

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ МЕТОДОМ ІФА

Музика Н.М.

Інститут птахівництва НААН, с. Бірки

У зв'язку із значним розповсюдженням вірусного ентериту гусей і наявністю інпаарантних форм інфекції виникла необхідність у розробці сучасних високочутливих діагностичних експрес-методів. На сьогоднішній

день для проведення серомоніторингу щодо вірусного ентериту існує декілька методів – реакція непрямой гемаглютинації, реакція нейтралізації, реакція дифузної преципітації. Найчутливішою та високоспецифічною є реакція нейтралізації (РН) на культурі клітин фібробластів гусячих ембріонів, але для її постановки необхідні інтактні гусячі ембріони, висококваліфіковані спеціалісти; реакція трудомістка та тривала в постановці – результат дослідження відомий тільки через 21 день, тому не може бути широко впроваджена в практичну роботу лабораторій ветеринарної медицини [5]. Реакція непрямой гемаглютинації дозволяє провести епізоотологічну оцінку щодо вірусного ентериту гусей в господарстві, виявити рівень поствакцинальної сероконверсії, але чутливість її недостатня [4].

Одним із сучасних високочутливих діагностичних методів є імуноферментний аналіз (ІФА). За даними закордонних вчених для діагностики вірусного ентериту гусей застосовують твердофазний імуноферментний аналіз [8, 9, 10]. В Росії проводились розробки непрямого методу ІФА для діагностики вірусного ентериту гусей [6, 7], але у виробництві ці методи не впроваджені, комерційні тест-системи в Україні (як вітчизняного так і закордонного виробництва) відсутні.

Тому метою нашої роботи було розробити імуноферментну тест-систему для серологічної діагностики захворювання та відпрацювати умови постановки реакції.

Матеріали і методи. Як антиген для іммобілізації на планшети використовували вакцинний шта м вірусу ентериту гусей BBS-99, очищений та концентрований методом ультрацентрифугування через градієнт густини сахарози-хлористого цезію [3]. Метод включає в себе центрифугування вірусної маси з ПЕГ-6000, потім обробку ультразвуком з подальшим центрифугуванням через розчин 30 % сахарози, після чого – детергентом нонідет Р-40 з подальшим центрифугуванням через градієнт густини сахарози-хлористого цезію, а після відбору основної фракції на проточному спектрофотометрі – повторне переосадження через 30 % сахарозу.

В якості позитивного контролю використовували гіперімунну сироватку крові гусей з титром 1:5120 в РН, отриману шляхом трьохразової імунізації (з інтервалом 7 діб) 30-добових гусенят очищенням та концентрованим препаратом антигену вірусу ентериту.

Негативну сироватку отримували від клінічно здорових гусенят, які не мали антитіл до вірусного ентериту. Гусенят вирощували у ізолюваних умовах до 30-добового віку, потім тотально знекровлювали.

Використовували комерційний кон'югат (антивидовий імунопероксидазний проти Ig G гусей виробництва філіалу «Медгамал» ДП НДІЕМ ім. М.Ф. Гамалєї РАМН, м. Москва) і АБТС (2,2'-азіно-ди(3-бензтіазолінсульфонова кислота з перекисом водню виробництва SIGMA-ALDRICH)) як субстрат. Показники оптичної густини (ОГ) враховували при довжині хвилі 405 нм.

Титр (Т) антитіл в пробах сироваток крові гусей в ІФА визначали методом послідовних розведень сироваток і в одному робочому розведенні по S/P відношенню згідно методичних вказівок, які розроблені ФДУ ВНІІЗТ, м. Владимир [1]. Для обробки даних ІФА використовували комп'ютерну програму Statistika.

Постановку РН проводили з постійною дозою вірусу за загальноприйнятою методикою [2].

Результати досліджень. Для визначення оптимального робочого розведення дослідних сироваток методом непрямого імуноферментного аналізу було досліджено 152 проби з різним рівнем антитіл до вірусу ентериту гусей у розведеннях 1:100, 1:200, 1:400. Для кожного розведення обчислювали значення S/P та визначали коефіцієнт кореляції, який склав 0,86 для розведення 1:100; 0,93 для розведення 1:200 і 0,92 для розведення 1:400. Розведення 1:200, що мало найбільший коефіцієнт кореляції, було обране робочим.

У відповідності зі значеннями ОГ досліджуваних сироваток була побудована лінія регресії, що відображає залежність між IgT ІФА, визначеним методом послідовних розведень, і Ig S/P, розрахованим для кожної сироватки у робочому розведенні 1:200. Рівняння для розрахунку титру антитіл мало вигляд: $\lg T = 3,2899 + 1,3436 \cdot \lg (S/P_{200})$.

Встановлені оптимальні значення ОГ позитивної та негативної контрольних сироваток: для негативного контролю не вище 0,19, для позитивного – не нижче 0,7, мінімальна допустима різниця ОГ контролів не повинна перевищувати 0,7.

З метою визначення позитивно-негативного порогу було взято 54 сироватки крові від гусенят, що вирощувались в ізолюваних умовах і не мали антитіл до вірусу ентериту, і досліджено в тест-системі ІФА методом послідовних розведень. У результаті проведених розрахунків при визначенні якісної характеристики досліджуваних сироваток крові по розрахованому титру антитіл результати ІФА характеризували як позитивні ($T > 275$), сумнівні ($1:137 < T < 1:275$) і негативні ($T < 137$).

При випробуванні тест-системи у виробничих умовах вивчали поствакцинальний імунітет батьківських стад гусей у двох господарствах (вакцинація препаратами виробництва ІП НААН). Сироватки крові досліджували виготовленою тест-системою кожен місяць протягом репродуктивного періоду в ІФА та РН. Результати паралельного дослідження представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Титри антитіл до вірусного ентериту гусей в ІФА та РН

Господарство	Група гусей*1	Термін після вакцинації	Середньоггеометричний титр антитіл		Характеристика*2	
			ІФА	РН, log ₂	ІФА	РН
1	2	3	4	5	6	7
госп-во Харківської обл.	1	1 місяць	1:825±209	7,85±0,28	+	+
	2		1:3987±422	9,69±0,37	+	+
госп-во Донецької обл.	1		1:4838±102	10,45±0,5	+	+
	2		1:5911±150	10,62±0,31	+	+
госп-во Харківської обл.	1	2 місяці	1:1023±244	7,65±0,43	+	+
	2		1:2911±424	9,4±0,52	+	+
госп-во Донецької обл.	1		1:3495±336	9,82±0,63	+	+
	2		1:4547±241	10,52±0,3	+	+

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
госп-во Харківської обл.	1	3 місяці	1:607±89	8,35±0,39	+	+
	2		1:2512±221	10,29±0,38	+	+
госп-во Донецької обл.	1		1:3227±176	9,93±0,48	+	+
	2		1:4509±299	10,5 ± 0,26	+	+
госп-во Харківської обл.	1	4 місяці	1:510±127	8,05±0,22	+	+
	2		1:2636±330	10,92±0,25	+	+
госп-во Донецької обл.	1		1:2690±461	10,32±0,17	+	+
	2		1:4910±375	10,68±0,27	+	+
госп-во Харківської обл.	1	5 місяців	1:520±144	8,95±0,35	+	+
	2		1:2346±431	10,36±0,37	+	+
госп-во Донецької обл.	1		-	-	+	+
	2		-	-	+	+
госп-во Харківської обл.	1	6 місяців	1:535±104	5,81±0,44	+	+
	2		1:1763±396	7,15±0,47	+	+
госп-во Донецької обл.	1		-	-	+	+
	2		-	-	+	+

Примітка: *¹ група 1 – вакциновані двократно живою вакциною; група 2 – жива+інативована вакцини; *² позитивними (+) сироватки вважаються: в ІФА з титру 275 і більше, в РН – з 5,0 log₂

Як видно з таблиці 1, титри антитіл, визначені методом ІФА, відображали захисний рівень у щеплених гусей, що підтвердилось результатами, отриманими в РН.

Одержані в результаті узагальнення та аналізу дані експериментальних та виробничих досліджень були підставою для розробки нормативно-технічної документації на тест-систему для її реєстрації в Україні.

Висновки.

1. Розроблена тест-система ІФА для кількісного визначення антитіл до вірусу ентериту у сироватках крові гусей.
2. Біопрепарат після затвердження нормативно-технічної документації рекомендований для використання у ветеринарних діагностичних лабораторіях та науково-дослідних установах з метою оцінки епізоотичної ситуації щодо вірусного ентериту в господарстві та напруженості імунітету у вакцинованих гусей.

Список літератури

1. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций Ч.1 / ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2008. – 306 с.
2. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие / [Головко А.Н., Ушкалов В.А., Скрыпник В.Г. и др.]; под ред. А.Н. Головки. – Х. «НТМТ», 2007. – 512 с.
3. Музыка, Н.М. Одержання компонентів імуноферментної тест-системи для серологічної діагностики вірусного ентериту гусей / Н.М. Музыка, Б.Т. Стегній // Ветеринарна медицина: міжвід. тем. наук. зб. / ІЕКВМ. – Х., 2009. – Вип. 92. – С. 352-355.
4. Музыка, Н.Н. Изучение иммунного статуса гусей при вирусном энтерите серологическими методами / Музыка Н.Н., Белецкая А.В., Безрукавая И.Ю. и др. // Птахи́вництво: Міжв. тем. наук. збірн. за мат. V Укр. конф. по птах. з міжн. участ.: Харків, 2004. – В.55. – С. 546-550.
5. Суворов, А.В. Реакция нейтрализации в диагностике вирусного энтерита гусей // Актуальные вопросы профилактики и лечения болезней с.-х. животных: Тез. докл. Всесоюзной науч.-технич. конф. молодых ученых. – М., 1985. – С. 251.
6. Трефилов, Б. Б. Оценка поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей методом иммуноферментного анализа / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Д.В. Маслов // Материалы междунаро. науч.-практ. конф., посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России, 21-22 сентября 2006 г. – 2006. – С. 200-206.
7. Трефилов, Б.Б. Вирусный энтерит гусей (диагностика и профилактика) / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Л.И. Явдошка и др. // Тез. докл. научно-практического конгресса «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». – С.-Петербург, 2007.
8. Have, P. Detection of goose parvovirus antibodies by microneutralis and enzyme – linked immunosorbent assay / P. Have, H. S. Hansen // Proc. 7 th. World Vet. / Poult. Assoc. – Oslo, Norway, 1993. – P. 60.
9. Jestin, V. Demonstration of very pathogenic parvovirus (Derzsy disease virus) in Muscavy duck farms / V. Jestin, M. Le Bras, M. Cherbonnel // Reel. Med. – 1991. – Vet. – V. 167 – P. 849-857.
10. Kwang, M. J. Detection of antibodies against goose parvovirus by on enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) / M. J. Kwang, H. J. Tsai, Y. S. Lu // J. Chin. Soc. Vet. Sci. – 1987. – V. 13 – P. 17-23.

ELISA TEST-SYSTEM FOR REVEALING OF ANTIBODIES TO THE VIRUS OF GEESE ENTERITIS

Muzika N.M.

Poultry Research Institute of NAASU, Birky

It has been worked out the ELISA test-system for the quantitative determination of antibodies to the viral enteritis in the geese blood serum. The titer of antibodies was determined by the S/P ratio, measured in one dilution of serum. It has been determined: the work dilution of investigated serums, the optimal index of optical density of control serums, positive-and-negative threshold. The test-system with the positive result has stood the test in production conditions. The results of investigations of serums by ELISA in comparison with the traditional test (the reaction of neutralization) are presented. When determining titers of antibodies to the viral enteritis of geese by the ELISA and VN method the identical regularities have been obtained.