УДК: 619:616.34-002:636.598

ОЧИЩЕННЯ ТА КОНЦЕНТРУВАННЯ ВІРУСУ ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ ДЛЯ РОЗРОБКИ МЕТОДУ ІФА

Н. М. Музика,* О. В. Циновий, І. Ю. Безрукава, Г. В. Білецька, Н. П. Грибкова
Інститут птахівництва УААН
О. Ю. Семенченко, М. В. Рєпін
Інститут проблем кріобіогії та кріомедицини НАН України

Резюме. *Розроблено технологічні параметри очищення та концентрування вірусу ентериту гусей. Вірус ідентифіковано за допомогою електрофорезу в поліакріламідному гелі та електронної мікроскопії. При очищенні і концентруванні вірусу інфекційний титр, у порівнянні з вихідним, підвищився на 2,0 lg* $ТЦД_{50/см3}$.

Ключові слова: *вірус ентериту гусей, інфекційний титр, електрофорез, електронна мікроскопія, ультрацентрифугування.*

Summary. *It has been worked out technological parameters of cleaning and concentrating of the goose enteritis virus. The virus was identified using electrophoresis in polyacrylamide gel and electronic microscopia. The infectious titer increased by 2,0 lg* $TTsD_{50/sm3}$ *in comparison with the initial one when cleaning and concentrating the virus.*

Key words: *goose enteritis virus, infectious titer, electrophoresis, electronic microscopia, ultracentrifugation.*

Вступ. Вірусний ентерит гусей (ВЕГ, хвороба Держі, Enteritis viralis anserculorum) – гостра контагіозна хвороба молодняку гусей і мускусних качок, що характеризується запаленням шлунково-кишкового тракту і високою летальністю – до 30-90%. Хворіє птиця віком від 1 до 30 днів. Збудник хвороби парвовірус з родини Parvoviridae [1]. Вірусний ентерит широко розповсюджений в гусівничих господарствах України [1, 8]. Проте діагностика цього захворювання затруднена - стандартний діагностичний набір для експрес-діагностики відсутній. На даний час існують методи серодіагностики ВЕГ – реакція нейтралізації (РН), реакція дифузної преципітації (РДП) [11], реакція непрямої гемаглютинації (РНГА) [1]. РДП і РНГА за чутливістю і специфічністю значно поступаються реакції нейтралізації, яка в свою чергу трудоємка і потребує значного часу для постановки. За даними зарубіжних вчених, для діагностики вірусного ентериту гусей також застосовують аналіз бляшок [18] та твердофазний імуноферментний аналіз [15,16,17].

В Україні комерційні набори для визначення ВЕГ в ІФА відсутні.

У Всеросійському науково-дослідному інституті експериментальної ветеринарії (м. Москва) і в Державній академії ветеринарної медицини (м. С.-Петербург) проводились розробки непрямого методу ІФА для діагностики

*науковий керівник – Б.Т. Стегній, доктор вет. наук, професор, академік УААН

вірусного ентериту гусей, але у виробництво ці методи не впроваджені [12, 13]. На сьогоднішній день існує нагальна проблема у розробці високочутливого експрес-методу діагностики, що прискорить проведення наукових досліджень і дасть змогу проводити діагностику вірусного ентериту та контроль напруженості імунітету у дорослих гусей і гусенят.

Основним методом експрес-діагностики на сьогодні вважається реакція імуноферментного аналізу (ІФА), яка має високу чутливість, безпечність, швидкість постановки, стандартизацію обліку та комп'ютерну обробку результатів [9]. Цей метод успішно використовується для виявлення як вірусних антигенів, так і специфічних антитіл у тварин-реконвалесцентів або імунізованих противірусними вакцинами [4, 5, 7, 8].

Реалізація ідеї створення діагностичних наборів ІФА потребує вирішення складних і різноманітних завдань. Це, насамперед, виділення антигенних фракцій, вивчення їх структури, фізико-хімічних та імунобіологічних властивостей, що визначають специфічність конкретного антигену.

В попередні роки парвовірус гусей намагались очищати за допомогою макропористої гель-хроматографії [12], ультрафільтрацією через спеціальні фільтри [5], але досягти такого рівня очищення вірусу, як при використанні методу ультрацентрифугування у градієнті густини сахарози-хлористого цезію не виявилось можливим [13].

Метою досліджень було розробити метод очищення і концентрування парвовірусу та отримати антиген, який в подальшому буде використаний для розробки імуноферментного аналізу.

Матеріали і методи. В дослідженнях було використано:

- вакцинний штам вірусу ентериту гусей BBS-99, розплодку якого одержували в культурі клітин фібробластів ембріонів гусей загальноприйнятим методом.

Очищення та концентрування вірусу проводили стандартними методами [3]. Було використане наступне обладнання:

- центрифуга РС – 6 та ультрацентрифуга MSE.
- проточний спектрофотометр LKB 2238 "Uvicord S" з калібратором фракцій та самописцем - для сканування вірусних фракцій в градієнтах густини сахарози-хлористого цезію;
- диспергатор УЗДН–А - для проведення ультразвукової обробки вірусного матеріалу;
- апарати LKB 2117 Multifor System та LKB 2197 Constant Power Supply та гель 120 х 250 х 0,5мм на підкладці Gel Bond (Serva, Німеччина) - для проведення електрофорезу в поліакріламідному гелі.

Перегляд зразків при електронній мікроскопії здійснювали за допомогою електронного мікроскопу ПЭМ-125К при прискорюючому напруженні 75 kV, що має в своєму складі систему зйомки та аналізу зображення CAI - 01A (АО "SELMI", м. Суми) на основі CCD камери DX- 2.

Якість очистки перевіряли за допомогою:

- визначення біологічної активності вірусу шляхом титрування на культурі клітин гусячих фібробластів;
- визначення концентрації білку в отриманих фракціях за методом Бредфорда [2];
- електронної мікроскопії методом негативного контрастування;
- електрофорезу в поліакріламідному гелі (ПААГ) за Gorg A. [15] в порівнянні з стандартними білками фірми «Fermentas» (14 білків з відомими масами в кілодальтонах).

Результати досліджень. В попередні роки (2001-2004) проводились дослідження щодо очищення та концентрування вірусу в градієнті щільності сахарози та хлористого цезію [8], проте не було досягнуто необхідної концентрації вірусу. Аналіз результатів, одержаних при застосуванні випробуваних методів, показав, що основні методичні труднощі обумовлені тісним зв'язком віріонів із структурними елементами клітин та наявністю в підтримуючому середовищі сироватки великої рогатої худоби. Для подолання цих перешкод було проведене вдосконалення методу очищення.

Як вихідний матеріал використовували культуральну розплодку вірусу BBS - 99 з титром 7,5 lg ТЦД 50/см^3.

На першому етапі для концентрування вірусного матеріалу нами був використаний 8%-ий поліетиленгліколь (ПЕГ - 6000), який додавали до культуральної розплодки. Суміш витримували 16 годин при температурі +4 ^{0}C, після чого центрифугували. Отримані осади ресуспензували в TSE- буфері (pH 7,6).

На другому етапі концентрування ресуспензовані проби з вірусом центрифугували на ультрацентрифузі MSE через 30% сахарозну «подушку» (76000 xg, +4 ^{0}C). Щоб розірвати тісні зв'язки між віріонами та клітинними мембранами вірусну суспензію піддавали дії ультразвуку 22 кгц протягом 2 хвилин, після чого нашаровували на лінійний градієнт густини сахарози-хлористого цезію і центрифугували на ультрацентрифузі MSE (90000 xg, +4 ^{0}C). Після центрифугування лінійні градієнти сканували на проточному спекрофотометрі LKB 2238 "Uvicord S". За результатами сканування, за піком гаусових кривих відбирали фракції очищеного вірусу, які піддавали діалізу через напівпроникні мембрани проти TSE – буфера (pH 7,6). Ця маніпуляція проводилась для звільнення вірусу від реагентів, використаних при очищенні.

Після очищення і концентрування інфекційний титр вірусу ентериту становив 9,2-9,5 lg ТЦД$_{50}$/см^3, що на 2 lg ТЦД $_{50}$/см^3 вище, ніж у вихідному матеріалі.

Електрофорез отриманих фракцій вірусу проводили в поліакріламідному гелі (ПААГ) в порівнянні з стандартними білками фірми Fermentas. В препаратах було виявлено чотири структурні поліпептиди, які за молекулярною вагою відносяться до вірусу ентериту гусей - 40, 47, 58, 87 кДа. При цьому вміст білку у дослідних пробах коливався від 200 до 500 мкг/мл.

При електронно-мікроскопічних дослідженнях у зразках з очищеним і концентрованим вірусом було виявлено віріони розміром 20-22 нм, які за

морфологічними характеристиками відносяться до вірусу ентериту гусей (Рис. 1).

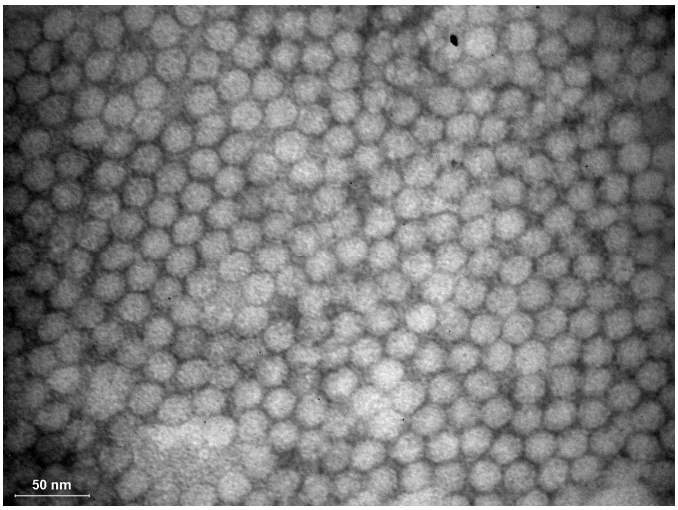

Рис. 1 - Вірус ентериту гусей. Зб. х 120 000

Таким чином, аналізуючи отримані нами результати щодо очищення і концентрування вірусу ентериту гусей, можна зробити висновок, що одержаний таким методом антиген придатний для розробки тест-системи імуноферментного аналізу.

Висновки

1. Застосовані технологічні параметри очищення та концентрування вірусу ентериту гусей показали можливість одержання антигену, якість очистки якого підтверджена електрофорезом в поліакріламідному гелі та електронною мікроскопією дослідних зразків.
2. При очищенні і концентруванні вірусу інфекційний титр підвищився порівняно з вихідним на 2,0 lg $ТЦД_{50/см3}$ і склав 9,2 - 9,5 lg $ТЦД_{50/см3}$.
3. Отримані очищені фракції вірусу можна використовувати для розробки параметрів постановки імуноферментного аналізу (ІФА).

Список літератури

1. Білецька Г. В. Вивчення епізоотичного статусу щодо вірусного ентериту гусей методом серомоніторингу / Г. В. Білецька, І. Ю. Безрукава, Н. М. Пересада // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. / ІП УААН. - Х., 2004. – Вип. 55. - С. 235-238.
2. Бредфорд М. Методика определения белка по Бредфорду / М. Бредфорд // Справочник биохимика.- М. : Высшая школа, 1991. – С. 466-467.
3. Гридин А. С. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных / А. С. Гридин, И. Н. Титов. - М. : Колос, 1971. – 240 с.
4. Егоров А. М. Теория и практика ИФА / Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б. - М. : Высшая школа, 1991. – 288 с.
5. Ерофеев С. Г. Концентрирование парвовируса свиней ультрафильтрацией / С. Г. Ерофеев, В. В. Борисов, Т. З. Байбиков // Сборник материалов

научно-практической конференции «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы», 23-25 мая 2001 г. – Киров, 2001. – С. 23-24.

6. Іванська Н. В. Практичний посібник з імуноферметного аналізу / Іванська Н. В., Кислих О. М., Максименко О. В.; під ред. А. Л. Гураля та М. Я. Співака. – Київ, 2003. - 51 с.
7. Нго Т. Т. Иммуноферментный анализ / Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. - М. : Мир, 1988. – 387 с.
8. Музика Н. М. Отримання очищеного антигену вірусу ентериту гусей для імуноферментного аналізу / Н. М. Музика, Г. В. Білецька, І. Ю. Безрукава // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. / ІЕКВМ. – Х., 2004. - Вип. 84. - С. 509-512.
9. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом / ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 1998.- С. 6-9.
10. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций Ч.1 / ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2008. – 306 с.
11. Трефилов Б. Б. Специфическая профилактика вирусного энтерита гусей / Б. Б. Трефилов // Вирусные болезни с.-х. животных.- Владимир, 1995. - С. 277.
12. Трефилов Б. Б. Оценка поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей методом иммуноферментного анализа / Б. Б. Трефилов, Н. В. Никитина, Д. В. Маслов // Материалы международ. науч.–практ. конф., посвященной 110–летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России, 21 – 22 сентября 2006 г. - 2006. – С. 200 – 206.
13. Фадель Г. А. Метод ИФА для диагностики вирусного энтерита гусей / Г. А. Фадель, Л. М. Надточей, А. В. Контримавичус // Ветеринария. – 1989. - № 7. - С. 36-39.
14. Gorg A. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analisis of urinary proteins / A. Gorg, W. Postel, J. Weser // Scince Tools. - 1985. - Vol. 32, № 1. - С. 5-9.
15. Have P. Detection of goose parvovirus antibodies by microneutrelis and enzyme – linked immunosorbent assay / P. Have, H. S. Hansen // Proc. 7 th. World Vet. / Poult. Assoc. – Oslo, Norway, 1993. - P. 60.
16. 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.
17. 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.
18. Takehara R. Issolation identification and plaque titration of parvovirus from Muscovy ducks in Japan / R. Takehara, K. Hyaktaka, K. Immamura // Avian Dis. - 1994. – V. 389. – P. 810 - 815.