

РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОДИАГНОСТИКУМА К ВИРУСУ АЛЕУТСКОЙ БОЛЕЗНИ НОРОК

Надежда Николаевна Какарека, к.б.н., ведущий научный сотрудник, kakareka@biosoil.ru

Юрий Георгиевич Волков, к.б.н., старший научный сотрудник, volkov@biosoil.ru

Михаил Юрьевич Щелканов, д.б.н., заведующий лабораторией, adorob@biosoil.ru

ФГУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии»
ДВО РАН (Владивосток, Россия)

В звероводческом хозяйстве «Валентиновский» Приморского края выявили вирус алеутской болезни норок (ВАБН). Была разработана новая методика получения антигена ВАБН и антисыворотки с титром 1:16384 в ИФА. На ее основе создали иммунодиагностикум для тест-систем ВАБН в различном биологическом материале, в том числе в моче, слюне и фекалиях, что ранее было невозможно. Установили, что в Приморском крае циркулирует штамм ADV-P-1 этого вируса. **Ключевые слова:** алеутская болезнь норок, вирус, иммунодиагностикум, антисыворотка.

Development and obtaining of immunodiagnosticum to the Aleutian disease mink virus

N.N. Kakareka, PhD in Biology, Leading researcher, kakareka@biosoil.ru

Yu.G. Volkov, PhD in Biology, Older researcher, volkov@biosoil.ru

M.Yu. Shchelkanov, PhD in Biology, Head of laboratory, adorob@biosoil.ru

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS (Vladivostok, Russian Federation)

The virus of Aleutian mink disease (AMDV) in the fur farm "Valentinovsky" of Primorsky Krai was detected. A new technique for the preparation of an antigen of AMDV was developed. Antiserum against AMDV with a titer of 1:16384 in ELISA was obtained. Based on this antiserum an immunodiagnosticum was created for the AMDV test systems in various biological materials, included urine, saliva, feces, which was previously impossible. Was established that ADV-P-1 strain circulates in the Primorsky Krai. **Key words:** Aleutian mink disease, virus, immunodiagnosticum, antiserum.

DOI:10.30896/0042-4846.2021.24.3.24-28

Сообщение об алеутской болезни норок (АБН) впервые появилось в 1956 г. в Северной Америке. Подопытные норки алеутской мутации погибали сразу после выведения. Гибель зверей регистрировали также в некоторых странах Скандинавии. В 1965 – 1967 гг. болезнь широко циркулировала на территории бывшего СССР. С каждым годом увеличивалась численность выращиваемых норок, что послужило распространению опасной вирусной инфекции в другие страны и на другие виды животных.

Алеутская болезнь норок (*Morbis Aleutica lutreolarum*, плазмозитоз) – очень контагиозная, медленно протекающая инфекция. В естественных условиях болеют только норки, независимо от пола и возраста. Вирус может персистировать в организме лисиц, песцов, соболей, хорьков, собак, кошек, не вызывая заболевания [1, 2]. Недавно Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) [11] после открытия нескольких новых парвовирусов, схожих генетическими и вирусологическими характеристиками с вирусом алеутской болезни норок (ВАБН), в семействе

Parvoviridae и подсемействе *Parvovirinae* был выделен род *Amdoparvovirus*. Между 2011 г. и 2014 г. в дополнение к ВАБН (*Carnivore amdoparvovirus 1*), чьи первичные хозяева были из семейства кунных (*Mustelidae*), в этот род включили вирусы, обнаруженные у представителей семейства псовые *Caninae* [7, 8]. Это амдопарвовирус серебристой лисицы (*Carnivore amdoparvovirus 2*), предполагаемый амдопарвовирус енотовидной собаки (*Carnivore amdoparvovirus 3*) или лишайный амдопарвовирус, амдопарвовирус хищников или фекальный амдопарвовирус красной лисицы [8, 10].

Амдопарвовирусы – небольшие одноцепочечные ДНК-вирусы с геномом ~ 4,8 kb, который содержит две основные открытые рамки считывания (ORF). Одна из них кодирует три неструктурных белка (NS1, NS2 и NS3), а другая – два структурных белка (VP1 и VP2), характеризующиеся различной эволюционной динамикой [7]. Штаммы ВАБН представляют угрозу для популяций диких животных, так как побег норок может привести к распространению возбудителя на новых территориях и соответственно

среди других видов животных [12, 13]. Кроме того, у инфицированных особей не всегда развиваются клинические признаки, что также играет роль в распространении вируса в дикой природе и на фермах в качестве резервуаров-хозяев. Таким образом, источником возбудителя инфекции являются больные норки и латентные вирусоносители. ВАБН выделяется во внешнюю среду со слюной, фекалиями и мочой, инфицируя предметы ухода, корма, спецодежду и воду. Разносчиками инфекции могут быть мухи, кровососущие насекомые и птицы. Заражение происходит алиментарным и воздушно-капельным путем, при укусах, через поврежденные слизистые оболочки и кожу, а также внутриутробно и при спаривании [6].

Профилактика алеутской болезни норок базируется на недопущении заноса вируса на территорию хозяйства. У поголовья постоянно берут кровь на анализ, чтобы вовремя обнаружить зараженных животных и заменить их здоровыми особями. Во внутренних органах, в сыворотке крови и мозге больной норки вирус находится всю жизнь. Йодную реакцию по Меллони при тестировании ВАБН проводят с сывороткой крови, но с ее помощью нельзя обнаружить вирус в других биологических жидкостях. Иммунодиагностика этого патогена сильно затруднена, поскольку вирионы связаны в иммунном комплексе и агрегированы с железосодержащим белком – ферритином. Это обстоятельство также усложняет выделение и очистку вируса [9]. Поэтому цель наших исследований – разработка новых способов очистки ВАБН и его диагностики. Предварительно сравнили ряд штаммов ВАБН для выявления изолята с универсальным набором антигенных детерминант. Затем разработали новый высокочувствительный и универсальный иммунодиагностический метод для иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий диагностировать большинство штаммов ВАБН.

Материалы и методы. В эксперименте использовали внутренние органы от

спонтанно инфицированных ВАБН норок приморской популяции, из звероводческого хозяйства «Валентиновский» Приморского края и вирусный штамм АБН из Подмоскovie. Образцы для электронной микроскопии готовили по методу разбавленной суспензии из очищенных препаратов ВАБН. Просматривали их на электронном просвечивающем микроскопе Libra 200 (Германия).

Иммунохимическое родство вирусов, титр антисывороток определяли непрямой метод ИФА, реакцией двойной диффузии и иммуноэлектрофорезом [5]. Антивидовой конъюгат получали по методу Nakane, Kawoi [14].

Результаты исследований и обсуждение. Отработали новый метод получения очищенного препарата ВАБН. Он заключается в гомогенизации 50 г органов инфицированных АБН норок (селезёнка, печень, почки) в буферной системе (50 мМ трис-НСl; 0,15 М NaCl; pH 7,2), содержащей детергенты (1 % тритона X-100; 0,4 мМ фенилметилсульфонилфторида; 1 % дезоксихолата натрия, Sigma США) в соотношении 1/3 – 1/5 от объема (в ступке с добавлением кварцевого песка и далее в гомогенизаторе) с последующим его трехкратным замораживанием/размораживанием. Дезинтеграцию клеточного гомогената проводили трехкратной ультразвуковой обработкой при частоте 22 кГц/с (по 20 с с интервалом в несколько секунд). Осаждение неразрушенных клеток двукратным низкоскоростным центрифугированием – осветление гомогената (по 6000 – 8000 об/мин в течение 20 мин).

Осаждение иммунных комплексов (ИК) осуществляли 10 % полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) или 25 % сульфатом аммония в течение 4 ч или ночи. Уплотнение осадка низкоскоростным центрифугированием (30 мин при 12000 об/мин). Извлечение ИК из осадка путем трехкратной экстракции на холоде в течение 1 – 2 ч с последующим низкоскоростным центрифугированием в режиме 12000 об/мин по 20 минут минимальными количествами

(1/10 от первоначального объема) ТНЭ буфера (10 мМ трис-НСI; 0,1 М NaCl; 1 мМ ЭДТА-Na; 0,05 % NP-40, рН 7,4, Sigma США).

Затем вновь 2,5 часа осаждали ИК с помощью высокоскоростного центрифугирования из объединенных экстрактов при 30000 об/мин. Извлекали ИК из осадка 1 – 2 ч трехкратным экстрагированием на холоде с последующим низкоскоростным центрифугированием при 12000 об/мин по 20 минут и минимальным количеством ТНЭ буфера. Диссоциацию ИК осуществляли 1 ч на холоде в кислой среде (рН 2,4) HCl-глицинового буфера в соотношении объемов 1 экстракта на 2 буфера.

ВАБН конъюгированный с ферритином (ВАБН-Ф) отделяли от антител высокоскоростным ультрацентрифугированием (2,5 ч при 30000 об/мин). Осадок растворяли в минимальном количестве (не более 2 мл) карбонатного буфера рН 9,6. Ферритин отделяли от вирусных частиц на колонке с сефарозой 6В в системе карбонатного буфера. Для более качественной очистки хроматографию проводили дважды. Наилучшие результаты получили при следующих условиях: колонка с сефарозой 1,9х25 см; комнатная температура; препарат в карбонатном буфере (рН 9,5); загрузка 1,25 мл; скорость 3 мл/5 мин. Контроль осуществляли спектрофотометрией в диапазоне волн 220 – 310. Ориентировочную концентрацию вируса вычисляли по формуле Калькара:

$$K = 1,45 \times E_{285} - 0,74 \times E_{260'}$$

где К – концентрация вируса, E_{285} – оптическое поглощение при длине волны 285 нм, E_{260} – оптическое поглощение при длине волны 260 нм.

Вирус выходил из колонки в 9 – 12 фракциях. Гомогенность препаратов контролировали электрофорезом в градиентном (12 – 25 %) полиакриламидном геле в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия.

Получили три серии препаратов антигенов ВАБН с высокой степенью очистки

от сопутствующих клеточных дериватов. Общее количество антигена в первой партии органов зараженных норок составляло 6,58 мг/100 г ткани, во второй – 13,0 мг/100 г и в третьей – 9,8 мг/100 г.

Очищенные препараты использовали для наработки антител к ВАБН. Для этого кроликов иммунизировали по следующей схеме: первый раз – 200 мкг антигена + полный адъювант Фрейнда (США) подкожно в 9 – 12 точек; второй – спустя 7 дней 200 мкг антигена + полный адъювант Фрейнда (США) внутримышечно и подкожно в 6 – 8 точек; третий – через 7 дней 300 мкг антигена + полный адъювант Фрейнда (США) внутримышечно и подкожно в 6 – 8 точек; четвертый – спустя 14 дней 200 мкг антигена + полный адъювант Фрейнда (США) внутримышечно и подкожно в 6 – 8 точек; пятый – через 7 дней 200 мкг антигена внутривенно. Титр антител в ИФА составил 1:16384. Антивидовой конъюгат для непрямого варианта ИФА обладал рабочим титром 1:1000.

Очищенные вирусные препараты ВАБН отличались следующими характеристиками:

- по данным их электронно-микроскопического анализа циркулирующий в Приморском крае штамм ВАБН имеет сферическую форму вирионов, размером 22 – 23 нм, что сближает его со штаммом ADV-П-1 ВАБН;

- спектрофотометрический анализ фракций препаратов вирусосодержащей суспензии при элюции через колонку с сефарозой 6В свидетельствовал об эффективном разделении вирусных частиц и ферритина; позволял регистрировать и по максимуму поглощения при 260 нм отобрать специфические вирусосодержащие фракции с концентрацией 1,6 – 1,66 мг/мл (первая экспериментальная партия) и 3,0 – 3,05 мг/мл (вторая и третья);

- спектры поглощения ультрафиолетового света препаратами штамма ВАБН в области длин волн от 220 до 320 нм имели вид, типичный для очищенных препаратов ДНК-содержащих вирусов сферической формы с локальным максимумом

спектров оптической плотности при длине волн, соответствующей 260 нм и минимумом – в области 250 нм. Соотношение E_{260}/E_{250} составляет 1,1 – 1,05, что характерно для препаратов сферических вирусных частиц, а соотношение E_{260}/E_{280} соответствующее 2,5, характеризует высокую степень их очистки;

– гомогенность препаратов контролировали электрофорезом в градиентном (12 – 25 %) полиакриламидном геле в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия. Степень очистки полученных препаратов от сопутствующих белков и их соответствие ВАБН подтверждалось наличием на электрофореграммах мигрирующих белковых полос, молекулярная масса которых характерна для основных полипептидов ВАБН (75 и 62,5 кДа). В исследованных препаратах штамма ВАБН обнаружили также полипептиды с молекулярными массами 21,7 и 16,1 кДа, что характерно для ВАБН.

Специфичность идентифицированных в полиакриламидном геле полипептидов из препаратов циркулирующего штамма и соответствие их структурным полипептидам ВАБН подтвердили в ракетном иммуноэлектрофорезе, иммуноэлектроосмофорезе и радиальной двойной диффузии, с использованием антител из сыворотки крови норок от зараженных и здоровых животных (коммерческая тест-система ОАО «Ветзвероцентр, Москва») [4].

Полученные партии антисыворотки к ВАБН характеризовались высоким содержанием антител, титр которых составлял 1:16384.

Иммунодиагностикум к ВАБН позволяет определять 2 штамма этого вируса, которые циркулируют на территории Российской Федерации.

При определенном разведении ферритин вместе с тритоном отмываются и не мешают определению вируса, а чувствительность метода повышается.

Таким образом, для борьбы с алеутской болезнью норок был разработан иммунодиагностикум к ВАБН, состоящий из препаратов высокоочищенного антиге-

на ВАБН и антисывороток с титром от 1:16384, а также контрольных сывороток крови здоровых норок.

Препараты высокоочищенного антигена ВАБН и пробной партии сывороток испытывали в иммунохимических тестах при выбраковке больных животных в зверосовхозе «Валентиновский» Приморского края (в настоящее время не функционирует). Результаты ИФА показали, что полученные составляющие (антиген и антисыворотка к ВАБН) можно использовать в качестве основы для диагностических тест-систем при идентификации ВАБН. Анализ предварительных данных указывает, что в Приморском крае циркулировал штамм ADV-П-1 («пушкинский») вируса алеутской болезни норок, интродуцированный, по всей вероятности, из западного региона России [3].

На способ определения ВАБН был получен патент.

Заключение. Разработанный нами иммунодиагностикум можно использовать для быстрого и качественного выявления вируса алеутской болезни норок не только в крови, но и в других биологических материалах (слюна, моча, фекалии). Это дает возможность предотвратить распространение алеутской болезни норок. При выявлении возбудителя можно быстро провести выбраковку из стада больных норок и вирусоносителей, ветеринарно-санитарные мероприятия, убой зараженных животных, уничтожение трупов, общую дезинфекцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Е.Г. Алеутская болезнь и продуктивность норок. Биология и патология пушных зверей. Петрозаводск, 1974; 202 – 204.
2. Дукур И.И., Слугин В.С., Чижов В.А., Акулов В.П. Алеутская болезнь норок. Болезни пушных зверей. Под ред. Е.П. Данилова. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Колос, 1984; 78 – 87.
3. Мартыненко М.В. Иммунохимические молекулярно-генетические свойства вируса алеутской болезни (Aleutian disease virus), циркулирующего на юге Приморского края, и разработка методов его диагностики: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2006; 19 с.
4. Наставление по применению набора антигена и контрольных сывороток в реакции

иммуноэлектроосмофореза для серологической диагностики алеутской болезни норок. Ветеринария. 1978; 2:114 – 116.

5. Практикум по иммунологии (ред. Кондратьева И.А., Самуилов В.Д.). М.: Изд-во МГУ, 2001; 224 с.

6. Слугин В.С. Алеутская болезнь норок. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных. Под ред. А.А. Конопаткина. М.: Колос, 1984; 506 – 510.

7. Canuti M., O'Leary K.E., Hunter B.D. et al. Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intensive farming. *Virus Evol.* 2016; 2:004.

8. Canuti M., Whitney H., Lang A.S. Amdoparvoviruses in small mammals: expanding our understanding of parvovirus diversity, distribution and pathology. *Front Microbiol.* 2015; 6:111.

9. Cho H.J., Ingram D.G. Antigen and antibody

in Aleutian Disease in Mink. *Canadian Journal of comparative medicine.* 1973; 37(3):217 – 223.

10. Cotmore S.F., Agbandje-McKenna M., Chiorini J.A. et al. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* 2013; 159:1239 – 1247.

11. ICTVdb: The Universal Virus Database of the International Committee of Viruses 2015. Available at www.ictvonline.org.

12. Farid A.H. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Vet. Scand.* 2013; 55:10.

13. Knuutila A., Aaltonen K., Virtala A-M.K. et al. Aleutian mink disease virus in free-ranging mustelids in Finland – a cross-sectional epidemiologic and phylogenetic study. *J. Gen. Virol.* 2015; 96:1423 – 1435.

14. Nakane P.K., Kawoi A. Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Citochem.* 1974; 22:1084 – 1091.

УДК 619:579.86

ВЛИЯНИЕ ШТАММА *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ICIS 96 НА ФОРМИРОВАНИЕ ОРГАНОВ ИММУНОГЕНЕЗА И ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Елена Евгеньевна Кочкина, аспирант, alena-200838@mail.ru

Ирина Владимировна Савина, к.в.н., доцент, ira.savina2014@yandex.ru

Рахима Мукташевна Нурғалиева, к.в.н., доцент, nurgalieva_rahima@mail.ru

Вероника Викторовна Дымова, к.б.н., старший преподаватель, nika.kuranova@yandex.ru

Мария Викторовна Сычёва, д.б.н., заведующий кафедрой, sycheva_maria@mail.ru

ФГБОУ ВО Оренбургский государственный аграрный университет

Игорь Витальевич Чекуров, к.б.н., ассистент, chekurov.igr@rambler.ru

ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России

На цыплятах-бройлерах изучено влияние биотехнологически ценной культуры *Enterococcus faecium* ICIS 96 на формирование органов иммуногенеза и отдельные показатели адаптивного иммунитета. Доказано, что данный штамм энтерококка при введении в рацион сельскохозяйственной птицы способствует ускоренному завершению постинкубационного морфогенеза центральных и периферических органов иммунной системы, а также повышает титр антител после вакцинации против ньюкаслской болезни. **Ключевые слова:** *Enterococcus faecium*, цыплята-бройлеры, органы иммуногенеза, адаптивный иммунитет, ньюкаслская болезнь.

Influence of *Enterococcus faecium* ICIS 96 strain on organ formation immunogenesis and individual indicators of adaptive immunity of broiler chickens

E.E. Kochkina, Graduate student

I.V. Savina, PhD in Veterinary Science, Assistant professor

R.M. Nurgalieva, PhD in Veterinary Science, Assistant professor

V.V. Dymova, PhD in Biology, Senior lecturer

M.V. Sycheva, PhD in Biology, Head of department

Orenburg State Agrarian University

I.V. Chekurov, PhD in Biology, Assistant

Orenburg State Medical University

In the work on broiler chickens, the influence of the biologically valuable *Enterococcus faecium* ICIS 96 culture on the formation of immunogenesis organs and individual indicators of adaptive immunity was studied. It was shown that the introduction of *Enterococcus* strain into the diet of poultry contributes to the accelerated completion of post-incubation morphogenesis of the central and peripheral organs of the immune system, as well as significantly increases the antibody titer after vaccination against newcastle disease. **Key words:** *Enterococcus faecium*, broiler chickens, immunogenesis organs, adaptive immunity, newcastle disease.

DOI:10.30896/0042-4846.2021.24.3.28-33

В современном промышленном птицеводстве большинство болезней возникает как следствие нарушения им-

мунореактивности организма птицы, развивающегося на фоне негативного воздействия на иммунную систему имму-