2010	желтоза+сах	5,5	7,0	7,0	7,0*	8,0
					среда №3	6,5	-	7,0	-*	н.и.
9	GP09/ Синяя	семга, 2009г	RTG-2; 6,0	12.2009	среда №3	5,0	7,0*	-	-	8,0
10	N09-3/ Ново-3	форель, 2009	ЕРС, CHSE-214	05.2011	желтоза+сах	7,0*	7,0	6,5	5,5	н.и.
					сыв.КРС 1:1	в данной среде штамм не сохранился				
					среда №3	8,0*	6,5	5,0	6,0	7,0
11	G211/ Горки-2	форель, 2011	FHM, RTG-2 ЕРС, 7,5	06.2011	желтоза+сах	5,0*	6,5*	3,5*	-	7,0
					сыв.КРС 1:1	5,0*	3,0*	-*	-	н.и.
					среда №3	4,5*	6,0*	3,0*	-	н.и.

В результате установлено: снижение вирусной активности в процессе лиофилизации и хранения различных серий одного и того же препарата неодинаково. При этом длительность сохранения вирусов в сухом виде зависит от вида криопротектора. Лиофилизацию всех серий вирусов, проводили по одной схеме. При этом были апробированы несколько вариантов стабилизаторов: эмбриональная телячья сыворотка в соотношении с биоматериалом 1:1, сахарозо-желатозная среда – 4% и 2,5% от объема биоматериала и среда ВГНКИ №3, как 1:1.

Первые морфологические изменения в клетках, вызываемые вирусом IPN, наблюдали через 20 часов после инокуляции. На пятые сутки культура представляла собой отдельно лежащие клетки, с сильно уплотненными ядрами. В контрольных культурах клеток подобных изменений не наблюдали.

Для изучения влияния рН на жизнеспособность вируса использовали штаммы с титром 8,0 lg. В вирусодержащей суспензии устанавливали рН от 1 до 10, с шагом 1. Вирус хранили в течение полутора месяцев при температуре плюс 4°C, еженедельно отбирали аликвоты для заражения культуры клеток. Полноту инактивации вируса под воздействием экстремальных значений рН, определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией, разработанной ранее в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ.

В результате экспериментов по изучению влияния рН было установлено, что вирус IPN сохраняет жизнеспособность через 7 суток хранения при всех испытанных рН, только при рН 1,0 – титр вируса составил 1,0 lg, однако, при последовательном заражении увеличился до 4,0 lg и 7,0 lg во втором пассаже и третьем пассаже соответственно. Полностью вирус инактивируется через 14 суток хранения при рН 1,0. Во всех остальных образцах, включая контроль, за 45 суток хранения, титр вируса снизился не более чем на 0,5–1,2 lg

2.3. Получение постоянной линии клеток OMG

При первичной изоляции возбудителя вирусного заболевания необходимы чувствительные к максимальному количеству штаммов клеточные линии. Культура клеток была получена из первично-трипсинизированной ткани гонад половозрелой радужной форели путем длительного пассирования на среде Игла MEM на солях Эрла с 25мМ HEPES с 10% эмбриональной сыворотки. Была названа авторами OMG (*Oncorhynchus mykiss gonade* (*Oncorhynchus mykiss*)).

Цитоморфологические исследования, проведенные на уровне 50 пассажа, показали, что культуру OMG представляют прозрачные клетки эпителиоподобного типа. Границы клеток четко различимы. Встречались адгезированные, но не распластавшиеся, так называемые, покоящиеся клетки.

К настоящему времени она прошла более 300 пассажей без изменения морфологии клеток на протяжении всего периода наблюдения клетки сохраняли стабильные ростовые и цитоморфологические свойства.

Морфологические признаки — постоянная линия радужной форели представляет собой ровный, плотный монослой из клеток эпителиоподобной, полигональной формы, с крупными ядрами округлой или овальной формы с 1-3 ядрышками. Клетки делятся обычным двуполосным митозом. Кариотип соответствует видовому признаку форели, модальный класс содержит 60 хромосом ($2n=60$) и составляет 77%.

Полученную линию клеток выращивали при температуре от плюс 15 до 22°C в пристеночных условиях. Ростовая среда Игла MEM на солях Эрла с 25мМ NEPES с 10% эмбриональной телячьей сыворотки без антибиотиков, pH среды 7,4–7,6. Дезагрегацию монослоя при субкультивировании осуществляли смесью трипсина 0,25% и раствора Версена 0,02% (4:1), кратность посева 1:3-6. Посевная концентрация $250-300 \times 10^3$ клеток/мл. Первые сутки после субкультивирования содержали при плюс 20–22°C, для формирования монослоя, через 2 суток монослой переносили на хранение при плюс 15°C. Частота пересева составляла 1 раз 2–3 недели.

В опытах по изучению чувствительности использовали культуру клеток OMG на уровне 55–65 пассажей. Вирусы накапливали в референтных клеточных линиях, после полной деструкции монослоя вирусосодержащую культуральную жидкость использовали для титрования в культуре клеток OMG. Инфекционный титр вируса определяли по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток, в полистироловых микропанелях. Учёт цитопатического действия проводили микроскопированием зараженных культур клеток через 1, 3, 5, 7 суток инкубации при оптимальной температуре – плюс 15°C для вирусов IPN, VHS (вирусная геморрагическая септицемия), IHN (инфекционный некроз гемопоэтической ткани), SbSH (герпес вирус осетровых); плюс 20°C – для SVC (весенняя виремия карпа). Окончательный учёт ЦПД проводили на 10 сутки. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча.

Исследования показали, что данная линия клеток чувствительна к вирусам: IPN, IHN, SVC, герпесвирусу карпа кои (KH), SbSH, VHS. Клеточная линия OMG чувствительна к шести вирусам трёх таксономических групп: *Birnaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Herpesviridae*. Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 –Чувствительность клеточной линии OMG к патогенным вирусам рыб

Вирус	Культуры клеток. n=6			
	OMG		Референтная для данного вируса	
	Проявление ЦПД вируса, суток.	Титр вируса после 3-х пассажей lg ТЦД ₅₀ /мл	Проявление ЦПД вируса, суток	Титр вируса lg ТЦД ₅₀ /мл
Birnaviridae				
Инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV),	2	9,5±0,24	3	RTG-2/ 8,0±0,14
Rhabdoviridae				
Геморрагической септицемии лососевых (VHSV)	3	8,0±0,14	2	ЕРС/ 7,5±0,25
Инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых (IHNV)	3	8,75±0,14	3	ЕРС/ 7,5±0,25
Весенней виремии карпов (SVCV)	5	6,6±0,29	5	ЕРС/ 8,0±0,14
Herpesviridae				
Герпес-карпа кои (KHV)	2	9,0±0,25	2	FHM/7,5
Герпес-осетровых (SbSHV)	5	6,0±0,25	6	WSSK-1/ 6,0±0,29

Из данных таблицы 2 видно, что клеточная линия OMG чувствительна к шести вирусам трёх таксономических групп: Birnaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae.

Вирус IPN репродуцировался в культуре OMG с первого пассажа, при этом признаки ЦПД наблюдали на день раньше, чем в референтной культуре, через 24 часа после инфицирования, а через 3–4 сутки – полную деструкцию монослоя. Первые признаки дегенерации выражались в скоплении темных, с нарушенным светопреломлением, клеток, с последующим отделением их от субстрата. Инфекционный титр при этом превышал таковой в референтной культуре на 1,5 порядка.

По чувствительности выявления и по вирусрепродуцирующей способности рабдовирусов VHSV и IHNV клеточная линия OMG с первого пассажа превосходит на 0,5–1,25 порядка референтную линию ЕРС и только эффективность выявления SVCV, вируса того же семейства, даже после проведения трех пассажей, заметно ниже, на 1,5 порядка. Первые признаки ЦПД рабдовирусов на клеточной линии OMG появлялись через 72 часа, а затем нарастали. Полная деструкция монослоя происходила на 4–5 сутки после заражения. Характер ЦПД вирусов IHN, VHS, SVC был примерно одинаковым и выражался в округлении клеток, пикнозе, разрежении монослоя.

При инокуляции культуры клеток OMG герпесвирусом сибирского осетра обнаружено, что вирус репродуцировался с развитием типичного ЦПД: образованием симпластов,

клеточного дебриса и полным отслоением клеток от субстрата. Однако, первые признаки ЦПД и полная деструкция монослоя выявлялись позднее (на третьи сутки), чем в культуре WSSK-1, при этом инфекционный титр был одинаковым.

В результате опытов установлено, что клеточная линия OMG особенно чувствительна к бирнавирусу лососевых. В результате опытов установлено, что клеточная линия OMG особенно чувствительна к бирнавирусу лососевых.

2.4. Очистка и концентрирование вируса

Получение вирусного антигена начинали с разрушения клеточного детрита замораживанием и оттаиванием. Культуральную вирусосодержащую жидкость после двукратного замораживания и оттаивания осветляли центрифугированием. В осветленную вирусосодержащую жидкость добавляли до 2,3 % хлористого натрия и вносили стерильный ПЭГ-6000 до концентрации 7%. Смесь шуттелировали до полного растворения и оставляли на 24 часа при плюс 4°C, отбирая аликвоты для титрования через 2, 4, 8, 18 и 24 часа соответственно (таблица 3). Далее центрифугировали при 1000 g с постепенным увеличением до 13000 g при температуре плюс 4°C в течение 45 минут. Ресуспензировали полученный осадок в 1/50 первоначального объема.

Таблица 3 – Изменение титра вируса в зависимости от времени

Исходный титр	2ч	4ч	8ч	18ч	24ч
9,0 lg	9,2 lg	9,3 lg	9,3 lg	10,5 lg	10,4 lg

Как видно из данных таблицы 3 оптимальное время инкубации составило 18 часов. При 24 часах титр сильно не изменился, но инкубировать в течение 18 часов целесообразней.

Для дальнейшей очистки вирусосодержащей суспензии использовали два метода ультрацентрифугирования: первый на градиенте раствора сахарозы, второй на растворе хлористого цезия.

Первый метод. В центрифужных пробирках на дно наслаивали 60 % раствор сахарозы (подложка) на который наносили 20 % и 30 % раствор сахарозы. На созданный градиент наносили вирусосодержащую суспензию. Центрифугирование вели при ускорении 84000 g, температура плюс 4°C в течение двух часов. В данном режиме вирус осаждался на подложку 60% сахарозы. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ. Далее проводили второй этап очистки, который заключался в наслаивании вируса на линейный градиент плотности сахарозы от 60 % до 5 % с шагом пять. Центрифугирование проводили при ускорении 25000g, при плюс 4°C в течение трех часов. Визуальное формирование вирусной полосы оценивали на градиенте 50 %. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ. Очищенный антиген стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мм. Определение стерильности приготовленного антигена проводил

сотрудник лаборатории ихтиопатологии к.б.н. А.Е. Дрошнев, согласно «Методическим указаниям по бактериологическому контролю стерильности ветеринарных биологических препаратов».

При втором методе очистки антиген наслаивали на ступенчатый градиент плотности хлористого цезия (15–60 %) и центрифугировали с ускорением 100000 g в течение двух часов при плюс 4°C. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 часов. Далее аналогично первому методу.

Оптимальным оказался первый метод.

После очистки титр вируса составил 12 lg.

2.5. Иммунизация кроликов

Иммунизацию проводили по трём схемам, представленным в таблице 4.

Таблица 4- Схема иммунизации кроликов

Схема	№ инъекции	Интервал между инъекциями (сутки)	Антиген (объем – титр – кол-во белка)	Область введения	Способ введения	Присутствие адъюванта (ад : аг)
№1	1	—	1 мл -10 ^{9,0} ТЦД ₅₀ /мл-1540 мкг/см ³	бедро	в/м	ПАФ 1:1
	2	7	1,5 мл-10 ^{9,0} ТЦД ₅₀ /мл-1540 мкг/см ³	ухо	в/в	—
	3	7	—//—	ухо	в/в	—
	4	7	—//—	ухо	в/в	—
	5	21	—//—	ухо	в/в	—
	6	7	—//—	ухо	в/в	—
	7	7	—//—	ухо	в/в	—
№2	1	—	2,0 мл -500мкг/ см ³	спина	п/к	ПАФ 1:1
	2	5	0,5 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—
	3	5	1,0 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—
	4	5	2,0 мл-500мкг/ см ³	спина	п/к	ПАФ 1:2
	5	5	1,5 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—
	6	5	2,0 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—
			3,0 мл-500мкг/ см ³	спина	п/к	—
№3	1	—	1,0 мл-500мкг/ см ³	спина	п/к	ПАФ 1:1
	2	7	1,5 мл-500мкг/ см ³	спина	п/к	НАФ 1:1
	3	7	2,0 мл-500мкг/ см ³	спина	п/к	—
	4	7	1,0 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—
	5	7	1,5 мл-500мкг/ см ³	ухо	в/в	—

Схемы опытов по получению антисыворотки против вируса IPN.

На седьмые сутки после пятой инъекции (для варианта №1), после четвёртой (для варианта №2) и после третьей (для варианта №3) делали пробный забор крови, определяли титр антител в реакции нейтрализации (РН). Обескровливание кроликов проводили через семь суток после последней инъекции.

На начальном этапе иммунизация проводилась по схеме (№1), ранее использованной в лаборатории ихтиопатологии. Использовали концентрированный вирусный антиген с инфекционной активностью $10^{9,0}$ и общим содержанием белка 15400 мкг/см^3 . Вводили семикратно. Опыт продолжался в течение 56 дней, в результате после пяти инъекций титр антисывороток составил 1:256 ($n=5$), после семи инъекций – 1:512 в РН.

Поэтому схема иммунизации в последующих опытах была оптимизирована следующим образом: дозу антигена рассчитывали не по инфекционному титру, а по содержанию белка, которая была снижена до 500 мкг/см^3 , с постепенным нарастанием дозы от $0,5 \text{ см}^3$ до $2,0 \text{ см}^3$. Поскольку известно, что на специфичность антисывороток влияет число инъекций и продолжительность иммунизации, во второй схеме уменьшили интервалы между инъекциями до пяти дней, а в схеме №3 количество инъекций до пяти.

Для стимуляции иммуногенеза, в результате замедления резорбции антигена в организме, применяли полный и неполный адьюванты Фрейнда, а также использовали комбинированное – внутривенное и подкожное введение антигена для активации разных звеньев иммунитета.

В результате, проведение иммунизации по схеме №2 продолжалось в течение 25 дней. Использовали концентрированный вирусный антиген с инфекционной активностью $10^{9,0}$ и общим содержанием белка 6000 мкг/см^3 . Вводили шестикратно. Титр вируснейтрализующих антител в сыворотке оказался значительно выше, чем по схеме №1: после пятого введения 1:1400, после седьмого – 1:1600.

Иммунизация по схеме №3 проводилась 28 дней, использовали 7 см^3 антигена, животным ввели 3500 мкг/см^3 белка на животное. Полученные данные показали, что титр антител после трёх инъекций составил 1:1400, такой же, как после пяти введений по схеме №2; после пяти инъекций в данном случае был получен самый высокий титр антител в данной серии опытов - 1:2048 ($n=5$) в РН.

Таким образом, была разработана схема иммунизации кроликов, позволившая получить специфичные антисыворотки к вирусу инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), с высоким титром антител – 1:2048, которые в настоящее время используются в лаборатории для получения иммунологических реагентов тест-систем, таких как конъюгаты.

2.6. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика

Иммуноглобулины получали риванольном методом. Цельную сыворотку anti-IPNV с титром в реакции нейтрализации 1:2048 очищали от липидов. Далее сорбировали гомогенатом печени КРС, карпа и форели для избавления от балластных белков.

После центрифугирования к надосадку добавляли раствор риванола в дистиллированной воде при постоянном перемешивании. Через 15 минут легкого шуттелирования

центрифугировали. К супернатанту, который содержит иммуноглобулины, добавляли хлорид натрия до концентрации 5% для удаления риванола. Остатки риванола удаляли гелефильтрацией через колонку с сефадексом G10–15. Далее осаждали иммуноглобулины добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (37% насыщения) и проводили второе высаливание насыщенным раствором сульфата аммония (40% насыщения). После центрифугирования супернатант сорбировали печенью один раз из тех же расчетов и высаливали до 40% насыщения. Диализировали против ФСБ. Полученный белок концентрировали сульфатом аммония.

Количество белка определяли по методу Лоури и составило 8,75 мг/мл.

2.7. Получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV

Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом. Для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по модифицированной методике М.В. Wilson и Р.К. Nakane (Wilson, M.V., 1978). В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ) $RZ > 3,1$.

Для поиска оптимального соотношения иммуноглобулинов к пероксидазе хрена конъюгирование проводилось в трех вариантах Ig к ПХ 1:1, 1:2 и 2:1 в щелочной среде. Оптимальным соотношением ПХ к Ig составило 1:2.

По методике М.В. Wilson и Р.К. Nakane было необходимо ввести боргидрид натрия для восстановления непрореагировавших альдегидных групп, но опыт показал, что его наличие резко снижало чувствительность реакции, тем самым выявлена нецелесообразность его применения. Отсутствие боргидрида натрия не повлияло на стабильность конъюгата. Срок хранения составил один год при температуре 4–8°C.

К полученному конъюгату добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 20±0,5°C. Активность приготовленного конъюгата определяли шахматным титрованием.

2.8. Определение оптимальных условий постановки «сэндвич» ИФА

Для создания тест-системы методом «шахматного» титрования подбирали концентрацию специфических Ig и рабочее разведение конъюгата.

Для сорбции использовались полистироловые микропланшеты (низкой, средней и высокой сорбции) для проведения иммунологических работ 96-луночные SPL. Для разведения антител использовался 0,02 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH-9,5. Применяли два метода сорбции классическая физическая сорбция и метод высушивания раствора иммуноглобулинов на лунках плашек.

Адсорбцию иммуноглобулинов проводили в двух режимах:

I – 2 часа при 37°C, потом 18 часов при 4°C,

II – 18 часов при 4°C. После планшеты промывали пять раз промывочным раствором - 0,01 М фосфатно-солевым буфером с Tween-20 (ФСБ-Т) pH-7,5.

Сенсибилизацию планшетов антителами проводили в следующих рабочих разведениях: 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл далее до 60 мкг/мл с шагом 10 внося по 100 мкл в лунку. Иммунопероксидазный конъюгат в концентрации 1:250 титровали до концентрации 1:64000. В качестве субстрата использовался коммерческий ТМБ (тетраметилбензидин) и ОФД (ортофенилендиамин). В качестве стоп-реагента использовалась 2 М серная кислота. Измеряли значения оптической плотности при длине волны 450 нм для ТМБ или 492 нм для ОФД. Учет реакции проводили на планшетном фотометре Multiskan FC с программным обеспечением SkanIt (Thermo Scientific).

Рабочее разведение конъюгата составило 1:16000. Применение в качестве субстрата ОФД снижает чувствительность реакции. Оптимальное разведение антител, обеспечивающее достоверное различие результатов с положительными и контрольными образцами составило 20 мкг/мл.

Параллельно проводился опыт с блокированием неспецифических связываний. В ходе опыта были испытаны несколько блокировочных растворов: 1% БСА на ФСБ, обезжиренное молоко, 5% эмбриональная телячья сыворотка, 5% сыворотка крови лошади. Использование сывороток повышало фон реакции. Применение БСА давало умеренный фон, а использование раствора молока не влияло на результаты. Опыт показал, что от блокировки неспецифических связываний целесообразно отказаться.

Было установлено, что оптимальными условиями постановки «сэндвич»-метода ИФА являются:

- адсорбцию антител проводить в режиме два часа при 37⁰С, потом 18 часов при 4⁰С;
- блокировка планшетов необязательна;
- разведения антител для сенсибилизации 20 мкг/мл;
- рабочее разведение конъюгата составило 1:20000;
- использование в качестве субстрата ТМБ.

2.9. Определение позитивно-негативного порога (ПНП)

Для разграничения неспецифической, сомнительной и специфической реакций, определяли пороговые значения S/P – отношения. Для определения ПНП реакции в ИФА тестировали 120 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,012 о.е., что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение оптической плотности 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 оптическая плотность, соответствующая наименьшему положительному значению равнялась 0,545 о.е. Промежуточные величины соответствовали зоне «сомнительных результатов».

Для данных значений показателей вычисляли S/P – отношения, которые были критериями разграничения результатов реакции. В дальнейшем значение S/P выражали в виде процента реактивности:

$$\text{процент реактивности (\%)} = (\text{ОП} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC}) \times 100\%,$$

где, ОП – оптическая плотность образца;

PC – оптическая плотность положительного контроля;

NC – оптическая плотность отрицательного контроля.

Были вычислены границы пороговых значений: при величине больше 22% реакция считается положительной, значение % меньше 10% – реакция отрицательная, а диапазон от 10% до 22% – сомнительные результаты реакции.

2.10. Определение специфичности и чувствительности тест-системы для выявления вируса IPN

Главными характеристиками иммуноферментного анализа являются специфичность и чувствительность. Оценку чувствительности и специфичности тест-системы проводили путем сравнительного анализа результатов тестирования сывороток в ИФА и в реакции нейтрализации (РН), которая является классическим тестом диагностики вирусных заболеваний.

Для определения чувствительности тест-системы проводили титрование трех штаммов вируса IPN (рисунок 1) с инфекционной активностью $10^{8,20-8,50}$ ТЦД₅₀/см³. Минимальная концентрация антигена, соответствующая наименьшему положительному результату определения, статистически достоверно отличающаяся от показателей заведомо отрицательных образцов составила 0,545 о.е., что соответствует титру вируса $10^{2,5}$ ТЦД₅₀/см³ (lg 2,5).

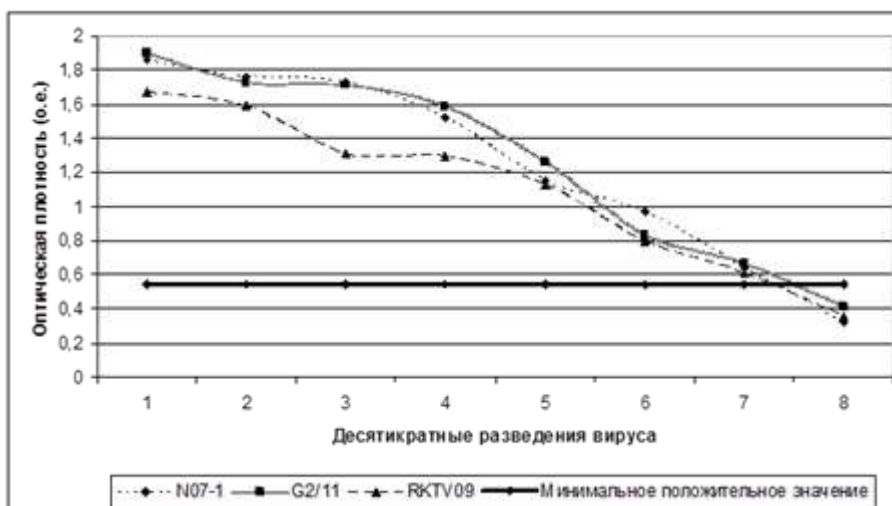


Рисунок 1 – Определение чувствительности ИФА

Специфичность определяли, используя другие вирусы лососевых рыб (IPN шт. KRK10 и VHS шт. S7/10). Взаимодействие тест-системы с препаратами вирусов VHS, IPN, неинфицированными клетками и тканями и бактериями было на уровне фона. При этом,

среди лунок на планшете коэффициент вариации составил 2–4%, между отдельными планшетами не превышал 4%, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности данного метода.

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

Сравнительная оценка обнаружения IPN антигена методами ИФА, РН и ПЦР представлена в таблице 5.

Таблица 5– Сравнительный анализ эффективности выявления антигена IPNV методами ИФА, РН и ПЦР

Испытуемый материал		ИФА		Результат РН	Результат ПЦР
		ОП (о.е.)	Результат		
1	IPNV шт. Ab (ATCC 13-19, референтный)	1,376	+	+	+
2	IPNV шт. GP01	1,079	+	+	+
3	IPNV шт. VT06	1,214	+	+	+
4	IPNV шт. SK07	1,406	+	+	+
5	IPNV шт. RKT09	1,622	+	+	+
6	IPNV шт. G2/11	1,962	+	+	+
7	IPNV шт. KRK10	0,253	-	-	-
8	VHSV шт. 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> шт. RMS10-7/3	0,230	-	-	-
14	Культура клеток EPC	0,209	-	-	-
15	Культура клеток OMG	0,205	-	-	-

Где, №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.

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 IPNV отмечена корреляция показателей. Однако, при исследовании в реакции 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 обнаружен. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, в пробах отрицательных по результатам ИФА и РН вирус не обнаружен. Полученные данные подтверждают специфичность тест-системы ИФА, разработанной для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, которая составляет не менее 99,9%.

2.11. Определение стабильности специфических компонентов набора при хранении

Главным показателем качества тест-системы ИФА, определяющим эффективность использования в практических условиях является стабильность специфических компонентов при длительном хранении. Стабильность проверяли в процессе хранения в рекомендуемых условиях, в сухом защищенном от света месте при температуре 4–8°C.

Специфическими компонентами набора являются: отрицательный и положительный контроли, вирусоспецифические кроличьи антитела против IPNV (штамм N07-1), сенсibilизированные в лунках полистироловых планшетов, конъюгат. Высушенные сенсibilизированные планшеты с осушителем закрывались в полиэтиленовые пакеты с замком. Конъюгат, положительные и отрицательные контроли с консервантом (0,05 % мертиолят натрия), а также другие компоненты набора разливали в пластиковые флаконы. Для определения срока хранения специфических компонентов набора их хранили в сухом защищенном от света месте при температуре 4–8°C. Активность проверяли с интервалом один месяц. Для опыта использовали одни и те же заведомо отрицательные и положительные пробы, аликвоты которых хранились при температуре минус 18–20°C

Постановку ИФА и учет результатов вели по разработанной методике. Среднеарифметическая оптическая плотность положительной пробы до опыта составила 1,564, а отрицательная 0,072.

Результаты показали, что исходная активность специфических компонентов, сохранялась в течение одного года хранения при рекомендованных условиях. Изменения оптических плотностей были незначительны и не носили статистически достоверного характера.

2.12. Испытание полученной тест-системы в производственных условиях

Мониторинг эпизоотической ситуации в 2011-2016 годах по IPNV было подвергнуто 6246 экземпляров лососевых из 37 рыбоводческих хозяйств некоторых регионов России: Московской, Ленинградской, Калужской, Мурманской, Владимирской, Смоленской, Новгородской, Тверской областей, Республик Алания и Карелия.

В ходе мониторинга по вирусу IPN рыбоводческих хозяйств некоторых регионов нашей страны сотрудники лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ зарегистрировали всего пять случаев в 2011 – 1; 2012 – 2; 2013 – 2 (у форели, кумжи, семги) в товарных хозяйствах Республики Карелия и Мурманской области. Результаты исследований были подтверждены несколькими лабораторными методами, в частности вирусовыделение в культуре клеток, реакция нейтрализации, полимеразная цепная реакция, электронная микроскопия.

В 2016 году при исследовании радужной форели доставленной в лабораторию представителем компании ООО «Русское море-аквакультура» из Финляндии (Taimen Oy, рыбохозяйство Joutsan, Lohitie 3, 19650 Joutsa), для проверки перед планируемым завозом в Республику Карелия, был выделен вирус-возбудитель инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN), аналогичные результаты были получены в лаборатории Агентства продовольственной безопасности Финляндской республики (EVIRA) в Хельсинки (Elintarviketurvallisuusvirasto Evira Mustialankatu 3 00790 Helsinki).

Министерством сельского хозяйства Республики Карелия ввоз посадочного материала с проверенного предприятия был запрещен.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проделанной работы нами сделаны следующие выводы:

1. Использование при лиофилизации вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN) в качестве стабилизатора эмбриональной телячьей сыворотки в соотношении с биоматериалом 1:1 или сахарозо-желатозной среды – 4% и 2,5% от объема биоматериала обеспечивает сохранность вируса. Установлено, что полная инактивация вируса IPN происходит через 14 суток хранения при pH 1,0; при pH от 2 до 10 за 45 дней хранения титр вируса снижается не более чем на 0,5–1,2 lg.
2. Полученная в ходе работы постоянная линия клеток из гонад радужной форели чувствительна к шести вирусам трех таксономических групп: Birnaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae, в том числе к вирусу IPN.
3. Наиболее эффективная схема накопления, очистки и концентрирования вируса включает культивирование в перевиваемой культуре клеток OMG, двукратное замораживание и оттаивание, инкубацию с ПЭГ-6000 18 часов, ультрацентрифугирование в два этапа на градиенте плотности раствора сахарозы, что позволяет получить после очистки титр вируса 12 lg.

4. Схема иммунизации кроликов в течение 28 дней с постепенным нарастанием дозы антигена по белку от 1 см³ до 2 см³ и снижением количества инъекций до 5 позволила получить специфические антисыворотки к вирусу IPN с высоким титром антител (1:2048) в реакции нейтрализации в отличие от других испытанных схем. В результате сорбции гомогенатами печени карпа и форели при выделении иммуноглобулинов из сыворотки кролика, их концентрация увеличилась до 8,75 мг/мл.
5. Оптимизация процедуры получения иммунопероксидазного конъюгата за счет исключения боргидрида натрия увеличивает чувствительность реакции и не влияет на его стабильность в сравнении с оригинальной методикой М.В. Wilson и Р.К. Nakane. При этом оптимальное соотношение иммуноглобулинов к пероксидазе хрена составило 1:2.
6. Оптимальными условиями адсорбции антител против вируса IPN на полистироловых планшетах является их концентрация 20 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере, инкубация 2 часа при 37 °С и далее 18 часов при 4 °С. При этом рабочее разведение конъюгата составило 1:16000, а использование в качестве субстрата тетраметилбензидина повысило чувствительность реакции в отличие от ортофенилендиамина.
7. Показана высокая чувствительность и специфичность реагентов иммуноферментной тест-системы при исследовании нативной и лиофилизированной культуральной жидкости зараженных клеток, а также в биологическом материале от естественно и искусственно инфицированных рыб. Минимальное значение оптической плотности, при котором результат был положительным, составило 0,545, что соответствует титру вируса 10^{2,5}ТЦД₅₀/см³. Специфичность тест-системы составляет не менее 99,9 % в сравнении с ПЦР и реакцией нейтрализации.
8. Использование разработанной тест-системы для анализа эпизоотической ситуации в отношении возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, позволило из 37 исследованных хозяйств выявить 5 неблагополучных.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Впервые разработана отечественная тест-система на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения вируса IPN в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб.

Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели паспортизирована и депонирована в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. В ходе работы был получен Патент «Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)»

На основании результатов проведенных экспериментов, апробации при проверке половых материалов и результатов комиссионных испытаний разработанная «Тест-система для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPN) иммуноферментным методом» рекомендована для диагностики и серологического мониторинга IPN в рыбоводческих хозяйствах. Тест-система успешно используется в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. КОВАЛЕНКО.

По результатам исследований разработана, составлена и утверждена нормативно-техническая документация:

- Наставления по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN);
- Инструкция по применению набора для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ»;
- Стандарт ГНУ ВИЭВ Набор для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPN) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ».

Обеспечение такими наборами ветеринарных лабораторий позволит проводить массовые обследования рыб для установления диагноза, а для мониторинга IPNV в рыбоводческих хозяйствах.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Завьялова, Е.А. Твёрдофазный иммуноферментный анализ в диагностике вирусных болезней лососевых рыб/ Е.А. Завьялова, **М.А. Карпова**, А.Е. Дрошнев// Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2017. – Т. 34, № 2. – С. 25-29.
2. Выявление вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа/ Е.А. Завьялова, М.И. Гулюкин, **М.А. Карпова**, П.Д. Богданова, А.Е. Дрошнев// Вопросы вирусологии. – 2016. – Т.61, №1 . – С.42–45.
3. Получение конъюгата в составе тест-системы для выявления возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) иммуноферментным методом/ **М.А. Карпова**, Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошнев, М.И. Гулюкин// Сборник материалов 2-й международной конференции молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности»// Казахстан, п.г.т. Гвардейский, 2014. – С.112–115.
4. Изучение чувствительности к вирусам новой перевиваемой линии клеток из гонад радужной форели/ Е.А. Завьялова, **М.А. Карпова**, П.Д. Богданова, А.Е. Дрошнев, М.И. Гулюкин// Веткорм. – 2013. – №4. – С.41–42.

5. Пат. 2495120 Рос. Федерация, МПК⁸ C12N 5/00 (2006.1). Постоянная линия клеток ОМГ из гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)/ Завьялова Е.А., **Карпова М.А.**, Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) Российской академии сельскохозяйственных наук. – №2012108030/10; заявл. 05.03.2012; опубл. 10.10.2013, Бюл.№28. –6с.
6. Экспериментальное обоснование схемы иммунизации кроликов для получения антисыворотки против вируса-возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV)/ Е.А. Завьялова, **М.А. Карпова**, А.Е. Дрошнев, М.И. Гулюкин// Веткорм. – 2012. – №3. – С.42–43.
7. Завьялова, Е.А. Сравнительная характеристика биологических свойств штаммов вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV)/ Е.А. Завьялова, **М.А. Карпова**, М.И. Гулюкин// Проблемы ветеринарной медицины и зооэкологии Российского и Азиатско-Тихоокеанского регионов: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – Благовещенск. – 2012. – С.109–113.
8. Разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPN) иммуноферментным методом/ Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошнев, **М.А. Карпова**, М.И. Гулюкин// Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – Щелково, 5-7 декабря 2012. – С.165–171.
9. Завьялова, Е.А. Получение, цитоморфологическая и кариологическая характеристика диплоидного штамма клеток гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*)/ Е.А. Завьялова, **М.А. Карпова**// Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчёл: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – Москва, 2011. – С.78–80.