Получение компонентов диагностического набора ИФА для идентификации IPNV при мониторинговых исследованиях Obtaining of the ELISA diagnostic kit components for identification of IPNV during monitoring studies

Карпова М.А.
г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-7-16
УДК 619:616.98:579.843.95:639.3.091

Ключевые слова: вирус-возбудитель, диагностика, иммунологические методы, градиент, ультрацентрифугирование

Key words: causative virus, diagnostics, immunologic methods, gradient, ultracentrifuging.

Резюме. Инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (Infectious pancreatic necrosis, IPN) занимает ~~существенное место в ряду инфекционных заболеваний~~ рыб, внесен в "Перечень карантинных и особо опасных болезней рыб" от 29 сентября 2005 года и вызывает до 90% смертности в условиях индустриального рыбоводства. Целью настоящего исследования является подбор оптимальных методов и условий очистки и концентрирования вируса IPN штамм "N07-1". Наиболее эффективная схема накопления, очистки и концентрирования вируса включает культивирование в перевиваемой культуре клеток OMG, дву-

кратное 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.

Summary. Infectious pancreatic necrosis of salmon (Infectious pancreatic necrosis, IPN) occupies a significant place in a number of infectious fish diseases, included in the "List of quarantine and especially dangerous fish diseases" of September 29, 2005 and causes up to 90% mortality in industrial fish farming. The purpose of this study is to select the best methods and conditions for the purification and concentration of the IPN strain "N07-1". The most effective schedule of the accumulation, purification and concentration of the virus comprises the cultivation of OMG cells in the passaged culture, double freezing and thawing, incubation with PEG -6000 18 hours, ultracentrifuging in two stages at the sucrose solution density gradient, what allows to obtain the titre of 12 lg virus after the purification.

Введение

Инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (Infectious pancreatic necrosis, IPN) занимает существенное место в ряду инфекционных заболеваний рыб, внесен в "Перечень карантинных и особо опасных болезней рыб" от 29 сентября 2005 года и вызывает до 90% смертности в условиях индустриального рыбоводства [6,13]. Во всем мире IPN расценен как одно из самых серьезных заболеваний в производстве лососевых рыб, наряду с такими нозологиями как вирусная геморрагическая септицемия лососевых, а также весенняя виремия карпов, уже выявленные в нашей стране [7,12]. Болезнь характеризуется нарушением координации движения, вздутием брюшка, потемнением кожного покрова, слабыми дыхательными движениями, развитием одно- или двусторонней экзофтальмии; рыба опускается на дно, жабры бледные, из ануса выделяется беловатая слизь. Патологоанатомически выражается поражением поджелудочной железы, точечными кровоизлияниями на пилорических придатках, изменениями в селезенке, печени и других паренхиматозных органах. Септический процесс приводит к поражению практически всех органов и тканей [15].

Возбудителем IPN является РНК-содержащий вирус, который принадлежит к роду Aquabirnavirus семейства Birnaviridae [1]. Согласно Руководству МЭБ (OIE), лабора-

Авторы / Authors

Карпова М.А., младший научный сотрудник, лаборатории ихтиопатологии

Завьялова Е.А., к.б.н., заведующая лабораторией ихтиопатологии, aquazeda@yandex.ru

Сарпова М.А., Zavyalova E.A.

ФГБНУ ФНЦ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН" (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия.

торная диагностика IPN предусматривает выделение возбудителя в чувствительных клеточных линиях, серологическую идентификацию вируса с помощью реакции нейтрализации, иммуноферментного анализа и реакции иммунофлуоресценции, а также выявление генома вируса IPN в полимеразной цепной реакции [2,8].

В диагностике заболеваний важную роль играют иммунологические методы, основанные на использовании специфических сывороток, для получения которых необходимо проводить иммунизацию лабораторных животных очищенным и концентрированным антигеном вируса IPN [10].

Целью настоящего исследования является подбор оптимальных методов и условий очистки и концентрирования вируса IPN штамм "N07-1".

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген IPNV штамм N07-1, выращенный на культуре клеток EPC [11] и OMG [9].

Определение инфекционного титра вируса в культуре клеток. Инфекционный титр вируса определяли по цитопатическому действию в культуре клеток, в полистироловых панелях. В лунки 96-луночной панели вносили по 270 мкл клеточной суспензии на поддерживающей среде, в концентрации 3×10^2 /мкл. Далее в 4 лунки первого ряда вносили 30 мкл вируса, который титровали, перенося по 30 мкл в лунки каждого следующего ряда. На одной панели проводилась работа с вирусом одновременно в двух культурах клеток. Учёт цитопатического действия проводили микроскопированием зараженных культур клеток через 1, 3, 5 дней инкубации при оптимальной температуре. Окончательный учёт ЦПД проводили на 7 сутки. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча.

Реакция нейтрализации. РН ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с постоянной дозой вируса $100 \text{ TCID}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. За титр вируснейтрализующих антител принимали конечное разведение сыворотки, которое полностью ингибировало ЦПД вируса.

Очистка и концентрирование вируса. Концентрирование IPNV проводили методом осаждения ПЭГ-6000 [3,4,14] и с использованием сульфата аммония. Накопленный вирус (хранили при температуре минус 70°C). Далее, сконцентрированный вирус подвергали очистке методом ультрацентрифугирования на ступенчатом градиенте плотности хлористого цезия и сахарозы [5, 14].

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы было заражение культуры клеток вирусом, таким образом, чтобы рабочий титр был равен 10^3 , для этого предварительно вытитрованный вирус разводили до рабочего титра.

Вирус вносили из расчета на 100 мл среды 0,1 мл вируса (100 мкл). Матрасы оставляли в термостате при температуре необходимой для репликации данного вируса. Через 5–7 дней вирус разрушал клетки, образовывалась вирусосодержащая суспензия, которую собирали, промораживали в течение суток при температуре минус 18°C для окончательного разрушения клеток и более полного выхода вируса. Далее суспензию осветляли центрифугированием при 1000 g в течение 20 мин, снимали надосады и использовали для вирусологических работ.

Получение вирусного антигена начинали с разрушения клеточного детрита замораживанием и оттаиванием. Культуральную вирусосодержащую жидкость после двухкратного замораживания и оттаивания осветляли центрифугированием с ускорением 7000 g в течение 10 мин. 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 ч при плюс 4°C, отбирая аликвоты для

титрования через 2, 4, 8, 18 и 24 ч соответственно (табл. 1). Далее центрифугировали при 1000 g с постепенным увеличением до 13000 g, температура плюс 4°C в течение 45 мин. Ресуспензировали полученный осадок в 1/50 первоначального объема.

Как видно из данных таблицы 1 оптимальное время инкубации составило 18 ч.; при 24 ч титр увеличивался незначительно, следовательно, инкубировать в течение 18 ч целесообразней.

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

По первому методу в центрифужных пробирках на дно настилали 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 – бакет-ротатор SW32T. В данном режиме вирус осаждался на подложку 60% сахарозы. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 ч с трехкратной заменой при плюс 4°C. Далее проводили второй этап очистки, который заключался в настиании 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 – бакет-ротер SW41T. Визуальное формирование вирусной полосы оценивали на градиенте 50 %. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 ч с трехкратной заменой при плюс 4 °C. 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 настилали на ступенчатый градиент плотности хлористого цезия (15–60 %) и центрифугировали с ускорением 100000 g в течение двух часов при плюс 4°C – бакет-ротатор SW32T. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 ч с трехкратной заменой при плюс 4°C. Далее аналогично первому методу.

После анализа результатов исследований нами было выявлено, что оптимальным является первый метод, после очистки титр вируса составил 12 lg.

Исследовательская работа выполнена в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в 2016–2017 гг. в рамках исполнения государственного задания по теме № 0578-2014-0025.

Список литературы

1. Dobos, P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) / P. Dobos // Annual Review of Fish Diseases. - 1995. - Vol.5. - P.25-54.
2. OIE Aquatic code 2006[Электронный ресурс] / Available. - Режим доступа: http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_chapitre_1.2.3.htm. (дата обращения 29.08.2018)
3. Tjissen, P. Practica and theory of enzyme immunoassay / P. Tjissen // Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology. - Amsterdam; New York; Oxford, 1985. - P. 194-280.
4. Баррет, Т. Вирусология: Методы / Т. Баррет, П.Берд, Дж. Клегг - М.: Мир, 1988. - 344 с.
5. Биотехнология / под ред. Е.С. Воронина. - СПб: ЗАО ГИОРД, 2005. - 792с.
6. Гулюкин М.И. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России / Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. // Ветеринария, - 2011, - № 8, - С. 3-7
7. Завьялова Е.А. Выделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых от рыб в естественных водоемах / Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Кандрин Н.Ю., Калинина Н.Р. // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 2011. С. 75-77.

Табл.1. Изменение титра вируса IPN 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

8. Завьялова Е.А. Полимеразная цепная реакция в диагностике вирусных болезней рыб / Завьялова Е.А., Кандрина Н.Ю., Ломакина Н.Ф., Гулюкин М.И. // Сб. Ветеринарная медицина., Харьков, 2011. № 95. С. 59-60.
9. Завьялова Е.А. Изучение чувствительности к вирусам новой перевиваемой линии клеток из гонад радужной форели / Завьялова Е.А., Карпова М.А., Богданова П.Д., Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И. // Ветеринария и кормление. 2013. № 4. С. 41-43.
10. Завьялова Е.А. Экспериментальное обоснование схемы иммунизации кроликов для получения антисыворотки против вируса-возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) / Завьялова Е.А., Карпова М.А., Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И. // Ветеринария и кормление. 2012. № 3. С. 42-44.
11. Завьялова Е.А. Культуры клеток рыб для вирусологических исследований и диагностики вирусных болезней / Завьялова Е.А., Пичугина Т.Д., Дьяконов Л.П., Борисова М.Н. // Клеточные культуры. 2005. Т. 20. С. 53-57.
12. Пичугина Т.Д. Весенняя виремия карпов / Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Завьялова Е.А., Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И. // Ветеринария. 2004. № 5. С. 28-30.
13. Пичугина Т.Д. Выделение вируса инфекционного некроза поджелудочной железы / Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Борисова М.Н., Дьяконов Л.П., Надточей Г.А., Шуляк А.Ф. // Ветеринария. 2005. № 1. С. 31-32.
14. Практикум по иммунологии / под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. - М.: МГУ, 2001. - 224с.
15. Стаффорд В.В. Патоморфологические изменения внутренних органов радужной форели при экспериментальном инфекционном некрозе поджелудочной железы лососевых / Стаффорд В.В., Кандрина Н.Ю., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные, - 2013, - №4, - С.22-24.