

Физиологические исследования

УДК 619: 616 – 002.4: 639.371.1: 616 – 078

М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков

МЕТОД ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

Разработаны способы приготовления и контроля латекс-агглютинационных препаратов для выявления антител к вирусу инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых рыб. Определена степень сенсибилизации латексных частиц. Аналитическая чувствительность приготовленных препаратов равна 0,9 мг/мл. При исследовании 40 сывороток крови в реакции агглютинации латекса диагностическая чувствительность и специфичность были равны 90 % и 100 % соответственно. Данный метод простой и быстрый в исполнении, может применяться в качестве скринингового для выявления сывороточных антител, специфичных к вирусу инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых рыб. Подобраны условия получения латексных препаратов, которые позволяют выявлять антитела к вирусу инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых, а также критерии оценки результатов латекс-агглютинационного анализа.

Ключевые слова: вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани, реакция латекс-агглютинации, антитела, аналитическая чувствительность, диагностическая специфичность и чувствительность.

В настоящее время аквакультура является самым быстрорастущим сектором производства продуктов питания в мире. В Российской Федерации сегодня выращивают 70–75 тыс. т рыбы, что почти в 4 раза меньше, чем производилось в 1990 г. [1]. Основным фактором, тормозящим развитие аквакультуры, являются инфекционные болезни, одной из которых является инфекционный некроз гемопозитической ткани (ИНГТ) лососевых рыб, высококонтагиозное вирусное заболевание. Вирус ИНГТ, имеющий линейный одноцепочечный отрицательный РНК-геном, принадлежит к роду *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae* [2].

Заболевание, вызванное вирусом ИНГТ, проявляется в форме экссудативно-геморрагического синдрома, развитие которого обусловлено размножением вируса в соединительной, гемопозитической ткани и клетках экскреторной части почек, что ведет к нарушению водно-минерального баланса и выходу плазмы и клеток крови в окружающие ткани и полости тела. Первыми признаками заболевания являются: анорексия и угнетенное состояние рыб, утрата реакции на внешние раздражители. Больные рыбы приобретают темную окраску, ложатся на дно или поднимаются к поверхности воды и перемещаются к краям бассейна или канала, где течение слабее. Острая вспышка ИНГТ начинается с внезапной массовой гибели, причем первоначально рыбы могут погибать без внешних признаков заболевания. У больных рыб отмечают экзофтальм, побледнение жабр, точечные кровоизлияния в периокулярной соединительной ткани глаз и в межлучевой ткани оснований плавников. Из ануса отдельных больных рыб свисают длинные тяжи слизеподобной консистенции с сероватым оттенком и иногда с примесью крови. У личинок наблюдаются множественные кровоизлияния в желточный мешок и гидроцефалия в виде припухлости на голове. При вскрытии в полости тела обнаруживают скопление прозрачного желтоватого экссудата, множественные петехиальные кровоизлияния в перивисцеральной жировой ткани, на брюшине, стенках кишечника и плавательного пузыря, иногда в мускулатуре. Желудочно-кишечный тракт свободен от пищи, иногда наполнен слизеподобным содержимым молочно-белого цвета. Хроническая форма течения болезни характеризуется менее выраженными клиническими признаками и умеренной, растянутой во времени гибелью рыб. Внешние признаки ИНГТ, за исключением более темной окраски тела, у больных рыб, как правило, отсутствуют. Эта форма заболевания обусловлена поражением центральной нервной системы, и нередко вирус у этих рыб обнаруживают только в головном мозге. Больные рыбы обычно имеют те или иные признаки заболевания из вышеописанного комплекса. Лишь у немногих пораженных особей в период эпизоотии можно встретить весь набор характерных клинических признаков и патологоанатомических изменений. Ни один из описанных признаков не является патогномичным. У 1–5 % рыб, переболевших ИНГТ, развивается искривление позвоночника [2].

Эпизоотическую ситуацию по ИНГТ лососевых рыб в России можно охарактеризовать как неблагоприятную. В 2000 г. в экспериментальном форелевом хозяйстве п. Рыбное Московской области у молоди радужной форели впервые возникла эпизоотия ИНГТ. Вирус был занесен в хозяйство с икрой неизвестного происхождения. В 2001 г. вирус регулярно выявляли у тихоокеанских лососевых, заходивших на нерест в реки Камчатки. В 2004 г. вирус ИНГТ обнаружили в ООО «Селекцентр» в г. Удомля Тверской области [1]. Данное заболевание представляет опасность не только для аквакультуры, но и для диких популяций лососевых [3], и его контроль позволяет сохранять биоразнообразие рыб в природе.

Своевременная диагностика и предотвращение вспышек ИНГТ способствует укреплению производственной продовольственной безопасности страны, позволяет сохранять и развивать межрегиональные и межгосударственные связи. Следовательно, необходимо осуществлять масштабный контроль заболевания в аквакультуре, главным звеном которого является эпизоотологический мониторинг. В настоящее время разрабатываются различные диагностические методы, позволяющие контролировать иммунный статус аквакультуры и обеспечить биозащиту рыбоводных хозяйств. Серологические обследования перенесших вирусную инфекцию лососевых рыб проводят в летнее время, когда в крови появляются специфические антитела и вероятность выделения вируса ИНГТ незначительна. Работа заключается в выявлении имевшего место контакта рыб с вирусом путем детектирования продуцируемых ими антител и имеет целью проведение предварительной оценки эпизоотической ситуации для последующего осуществления прямых вирусологических исследований в хозяйствах. Поиск антител, нейтрализующих антигены вируса ИНГТ, осуществляют с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток папулезной эпителиомы карпа (ЕРС) и иммуноферментного анализа (ИФА) [4]. Однако для всех этих методов характерны весьма существенные недостатки: значительная трудоемкость при проведении и учете результатов, высокие требования к условиям постановки анализов, наличие дорогостоящего и высокоточного оборудования, специально подготовленного персонала.

Наряду с зарекомендовавшими себя методами разрабатываются и используются другие, позволяющие повысить экспрессность и упростить проведение анализа, в частности реакция агглютинации латекса (РАЛ) [5-7], являющаяся доступным и простым методом иммунодиагностики. Важным преимуществом латекс-агглютинационного анализа является возможность его проведения как в условиях лаборатории, так и непосредственно на рыбоводных хозяйствах. Создание латексных наборов является сравнительно простой задачей, не требующей особых условий и глубокой методической подготовки. Стоимость исследования значительно ниже, чем при использовании других диагностических тестов. Реакция длится от 10 до 30 минут. При этом метод является достаточно чувствительным и специфичным. Сущность РАЛ основана на использовании латексных препаратов, представляющих собой микроскопические полимерные частицы органического происхождения, на поверхности которых предварительно адсорбируют биоспецифические антигены. При последующем нанесении подлежащих тестированию жидкостей (сыворотка крови, асцитная жидкость) специфические антитела адсорбируются на поверхности носителя и происходит специфическая реакция агглютинации. Основным недостатком РАЛ является вероятность получения неспецифической агглютинации. Однако количество ложноположительных результатов минимизируют благодаря использованию положительных и отрицательных контролей и применению современных технологий изготовления латексных препаратов [5].

Основной целью исследований являлась разработка метода выявления антител к антигенам вируса ИНГТ лососевых на основе полистирольных латексных частиц, сенсibilизированных специфичными антигенами.

Материалы и методы исследований

В работе использовали вирус ИНГТ штамма «Аркус 32/87», репродуцированный в монослойной перевиваемой культуре клеток папулезной эпителиомы карпа (ЕРС) в среде ДМЕМ, с титром инфекционной активности $7,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Полученную вирусную клеточную суспензию очищали и концентрировали так, как описано ранее [8].

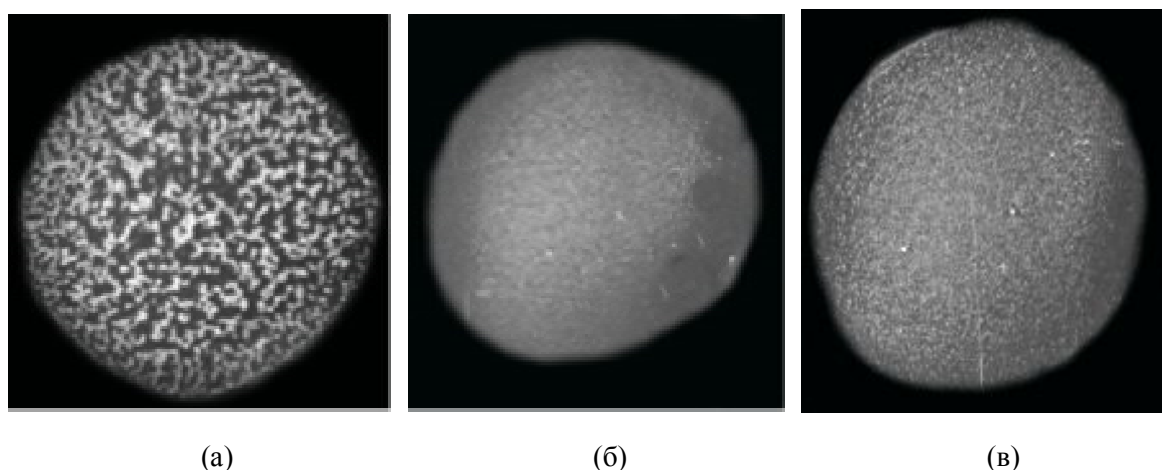
Для экспериментов использовали полистирольные латексные частицы производства ООО «Диафарм» (г. Санкт-Петербург), имеющие диаметр 340 нм и несущие на своей поверхности функциональные группы $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$. Латексные препараты готовили по схеме, предложенной в предыдущей работе [8]. При этом отмывание латексных частиц от раствора сурфактанта, в котором они находились, осуществляли с помощью глицин-солевого буферного раствора (ГСБР) (0,1 М хло-

ристый натрий, 0,1 М глицин) с оптимальными для сенсibilизации латексов значениями рН (8,3 – для карбоксилированных частиц, 6,7 – для аминированных частиц, 6,3 – для частиц с SO₄-группами). Сенсibilизацию латексных частиц с разными функциональными группами (–COOH, –NH₂, –SO₄) проводили антигенами вируса ИНГТ с концентрациями 2000, 1000, 500, 250 мкг/мл. Для блокирования сайтов неспецифического связывания на поверхности латексов применяли глицин-белковый буферный раствор (ГББР), содержащий 1 % бычьего сывороточного альбумина в ГСБР.

Для определения аналитической чувствительности синтезированных латексных препаратов готовили серию разведений (1:100– 1:12800) сывороток крови, содержащих поликлональные антитела, нейтрализующие антигены вируса ИНГТ (с концентрациями 29, 14,5, 7,2, 3,6, 1,8 мг/мл, 900, 450, 225 мкг/мл), в ГСБР с рН 7,0, при котором вирус ИНГТ стабилен [9]. Положительными и отрицательными контрольными препаратами служили сыворотки крови, содержащие и не содержащие антитела против вируса ИНГТ соответственно. Тест на неспецифическую агглютинацию проводили с помощью ГББР. Для определения диагностической чувствительности разработанной тест-системы в РАЛ и непрямом варианте ТФ ИФА исследовали 20 позитивных сывороток крови от лососевых рыб, больных ИНГТ. С целью определения диагностической специфичности латексных препаратов с помощью этих же методов исследовали 20 негативных сывороток крови от здоровых рыб. Постановку диагноза осуществляли при анализе эпизоотической ситуации, клинических признаков, патологоанатомических изменений у рыб, а также на основании результатов реакции вирусыведения в культуре клеток ЕРС, непрямого варианта ТФ ИФА, РИФ и ОТ ПЦР в соответствии с требованиями ОIE Aquatic Animal Health Code (2014) [2]. Для постановки реакции использовали обычные стекла размером 8×12 см. Реакцию учитывали в течение 10-30 минут от начала постановки реакции. Результаты оценивали визуально по системе 4 крестов:

- ++++ – крупнозернистая агглютинация на фоне прозрачной жидкости;
- +++ – мелкозернистая агглютинация на полупрозрачном фоне;
- ++ – мелкозернистая агглютинация на мутном фоне;
- +
- – отсутствие агглютинации, фон равномерно мутный (рис. 1).

Положительным результатом считали агглютинацию на 2–4 креста, сомнительным – 1 крест. При отсутствии агглютинации результат считали отрицательным. РАЛ учитывали, если с положительной контрольной сывороткой наблюдалась агглютинация на 3–4 креста (рис. 1, а), а с отрицательной сывороткой (рис. 1, б) и с ГББР отсутствовала (рис. 1, в).



(а)

(б)

(в)

Рис. 1. Реакция агглютинации латекса на выявление антигенов вируса ИНГТ:

а) положительный контроль; б) отрицательный контроль; в) – тест на спонтанную агглютинацию

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия Мак-Нимара, рассчитывая распределение χ^2 . Экспериментальное значение χ^2 рассчитывали по формуле

$$\chi^2_{\text{эк.}} = (|b - c| - 1)^2 / (b + c),$$

где b – ложноположительные результаты, c – ложноотрицательные результаты. Критическое значение определяли, пользуясь таблицей доверительных границ критерия χ^2 со степенью свободы $f = 1$

для разных уровней значимости p . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической ценности тест-систем определяли диагностическую чувствительность (S_e) и специфичность (S_p) и общую точность (S), которые рассчитывали по формулам:

$$S_e = a/(a + c) \times 100 \%, S_p = d/(d + b) \times 100 \%, S = (a + d)/(a + b + c + d),$$

где a – достоверноположительные результаты, b – ложноположительные результаты, c – ложноотрицательные результаты, d – достоверноотрицательные результаты [10].

Результаты и их обсуждение

Результаты определения степени адсорбции антигенов вируса ИНГТ на поверхности полистирольных латексных частицах с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$) методом Лоури приведены в табл. 1.

Таблица 1

Определение степени сенсибилизации полистирольных латексных частицах с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$) антигенами вируса ИНГТ ($n=3$)

№ п/п	Функциональная группа латексных частиц	Концентрация антигена вируса ИНГТ до адсорбции, мкг/мл	Средняя концентрация адсорбированного белка, мкг/мл	Степень адсорбции, %	Степень сенсибилизации латексных частиц, %
1	-COOH	2000	711,33±0,06	35,57±0,05	100
2		1000	708,67±0,09	70,83±0,10	100
3		750	708,33±0,08	94,46±0,09	100
4		500	500	100	70,45±0,05
5		250	250	100	35,24±0,04
6	-NH ₂	2000	715,33±0,06	35,77±0,04	100
7		1000	714,33±0,08	71,37±0,07	100
8		750	714,17±0,09	95,22±0,14	100
9		500	500	100	69,71±0,20
10		250	250	100	34,85±0,10
11	-SO ₄	2000	699,05±0,05	34,95±0,07	100
12		1000	699,67±0,06	69,77±0,10	100
13		750	699,77±0,12	93,29±0,33	100
14		500	500	100	71,55±0,05
15		250	250	100	35,75±0,02

Из табл. 1 видно, что в зависимости от исходной концентрации антигенов вируса ИНГТ степень сенсибилизации карбоксилированных полистирольных латексных частиц колебалась от $35,24 \pm 0,04$ % до 100 %, аминированных – от $34,85 \pm 0,10$ % до 100 %, латексных частиц с SO_4 -группами – от $35,75 \pm 0,02$ % до 100 %. При сенсибилизации полистирольных латексных частиц антигеном с концентрациями 500 и 250 мкг/мл на поверхности микросфер адсорбировался весь белок, однако возможно адсорбировать большое количество антигена, что подтверждали данные, полученные при использовании антигенов вируса с концентрациями 750, 1000 и 2000 мкг/мл. Максимальная степень сенсибилизации микросфер достигалась при исходной концентрации антигенов вируса ИНГТ 750 мкг/мл и более.

Анализируя данные таблицы 1, определяли максимальное количество антигена вируса ИНГТ, которое адсорбировано на поверхности полистирольных латексных частиц с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$) (табл. 2).

Таким образом, наибольшее количество антигенов вируса ИНГТ адсорбировалось на поверхности аминированных полистирольных частиц ($714,61 \pm 0,29$ мкг/мл), наименьшее – на поверхности частиц с группами $-\text{SO}_4$ ($699,81 \pm 0,52$ мкг/мл). Оптимальная концентрация антигенов вируса ИНГТ для сенсибилизации латексных препаратов с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$), проявляющих наибольшую аналитическую чувствительность, составляла 750 мкг/мл. Выявлена зависимость степени сенсибилизации латексных частиц с разными функциональными группами от концентрации антигенов вируса ИНГТ (рис. 2).

Таблица 2

Максимальное количество антигенов вируса ИНГТ, адсорбированного на поверхности латексных частиц с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$) ($n = 3$)

Функциональная группа полистирольных латексных частиц	Концентрация антигенов вируса ИНГТ, адсорбированного на поверхности частиц, мкг/мл	Максимальная концентрация вируса ИНГТ, адсорбированного на поверхности частиц, мкг/мл
$-\text{COOH}$	711,33	709,44±0,77
	708,67	
	708,33	
$-\text{NH}_2$	715,33	714,61±0,29
	714,33	
	714,17	
$-\text{SO}_4$	698,05	699,60±0,52
	699,67	
	699,77	

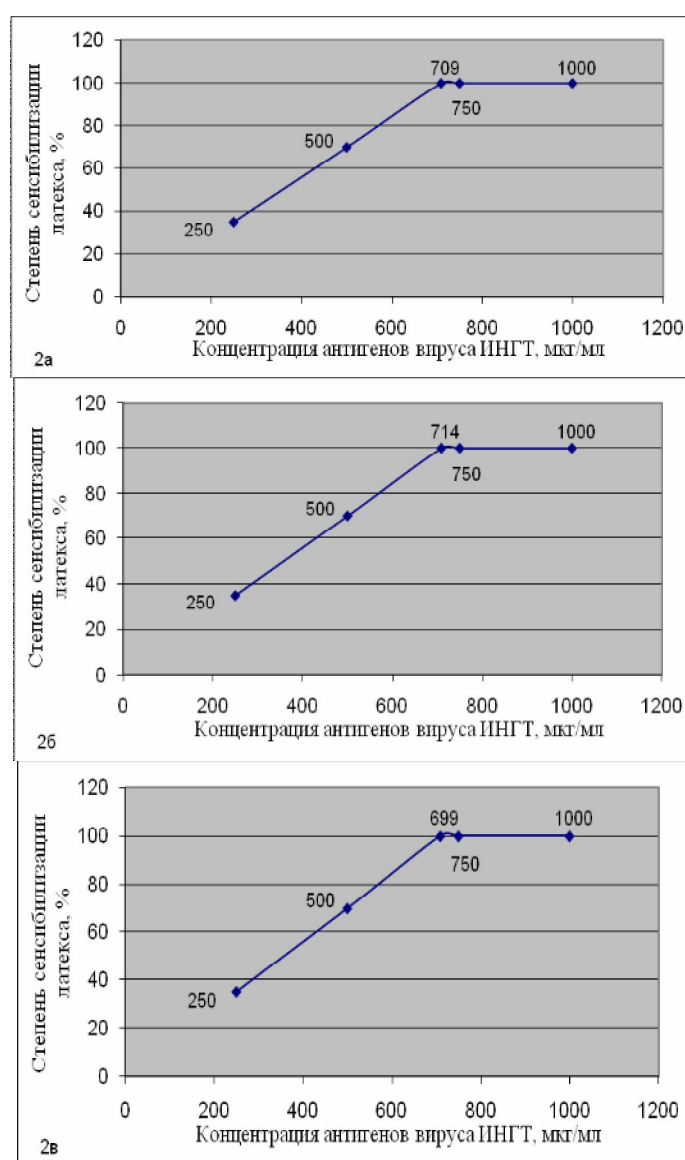


Рис. 2. Зависимость степени сенсibilизации латексных частиц от концентрации антигенов вируса ИНГТ до адсорбции: а) для латексных частиц с группами $-\text{COOH}$; б) для латексных частиц с группами $-\text{NH}_2$; в) для латексных с группами $-\text{SO}_4$

Определяли аналитическую чувствительность приготовленных латексных препаратов для более точной оценки их диагностических возможностей. Для этого готовили серию разведений сывороточных белков против антигенов вируса ИНГТ в ГСБР с диапазоном концентраций от 29 мг/мл до 230 мкг/мл. Латекс-агглютинационный анализ проводили в течение 10 минут при комнатной температуре, затем стекла с реагентами на 20 минут помещали во влажную камеру. Учет результатов проводили через 10–30 минут (табл. 3).

Таблица 3

Аналитическая чувствительность полистирольных латексных препаратов с разными функциональными группами (–COOH, –NH₂, –SO₄), сенсibilизированных вирусом ИНГТ с разными концентрациями (результаты выражены в крестах, одинаковы через 10 и 30 минут)

Характеристика полистирольного латексного препарата				Концентрация специфических поликлональных антител, мг/мл							
функциональная группа	<i>d</i> микросфер, нм	концентрация антигенов вируса ИНГТ для адсорбции, мкг/мл	титр инфекционной активности вируса ИНГТ, lg ТЦД ₅₀ /мл	29	14,5	7,2	3,6	1,8	0,9	0,45	0,23
–NH ₂	340	2000	6,95	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		1000	6,65	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		750	6,50	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	0	0	0
		250	6,05	2+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
–COOH	340	2000	6,95	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		1000	6,65	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		750	6,50	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	0	0	0
		250	6,05	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
–SO ₄	340	2000	6,95	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
		1000	6,65	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
		750	6,50	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
		250	6,05	2+	2+	2+	1+	0	0	0	0

Табл. 3 показывает, что визуальный предел обнаружения на 2 креста поликлональных антител, специфичных к антигенам вируса ИНГТ, при использовании аминированных латексных частиц, сенсibilизированных 750 мкг антигена/мл, составил 0,90 мг/мл, латексных микросфер с группами –COOH и –SO₄ с той же концентрацией вируса – 1,80 мг/мл при учете реакции через 10 минут. Аналогичные данные получены через 30 минут. Эксперименты показали, что для проведения РАЛ достаточно 10 минут.

Таким образом, наилучшие показатели аналитической чувствительности синтезированных латексных препаратов отмечали при иммобилизации микросфер антигенами вируса ИНГТ с концентрациями 2000, 1000 и 750 мкг/мл. Достаточной для сенсibilизации латексов являлась концентрация вируса ИНГТ 750 мкг/мл (714,61 ± 0,29 мкг/мл – для аминированных латексов; 709,44 ± 0,77 – для карбоксилированных латексов; 699,60 ± 0,52 мкг/мл – для частиц латекса с группами –SO₄). Следовательно, с экономической точки зрения использовать поликлональные антитела с концентрациями 1000 и 2000 мкг/мл для сенсibilизации латексов нецелесообразно. При повышении исходной концентрации антигенов степень их адсорбции и аналитическая чувствительность синтезированных латексных препаратов не изменялись (0,90 мг/мл антител – для аминированных латексов, 1,80 мг/мл антител – для латексных микросфер с –COOH и –SO₄ группами). При понижении исходной концентрации антигенов вируса ИНГТ значения аналитической чувствительности препаратов и степени ад-

сорбции значительно снижались. Таким образом, сенсibilизированные вирусом ИНГТ аминированные латексные частицы позволяли выявлять специфические антитела в сыворотках крови с концентрацией иммуноглобулинов более 0,90 мг/мл.

Для оценки диагностической чувствительности (S_e) и специфичности (S_p) разработанной тест-системы 20 сывороток крови от рыб больных ИНГТ и 20 – от здоровых параллельно исследовали в РАЛ и ИФА на выявление антител, нейтрализующих антигены данного вируса. Готовили разведения испытуемых сывороток в диапазоне 1:100–1:12800 в ГСБР. РАЛ проводили, как описано выше, применяя аминированный латексный препарат, сенсibilизированный вирусом ИНГТ с исходной концентрацией 750 мкг/мл, имеющий лучшие диагностические характеристики. Результаты учитывали визуально через 10 минут после постановки реакции. Положительными считались образцы, дающие агглютинацию на 2–4 креста, сомнительными – вызывающие агглютинацию на 1 крест, отрицательными – не вызывающие агглютинацию. Параллельно сыворотки тестировали в непрямом варианте ТФ ИФА. При анализе в ИФА концентрацию сывороточных антител определяли с помощью калибровочной кривой (по 3 измерениям) на многоканальном спектрофотометре (компьютерная программа Magellan for F50 V 7.0). Со всеми 20 сыворотками, не содержащими антитела к антигенам вируса ИНГТ, в РАЛ отмечалось отсутствие агглютинации ($b = 0$, $d = 20$). Таким образом, диагностическая специфичность латексного препарата, полученного на основе аминированного латекса с диаметром частиц 340 нм (ООО «Диафарм»), составила в РАЛ 100 %.

Таблица 4

Результаты исследования в РАЛ и ИФА сывороток, содержащих антитела, специфичные к антигенам вируса ИНГТ

№ сыворотки	Результаты исследования в ИФА			Результаты исследования в РАЛ		
	+/-	концентрация антител, специфичных к вирусу ИНГТ, мг/мл	титр антител, специфичных к вирусу ИНГТ, lg	титр антител, специфичных к вирусу ИНГТ, lg	количество крестов (через 10 и 30 минут одинаковое)	положительный/сомнительный/отрицательный
1	+	1,90	3,2	3,2	2	положительный
2	+	3,50	3,5	3,5	3	положительный
3	+	1,40	3,2	2,9	2	положительный
4	+	2,10	3,2	3,2	2–3	положительный
5	+	6,90	3,8	3,8	4	положительный
6	+	7,10	3,8	3,8	4	положительный
7	+	2,30	3,2	3,2	2–3	положительный
8	+	1,80	3,2	3,2	2	положительный
9	+	1,70	3,2	3,2	2	положительный
10	+	3,30	3,5	3,2	3	положительный
11	+	3,90	3,5	3,5	3	положительный
12	+	2,10	3,2	3,2	2–3	положительный
13	+	1,60	3,2	2,9	2	положительный
14	+	1,80	3,2	3,2	2	положительный
15	+	7,10	3,8	3,8	4	положительный
16	+	1,20	3,2	2,9	2	положительный
17	+	3,00	3,5	3,5	3	положительный
18	+	3,50	3,5	3,5	3	положительный
19	+	1,00	3,2	2,3	1	сомнительный
20	+	0,90	3,2	2,0	0	отрицательный

Результаты исследования в ИФА и РАЛ сывороток, содержащих антитела, которые нейтрализуют антигены вируса ИНГТ, представлены в табл. 4. Из 20 положительных в ИФА сывороток в РАЛ 18 были положительными, 1 – сомнительной и 1 – отрицательной ($a = 18$, $c = 2$). Диагностическая чувствительность аминированного латексного препарата составила в РАЛ 90 %, общая точность теста – 95 %. Расчеты проводили в соответствии с методикой оценки эффективности диагностических исследований, описанной выше [10]. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Мак-Нимара. Экспериментальное значение χ^2 составляло 13,13. Критическое значение χ^2 при $f=1$ и $p = 0,001$ было равно 10,8. В итоге выявлено, что экспериментальные значения критерия больше критического с вероятностью ошибки $p < 0,001$. Таким образом, с достоверностью более 99 % можно утверждать, что разработанная тест-система позволяет выявлять антитела к антигенам вируса ИНГТ.

Титры сывороток антител определяли в ИФА и РАЛ, исследуя 20 положительных сывороток в диапазоне разведений 1:100–1:12800. По сравнению с ИФА в РАЛ 14 образцов показали те же титры антител, в то время как у 6 сывороток (№ 3, 10, 13, 16, 19, 20) значения титров были ниже (рис. 3).

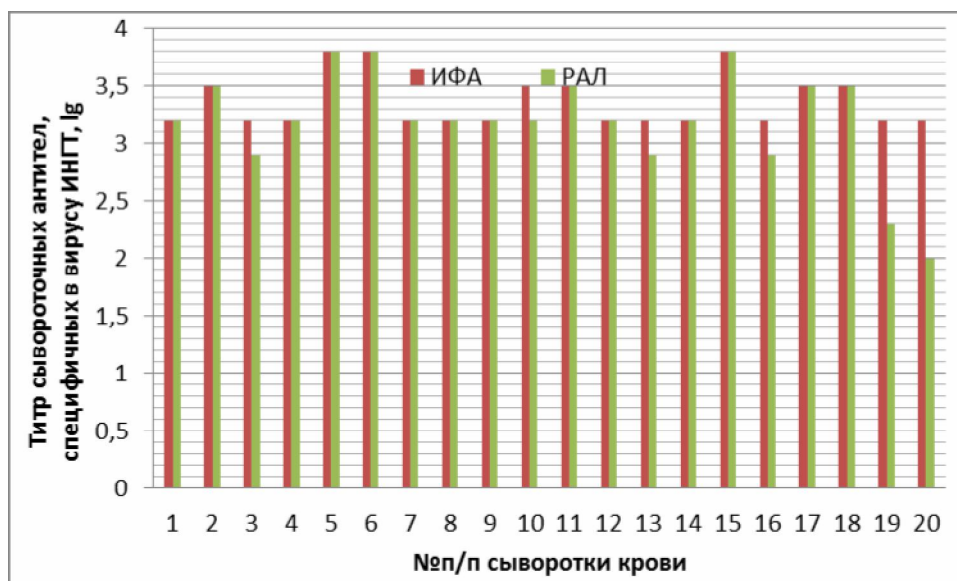


Рис. 3. Корреляция между результатами по определению титров сывороточных антител, специфичных к вирусу ИНГТ, в РАЛ и ИФА

На основании данных, полученных в РАЛ и ИФА (табл. 4), можно выделить 3 группы исследуемых сывороток по диагностическому критерию, позволяющему точно интерпретировать результаты РАЛ. Положительная группа – сыворотки, вызывающие агглютинацию на 2–4 креста и содержащие антитела, специфичные к вирусу ИНГТ, с концентрацией 0,90 мг/мл и более, что соответствует установленному пределу аналитической чувствительности полученных латексных тестов. Сомнительная группа – сыворотки, которые вызывают агглютинацию на 1 крест и содержат антитела к антигенам вируса ИНГТ, с концентрацией ниже 0,90 мг/мл и являющиеся положительными в ИФА. Отрицательная группа – сыворотки, не проявляющие агглютинацию, содержащие антитела с концентрацией ниже 0,90 мг/мл и отрицательные по результатам ИФА.

Латексные тесты с разными функциональными группами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_4$), сенсibilизированные антигенами вируса ИНГТ с концентрацией 750 мкг/мл, испытывали в РАЛ с неспецифичными антителами (к SVCV (ВБК) – вирусу весенней виiremии карпа, Rhabdovirus carpio, р. Vesiculovirus; к VHSV – вирусу геморрагической септицемии, Viral haemorrhagic septicaemia, р. Novirhabdovirus). РАЛ проводили как описано ранее, результаты учитывали визуально через 10–30 минут после постановки реакции (табл. 5).

Из табл. 5 видно отсутствие агглютинации при испытании синтезированных латексных препаратов, имеющих разные функциональные группы и выявляющих антитела против антигенов вируса ИНГТ, с неспецифичными сыворотками, что свидетельствовало о высокой степени специфичности теста по отношению к антителам, нейтрализующим вирус ИНГТ.

Таблица 5

**Результаты исследования сывороток, содержащих неспецифичные антитела,
с применением латексных препаратов, сенсibilизированных антигенами вируса ИНГТ
(результаты выражены в крестах, одинаковы через 10 и 30 минут)**

Функциональные группы латексных тестов для выявления антител против вируса ИНГТ	Результаты теста на спонтанную агглютинацию	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Неспецифичные антитела	
				против SVCV	против VHSV
-COOH	отрицательный	0	4+	0	0
-NH ₂	отрицательный	0	4+	0	0
-SO ₄	отрицательный	0	4+	0	0

Заключение

В результате проведенных исследований подобраны условия получения латексных препаратов для выявления сывороточных антител к антигенам вируса ИНГТ, разработаны критерии оценки результатов реакции агглютинации латекса для исследования сывороток, содержащих антитела к антигенам вируса ИНГТ лососевых.

Результаты, полученные с помощью полученных латексных препаратов, являются воспроизводимыми и специфичными при выявлении антител к антигенам вируса ИНГТ. Разработанный метод является простым, легко воспроизводимым и требует небольших затрат труда и времени. Его можно применять в качестве скринингового метода для выявления специфичных к вирусу ИНГТ антител, специфичных к антигенам вируса ИНГТ лососевых рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щелкунов И.С. Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб // Ветеринария. 2006. № 4. С. 22-25.
2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals. Paris, 2014. Vol. 1. P. 300-313.
3. Рудакова С.Л. Некроз гемопоэтической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции // Вопр. рыбол. 2003. Т. 4, № 1 (13). С. 93-102.
4. Jorgensen P.E.V., Olesen N.J., Lorenzen N., Winton J.R., Ristow S.S. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay // J. Aquat. Anim. Health. 1991. Vol. 3. P. 100-108.
5. Molina-Bolivar J.A., Galisteo-Gonzalez F. Latex Immunoagglutination Assays. J. of Macromolecular Science Part C-Polymer Reviews. 2005. Vol. 45. P. 59-98.
6. Serra J., Javier Gella F., Gener J. Latex agglutination procedures in immunodiagnosis. Pure & Appl. Chem. 1991. Vol. 63, N 8. P. 1131-1134.
7. Назаров Н.А., Рыбаков С.С., Метлин А.Е. Латекс-агглютинационный тест для диагностики бешенства животных // Ветеринария. 2013. № 6. С. 56-61.
8. Доронин М.И., Пыльнов В.А., Рыбаков С.С., Назаров Н.А. Метод латекс-агглютинации для выявления антигенов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых // Ветеринария. 2014. № 9. С. 56-61.
9. Gaudin Y., Ruigrok R.W., Brunner J. Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism // J. Gen. Virol. 1995. Vol. 76. P. 1541-1556.
10. Сошникова Л.А., Тамашевич В.Н. Многомерный статистический анализ. М.: Юнита-Дана, 1999. С. 350.

Поступила в редакцию 27.01.15

M.I. Doronin, V.A. Pylnov, S.S. Rybakov

METHOD OF LATEX AGGLOUTINATION FOR DETECTING ANTIBODIES TO INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS IN SALMON FISHES

Methods of preparation and control of latex-agglutination tests to detect specific antibodies to infectious hematopoietic necrosis virus in salmon fishes have been developed. The sensitization level of latex particles has been determined. The analytical sensitivity of latex preparations was estimated as 90 µg/ml. When analyzing 40 serums of blood of fishes in

latex agglutination test, the sensitivity was 90 % and 100 % correspondingly. This method is simple and quick-to-perform; it can be used as screening method to determine serum antibodies specific to infectious hematopoietic necrosis virus in salmon fishes. Conditions of synthesizing latex preparations which allow to detect antibodies to infectious hematopoietic necrosis virus in salmon fishes have been selected; criteria of evaluating latex-agglutination test results have been formulated.

Keywords: infectious hematopoietic necrosis of salmon fishes, latex-agglutination test, antibodies, analytical sensitivity, diagnostic sensitivity, diagnostic specificity.

Доронин Максим Игоревич, аспирант
E-mail: maks_doronin_2015@mail.ru

Пыльнов Владимир Александрович,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
E-mail: pylnov@arriah.ru

Рыбаков Сергей Сергеевич,
доктор биологических наук, профессор
E-mail: rybakov@arriah.ru

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец

Doronin M.I., postgraduate student
E-mail: maks_doronin_2015@mail.ru

Pylnov V.A.,
Candidate of Biology, Senior researcher
E-mail: pylnov@arriah.ru

Rybakov S.S.,
Doctor of Biology, Professor
E-mail: rybakov@arriah.ru

Federal Centre for Animal Health
Yurievets neighborhood, Vladimir, Russia, 600901