



Научная статья

УДК 619:578. 831.3

Разработка и применение тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для контроля поствакцинального иммунитета против вирусного гепатита утят типа I

Нина Васильевна Никитина

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН

Аннотация: Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-1) остается одной из актуальных проблем в утководстве. Важная роль в борьбе с болезнью отведена специфической профилактике с применением живых и инактивированных вакцин и оценке эффективности вакцинации. Поэтому совершенствование методов серологического контроля иммунного ответа вакцинированного поголовья птицы крайне необходимо. Представлены результаты разработки отечественной тест-системы на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител к вирусу ВГУ-1. Получен очищенный инактивированный антиген штамма «ВН-3» вируса ВГУ-1, антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток. Оптимизированы условия постановки реакции, установлен позитивно-негативный порог при исследовании 50 негативных сывороток крови уток. При определении воспроизводимости результатов ИФА среднее значение коэффициента вариации не превышало 10%. Показана коррелятивная связь результатов исследований в реакции нейтрализации и ИФА. Установлена высокая чувствительность и специфичность разработанной тест-системы для выявления антител к вирусу ВГУ-1 в сыворотке крови утят/уток, что позволяет рекомендовать ее для контроля поствакцинального иммунитета и проведения мониторинговых исследований на ВГУ-1.

Ключевые слова: вирусный гепатит утят типа I, иммуноферментный анализ, сыворотка крови, специфические антитела.

Для цитирования: Никитина, Н.В. Разработка и применение тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для контроля поствакцинального иммунитета против вирусного гепатита утят типа I / Н.В. Никитина // Птицеводство. – 2022. – №5. – С. 55-59.

doi: 10.33845/0033-3239-2022-71-5-55-59

Введение. Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-1) широко распространен в мире, протекает остро и сопровождается высокой смертностью молодняка, достигающей до 95% [1,2]. Болезнь серьезно угрожает промышленному утководству, вызывая большие экономические потери [3,4]. ВГУ-1 часто протекает в ассоциации с вирусными и бактериальными инфекциями, поэтому основой успешной борьбы с болезнью являются методы ее лабораторной диагностики [5-7].

Для серодиагностики ВГУ-1 широко используют реакцию нейтрализации (РН), благодаря доступности, надежности и высокой специ-

фичности при обнаружении вируснейтрализующих антител. Однако РН является длительной, методически трудоемкой, и не всегда удобна для исследования большого количества проб [8].

В настоящее время в основном для выявления антител при ВГУ-1 применяют метод иммуноферментного анализа (ИФА). Он позволяет определять уровень материнских антител и проводить оценку напряженности поствакцинального иммунитета. Для изучения состояния гуморального иммунного ответа на ВГУ-1 разработаны не прямые методы ИФА для выявления сывороточных антител, относящихся

к различным классам иммуноглобулинов (IgA, IgM и IgG) [9]. В последние годы для обнаружения специфических антител разработаны тест-системы ИФА с использованием VP1 и VP3 белков ВГУ-1 в качестве сорбирующих антигенов. Авторы отмечают, что такой подход к ИФА – более быстрый, простой и практичный [10-12].

Однако среди иммуноферментных тест-систем для выявления антител к вирусу ВГУ-1 перспективны те, в которых используются натуральные высокоочищенные антигены вируса, поскольку это существенно повышает чувствительность и специфичность анализа.



Целью работы явилась разработка отечественной иммуноферментной тест-системы для выявления антител к антигену вирусу ВГУ-1 в сыворотке крови утят/уток для контроля поствакцинального иммунитета и проведения мониторинговых исследований.

Материал и методика исследований. Антиген. В качестве антигена в ИФА использовали инактивированный биоцидом «Инак» вирус ВГУ-1 штамма «ВН-3», культивированный в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Концентрирование инактивированной вирусосодержащей культуральной жидкости включало низкоскоростное центрифугирование при 1000 g в течение 20 мин и дифференциальное центрифугирование при 60000 g в течение 1,5 ч. Очистку концентрированного антигена вируса проводили гель-фильтрацией на колонке с макропористым стеклом (МПС) марки 1000 ВГХ в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,3-7,5. Степень чистоты полученного антигена вируса ВГУ-1, оцененная в электрофорезе в полиакриламидном геле (по методу Леммли), составила не менее 96%. Концентрация белка (по методу Брэдфорда) составила 70-85 мкг в 1,0 см³ (спектрофотометр UNICO-2800, США).

Сыворотки крови. Отрицательным контролем служили образцы сыворотки крови уток, не содержащие антител к вирусу ВГУ-1 и к другим возбудителям вирусных инфекций, положительным контролем – специфическая к вирусу ВГУ-1 сыворотка крови уток с титром не менее чем 1:800.

Непрямой вариант ИФА. Очищенный антиген вируса ВГУ-1 сорбировали в лунках планшета Nunc «Maxisorp», (Дания) в оптимальной концентрации в течение 18-20 ч при 4-8°C в 0,01 М

фосфатно-солевым буфере, pH 7,3-7,5. Для подавления неспецифического взаимодействия с носителем использовали промывочный 0,01 М калий-фосфатный буфер (ФБР), pH 7,3-7,5, содержащий 0,5 М NaCl, с 0,1% конечной концентрацией детергента твина-20 (ФБР-Т).

При постановке ИФА методом последовательных разведений титрование проб сывороток крови проводили с двукратным шагом, начиная с разведения 1:50, используя при этом для разведения ФБР-Т. При тестировании сывороток в одном разведении в качестве рабочего использовали разведение 1:100.

Контрольные (положительную и отрицательную) и исследуемые сыворотки крови уток (утят) вносили в планшет по 0,1 см³ в разведении 1:100 и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Связавшиеся антитела определяли добавлением в каждую лунку планшета по 0,1 см³ рабочего разведения антивидового иммунопероксидазного конъюгата, специфичного к IgG уток, в буфере для разведения. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при 37°C.

После каждого этапа проводили 3-4-кратную промывку лунок в объеме 0,2 см³ ФБР-Т.

Для выявления образовавшегося комплекса в каждую лунку планшета вносили по 0,1 см³ субстратно-индикаторной смеси ОФД (ортофенилендиамин). Планшет помещали в темное место при комнатной температуре на 3-5 мин. Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 0,05 см³ 10% H₂SO₄. Учет реакции проводили на иммуноферментном анализаторе «Униплан» при длине волны 492 нм.

При постановке ИФА методом титрования титром антител считали последнее разведение сыворотки, оптическая плотность (ОП) в котором была более чем в 2 раза выше, чем среднее значение для

отрицательного контроля. Методом одного разведения сыворотки (1:100) расчет титра проводили по формуле, которая связывает S/P-отношение с конечным титром: $Ig T = 1,96 (Ig S/P) + 3,49$.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами расчета 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.

Результаты исследований и их обсуждение. Инактивированный вирус использовали в качестве антигена в непрямом варианте ИФА для определения антител к вирусу ВГУ-1. При разработке иммуноферментной тест-системы были оптимизированы условия постановки реакции.

Рабочее разведение антигена вируса гепатита утят, определенное путем его шахматного титрования со специфической и нормальной сыворотками в непрямом варианте ИФА, составило 1:6, а иммунопероксидазного конъюгата – 1:100.

Для определения титра антител при тестировании сывороток в одном разведении были использованы значения ОП контрольных и испытуемых сывороток. Методом последовательных разведений были раститрованы 20 положительных сывороток крови уток разной активности (в трех повторностях). Величину S/P для разведений сывороток 1:50, 1:100, и 1:200 рассчитывали по формуле: $S/P = \frac{OP_{исслед. пр} - OP_N}{OP_p - OP_N}$, где OP_p – среднее значение ОП положительного контроля, OP_N – среднее значение ОП отрицательного контроля. По измеренным ОП исследуемых проб



Таблица 1. Оценка воспроизводимости результатов ИФА (n=10).

Наименование сыворотки	Исследование/ Количество проб	Показатель			
		Среднее значение титра в ИФА*	Стандартное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (CV), %	Среднее значение CV, %
Сыворотка от вакцинированной птицы	1/10	2014.3	153.3	7.61	8,33
	2/10	2015.4	182.1	9.04	

Примечания: 1 – первое исследование; 2 – второе исследование через 4 ч на другом планшете; * – титры в обратных значениях.

(ОП исслед. пр.), положительной (Р) и отрицательной (N) контрольных сывороток методом регрессионного анализа были найдены коэффициенты линейной регрессии для Ig S/P и Ig титров (Т). Высокое значение коэффициента корреляции было определено для разведения сыворотки 1:100, которое и было принято за рабочее, а для расчета числового значения титра использовали уравнение линейной регрессии (lg T = 1,96 (lg (S/P) + 3,49).

В результате тестирования 20 значений оптической плотности контрольных сывороток, исследованных в разведении 1:100, установлены их допустимые значения: для отрицательного контроля – не выше 0,2; для положительного – не ниже 0,4.

Для оценки иммунного ответа был установлен позитивно-негативный порог. Сыворотки крови от клинически здоровых уток, полученных из утководческих хозяйств, благополучных по ВГУ-1, в количестве 50 проб, исследовали в трех повторностях в различные дни. На основании проведенного статистического анализа S/P-отношение для отрицательной реакции составило $\leq 0,2$, для положительной реакции $\geq 0,24$, а промежуточные величины 0,2-0,24 соответствовали «сомнительным» результатам.

При постановке реакции методом последовательных разведений титр антител меньше или равный 1:100 считали отрицательным, а больше или равный 1:200 – положительным.

Воспроизводимость результатов оценивали по коэффициенту вариации между двукратными

(через 4 ч) исследованиями одних и тех же проб сыворотки крови, полученной от птицы, вакцинированной вирусвакциной ВНИВИП против ВГУ-1 (табл. 1).

Результаты, полученные при постановке ИФА в повторности, показали, что среднее значение коэффициента вариации не превышало 10%. Таким образом, использование разработанной тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита в непрямом варианте ИФА позволило получить воспроизводимые результаты.

Стабильность иммуноферментной тест-системы оценивали по результатам исследований контрольных сывороток после хранения компонентов тест-системы в защищенном от света месте при температуре 4-8°C в течение 12 месяцев (табл. 2).

Представленные данные свидетельствуют о сохранении активности антигена вируса ВГУ-1, сорби-

рованного в лунках планшета для ИФА, и активности контрольных сывороток и конъюгата при хранении компонентов тест-системы в течение 12 месяцев (срок наблюдения). Таким образом, соблюдение данных режимов хранения компонентов иммуноферментной тест-системы дает возможность использовать ее на протяжении 12 месяцев и получать воспроизводимые результаты ИФА.

Для подтверждения **специфичности** разработанной тест-системы использовали гомологичные контрольные сыворотки (положительная и отрицательная) и гетерологичные сыворотки к штаммам реовируса и гриппа уток, которые получали экспериментально (табл. 3).

Данные показали, что иммобилизованный антиген вируса ВГУ-1 положительно связывался только со специфическими антителами и не взаимодействовал с антителами

Таблица 2. Результаты исследований контрольных сывороток в ИФА в зависимости от сроков хранения компонентов тест-системы

Контрольные сыворотки	Оптическая плотность при длине 492 нм		
	Срок хранения компонентов тест-системы, мес.		
	4	8	12
Положительная	0,561	0,559	0,616
Отрицательная	0,154	0,138	0,145

Таблица 3. Результаты выявления антител к антигену ВГУ-1 в гомологичных и гетерологичных сыворотках крови уток методом ИФА

№ п/п	Характеристика пробы	Титр антител в ИФА*	Качественная оценка результата
1	Положительная (контрольная) сыворотка крови к вирусу ВГУ-1	1600	положительный
2	Отрицательная (контрольная) сыворотка крови утят	100	отрицательный
3	Гипериммунная сыворотка крови к вирусу ВГУ-1	3200	положительный
4	Сыворотка крови к реовирусу теносиновита уток	50	отрицательный
5	Сыворотка крови к вирусу гриппа уток	50	отрицательный

Примечание: * – титры антител в обратных величинах.



Таблица 4. Активность сывороток крови в реакции нейтрализации и ИФА (n=25)

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови	Активность сывороток	
		РН, log ₂	ИФА*
1	Сыворотка крови от не вакцинированных уток	3,0±0,1	156±13
2	Сыворотка крови от вакцинированных уток	8,0±0,2	2504±73

Примечание: * – титры антител в обратных величинах, P <0,05.

Таблица 5. Результаты исследований проб сыворотки крови в иммуноферментной тест-системе (n=25)

№ п/п	Наименование сыворотки	Средний титр антител в ИФА*	Число положительных проб, %
1	Сыворотка крови уток до вакцинации	176±11	-
2	Сыворотка крови от вакцинированных уток	4534±214	100
3	Сыворотка крови суточных утят, полученных от вакцинированных родителей	1645±126	100

Примечание: * – титры антител в обратных величинах, P <0,05.

нормальной сыворотки крови утят и с антителами к другим вирусам.

Оценку относительной чувствительности и специфичности тест-системы проводили путем сравнения результатов, полученных с применением разработанного ИФА и РН. Результаты тестирования 25 проб сыворотки крови, полученных до вакцинации и через 28 дней после вакцинации уток

экспериментальной вирусвакциной ВНИВИП против ВГУ-1, представлены в табл. 4.

Данные указывают, что чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы относительно РН для сывороток крови от вакцинированных уток составила 100%.

Для определения диагностической чувствительности и специ-

фичности разработанной тест-системы исследовали сыворотку крови уток до вакцинации и на 60 сутки после вакцинации уток экспериментальной вирусвакциной ВНИВИП, а также сыворотку крови утят, полученных от вакцинированных уток (табл. 5).

Результаты серологических исследований показали, что до вакцинации все пробы сыворотки крови уток были отрицательными, после иммунизации уток и у суточных утят, полученных от данной птицы, антитела к вирусу гепатита были обнаружены во всех пробах сыворотки крови.

Заключение. Разработанная тест-система на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу ВГУ-1 показала высокую специфичность и чувствительность (100%) и воспроизводимость и может применяться для контроля поствакцинального иммунитета против ВГУ-1 и проведения мониторинговых исследований.

Литература / References

1. Wang L., Pan M., Fu Y., Zhang D. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis // *Virus Genes*. - 2008. - V. 37, No 1. - P. 52-59. doi: 10.1007/s11262-008-0233-1
2. Trefilov B.B., Nikitina N.V., Yavdoshak L.I., Dmitriev K.YU., Trubitsyn M.M. Duck hepatitis virus type I // *Eur. J. Nat. History*. - 2018. - No. 1 - P. 3-6.
3. Hu Q., Zhu D., Ma G., Cheng A., Wang M., Chen S., Jia R., Liu M., Sun K., Yang Q., Wu Y., Chen X. A one-step duplex rRT-PCR assay for the simultaneous detection of duck hepatitis A virus genotypes 1 and 3 // *J. Virol. Methods*. - 2016. - V. 236. - P. 207-214. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.011
4. Wen X.J., Cheng A.C., Wang M.S., Jia R.Y., Zhu D.K., Chen S., Liu M.F., Liu F., Chen X.Y. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay // *Poult. Sci.* - 2014. - V. 93, No9. - P. 2184-2192. doi: 10.3382/ps.2014-04024
5. Князев В.П. Вирусный гепатит утят (уток). Владимир, 2013. – 325с. (Knyazev V.P. Viral Hepatitis of Ducklings (Ducks). Vladimir, 2013. 325 pp.)
6. Kim M.C., Kwon Y.K., Joh S.J., Lindberg A.M., Kwon J.H., Kim J.H., Kim S.J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type I reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family *Picornaviridae* // *J. Gen. Virol.* - 2006. - V. 87, Pt. 11. - P. 3307-3316. doi: 10.1099/vir.0.81804-0
7. Yang M., Cheng A., Wang M., Xing H. Development and application of a one-step real-time Taqman RTPCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 // *J. Virol. Methods*. - 2008. - V. 153, No 1. - P. 55-60. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.06.012
8. Woolcock, P.R. Dick viral hepatitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, Paris, France. 2010.
9. Mao S., Ou X., Zhu D., Chen S., Ma G., Wang M., Jia R., Liu M., Sun K., Yang Q., Wu Y., Chen X., Cheng A. Development and evaluation of indirect ELISAs for the detection of IgG, IgM and IgA1 against duck hepatitis A virus 1 // *J. Virol. Methods*. - 2016. - V. 237. - P. 79-85. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.019

10. Li X., Zhao R., Lin W., Li C., Zhang T., Meng F., Liu M., Zhang Y. Evidence of VP1 of duck hepatitis A type 1 virus as a target of neutralizing antibodies and involving receptor-binding activity // Virus Res. - 2017. - V. 227. - P. 240-244. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.018
11. Liu M., Zhang T., Zhang Y., Meng F., Li X., Hou Z., Feng X., Kong X. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus 3 // J. Virol. Methods. - 2010. - V. 169, No 1. - P. 66-69. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.018
12. Shen Y., Cheng A., Wang M., Shun Chen 1, Jia R., Zhu D., Liu M., Sun K., Yang Q., Chen X. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies // J. Virol. Methods. - 2015. - V. 225. - P. 30-34. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.08.016

Сведения об авторах:

Никитина Н.В.: кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии; vnivip.nikitina@yandex.ru.

Статья поступила в редакцию 03.03.2022; одобрена после рецензирования 10.04.2022; принята к публикации 29.04.2022.

Research article

Development and Application of a Test System Based on Indirect ELISA Variant for Control of Post-Vaccinal Immunity to Duck Viral Hepatitis Type I

Nina V. Nikitina

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of the Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry" of Russian Academy of Sciences

Abstract. Duck viral hepatitis type I (DVH-1) remains an urgent problem for duck farming. An important role in its control is assigned to specific prophylaxis with the use of live and inactivated vaccines and the assessment of the effectiveness of vaccination. Therefore, the improvement of methods of serological monitoring of the immune response in vaccinated poultry is extremely necessary. The results of the development of a new Russian test system based on an indirect variant of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of antibodies to DVH-1 are presented. The purified inactivated antigen of the VN-3 strain of the virus and anti-species immunoperoxidase conjugate specific for duck IgG were obtained. The conditions of the test reaction were optimized, the positive-negative threshold was established in the study of 50 negative duck blood sera. Average variation coefficient did not exceed 10% evidencing the reproducibility of the ELISA results. A strong correlation between the results of the neutralization test and ELISA test was shown. The high sensitivity and specificity of the developed test system for antibodies to DVH-1 virus in the blood serum of ducklings/ducks was proved. The test system could be therefore recommended for the control of post-vaccinal immunity and monitoring studies of the DVH-1.

Keywords: duck viral hepatitis type I, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), blood serum, specific antibodies.

For Citation: Nikitina N.V. (2022) Development and application of a test system based on indirect ELISA variant for control of post-vaccinal immunity to duck viral hepatitis type I. Ptitsevodstvo, 71(5): 55-59. (in Russ.)
doi: 10.33845/0033-3239-2022-71-5-55-59

(For references see above)

Authors:

Nikitina N.V.: Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Lead Research Officer of Dept. of Virology; vnivip.nikitina@yandex.ru.

Submitted 03.03.2022; revised 10.04.2022; accepted 29.04.2022.

© Никитина Н.В., 2022

