

**НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ****И.Б. ПРОКАЕВА<sup>1</sup>, Б.В. НОВИКОВ<sup>2</sup>**

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра (возбудитель — SbSHV) поражает промышленные популяции и наиболее тяжело протекает в условиях индустриального осетроводства. Существенный недостаток общепринятого метода специфической диагностики возбудителя заключается в том, что SbSHV активно репродуцируется *in vivo* при температуре воды в диапазоне 10–18 °С. Поэтому такой способ выделения вируса может быть применен в основном весной и иногда осенью. В другое время года содержание вируса в тканях рыб снижается настолько, что выявить его становится практически невозможно. Нами разработан метод ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра с применением непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Представлены данные по получению необходимых реагентов для постановки твердофазного иммуноферментного анализа (накопление вируса в культуре клеток, выделение IgM-подобного иммуноглобулина из осетровых гипериммунных антисывороток и т.д.). Выполнено сравнение эффективности предложенного метода и реакции нейтрализации. Показано, что метод позволяет выявлять антитела как у сибирского осетра, так и у близкородственных видов осетровых рыб или их гибридов.

**Ключевые слова:** герпесвирус сибирского осетра, иммуноглобулин, твердофазный иммуноферментный анализ, ТФ ИФА, серодиагностика.

**Keywords:** herpesvirus of the Siberian sturgeon, immunoglobulin, ELISA, serodiagnostics.

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра характеризуется высокой контагиозностью, острым течением и массовой гибелью разновозрастной молодежи у *Acipenser baeri* с признаками некрогеморрагического синдрома. Болезнь поражает промышленные популяции осетра и наиболее тяжело протекает в условиях индустриального осетроводства. Впервые она была диагностирована в России в 2006 году. Имеющиеся данные указывают на ее широкое распространение в отечественных осетровых рыбоводных хозяйствах (1, 2). Вирус был выделен нами также в Казахстане и Финляндии. Схожая болезнь отмечена у *Acipenser transmontanus* в Северной Америке и Западной Европе (3). Возбудитель — ДНК-содержащий вирус семейства *Alloherpesviridae*, обнаружен также у бестера, русского и русско-ленского осетра (1, 2). К экспериментальному заражению этим вирусом восприимчивы также стерлядь и гибрид стерлядь × белуга × стерлядь (СБС).

Для борьбы с болезнью важное значение имеет наличие методов ее специфической диагностики. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных, при разработке приемов диагностики заразной болезни предпочтение должно отдаваться прямым методам, направленным на выявление возбудителя заболевания или его компонентов. В настоящее время имеется только один такой способ диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра — классическое выделение вируса в культуре клеток с последующей идентификацией в реакции нейтрализации (РН). Ведется также разработка ПЦР-методов выявления генома вируса герпесвирусной болезни сибирского осетра (SbSHV) (4).

Однако существенный недостаток общепринятого метода заключается в том, что SbSHV активно репродуцируется *in vivo* при температуре воды в диапазоне 10–18 °С. Поэтому такой способ вирусыведения может быть применен в основном весной и иногда осенью. В другое время года содержание вируса в тканях рыб снижается настолько, что выявить его

становится практически невозможно.

В то же время при летних температурах воды (выше 20 °С) в крови переболевших рыб активно вырабатываются противовирусные антитела, которые можно выявить в РН на протяжении не менее 7 (стерлядь)-13 (сибирский осетр) месяцев. Этот факт предполагает целесообразным использование непрямых методов ретроспективной диагностики болезни, основанных на обнаружении противогерпетических антител. Такие методы можно было бы применять на протяжении всего летнего сезона и даже более продолжительное время, что значительно расширило бы временные рамки диагностических исследований и стало бы особенно актуальным при проведении серозэпизоотологического мониторинга рыбоводных хозяйств.

К классическим методам детектирования противовирусных антител относится реакция нейтрализации, однако она трудоемка в исполнении. Более перспективна разработка инструментальных методов, например твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА).

Целью настоящего исследования стала разработка метода ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра на основе непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа.

*Методика.* Для накопления вируса и постановки реакции нейтрализации использовали перевиваемую линию клеток SSO-2 пула печени, почки и селезенки (5). Клетки культивировали при 19 °С в питательной среде 199 с 10 % фетальной сыворотки крови плода коровы (СПК). Для гипериммунизации двугодовиков сибирского осетра с целью получения специфической сыворотки использовали вирус, накопленный в перевиваемой культуре клеток WSSK-1 (6). Клетки культивировали при 21,5 °С в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (2×MEM) с 10 % СПК.

В работе использовали штамм SK1/0406 вируса SbSHV. Для накопления вируса суточную культуру клеток SSO-2 инокулировали вирусом с множественностью заражения около 0,03-0,10 ТЦД<sub>50</sub>/кл. при предварительной смене ростовой среды на поддерживающую с содержанием 2 % СПК и последующей инкубации при 15 °С до наступления 100 % цитопатогенного действия (ЦПД).

Для получения специфических антисывороток к вирусу SbSHV проводили гипериммунизацию переболевших после экспериментального заражения двугодовиков сибирского осетра при периодических внутрибрюшинных введениях вируса в дозах 10<sup>5,63</sup>-10<sup>6,63</sup> ТЦД<sub>50</sub> на особь. Кровь отбирали с интервалом 2 мес и подвергали обработке общепринятым методом. Сыворотки крови осетровых рыб, выживших после экспериментального заражения вирусом, получали следующим образом. Сеголетков стерляди и СБС заражали SbSHV методом ванн (рыбу помещали в воду, содержащую вирус в дозе 10<sup>5,60</sup>-10<sup>6,04</sup> ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, на 1 ч) с последующим содержанием в проточных аквариумах при температуре воды 14-16 °С и кормлении комбикормом АК-2ФП. После завершения заболевания у выживших особей отбирали пробы крови для получения сыворотки.

При выделении IgM-подобного иммуноглобулина из осетровых гипериммунных антисывороток к герпесвирусу сибирского осетра последовательно проводили осаждение липопротеинов (7), осаждение иммуноглобулинов раствором сульфата аммония при 50 % насыщения, разделение иммуноглобулинов гель-фильтрацией (8) на Ultrogel AcA34 («IBF», Франция) и окончательную очистку IgM-подобного иммуноглобулина осетра ионообменной хроматографией (9) на DEAE-Sephrose CL-6B («Sigma-Aldrich», США). Для сбора фракций и регистрации выхода белка с колонок

использовали комплект хроматографического оборудования FPLC («Pharmacia-LKB», Швеция). Подготовку сорбентов проводили согласно рекомендациям фирм-изготовителей. Белковый состав получаемых фракций сывороточных белков контролировали методом иммуноэлектрофореза по Фриемлю (10). Концентрацию белка в препаратах определяли по Лоури (11).

Реакцию нейтрализации (РН) герпесвируса сибирского осетра использовали для определения вируснейтрализующей активности антител во фракциях выделенного иммуноглобулина, гипериммунных и полевых сыворотках, а также в сыворотках крови рыб, перенесших экспериментальное заражение. РН ставили в 96-луночных планшетах («SPL», Корея) с рабочей дозой вируса 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка согласно принятой схеме (12).

Кроличий антивидовой IgG получали после иммунизации животных очищенным иммуноглобулином сибирского осетра. IgG из гипериммунных сывороток выделяли гель-фильтрацией (8) на колонке, заполненной Ultrogel AcA34. Конъюгирование IgG кролика с пероксидазой хрена проводили модифицированным методом периодатного окисления (13).

Титры антивидовых антител в кроличьих сыворотках и антигенное родство иммуноглобулинов разных видов и гибридов осетровых рыб определяли иммунодиффузией (реакция диффузионной преципитации — РДП) по Оухтерлони. При выполнении ТФ ИФА (непрямой вариант) 96-луночный планшет для ИФА сенсibilизировали очищенным и концентрированным вирусным антигеном в рабочем разведении в растворе карбонатно-бикарбонатного буфера (0,05 М, рН 9,5). Для блокирования остаточных сайтов неспецифического связывания иммуноглобулинов использовали 0,5 % раствор казеина в Трис-НСl буфере (рН 7,6). Разведения испытуемых анти-SbSHV-специфических и контрольных сывороток готовили на ЗФР-Tween 20 (рН 7,2-7,4). Конъюгат антивидовых антител с пероксидазой хрена разводили в 0,5 % растворе казеина в Трис-НСl буфере (рН 7,6). В качестве субстрата использовали 0,04 М раствор азинобистийосульфоновой кислоты (0,2 мг/см<sup>3</sup>) (АБТС) с 0,0001 % раствором перекиси водорода. Значения оптической плотности измеряли на планшетном фотометре Sunrise («Tecan», Австрия) при  $\lambda = 405$  нм. Пробу считали положительной, если оптическая плотность субстратного раствора в лунке с пробой в 2,1 раза и более превосходила оптическую плотность субстратного раствора в лунке с отрицательным контролем.

*Результаты.* Получение осетровых специфических антисывороток к герпесвирусу сибирского осетра. В нормальных сыворотках крови рыб, отобранных перед заражением, вируснейтрализующих антител обнаружено не было (порог детектирования 1:8), тогда как в сыворотке крови рыб, переболевших после экспериментального заражения, антитела выявлялись в достаточно высоких титрах. Через 114 сут с момента заражения они колебались в пределах 1:600-1:3000. Однократная реиммунизация (через 114 сут после заражения) повысила уровень антител у 3 из 5 особей. Вторая и третья реиммунизации, проведенные аналогично первой через год от начала эксперимента, привели к более быстрому (через 40 и 32 сут) увеличению титров антител в сыворотке крови одной из рыб до максимальных значений, полученных после первой реиммунизации, то есть более чем в 3 раза.

Таким образом, были получены пять гипериммунных сывороток осетра с титрами в РН от 1:600 до 1:8600. Эти антисыворотки использовали для выделения иммуноглобулина сибирского осетра и как заведомо положительные при разработке варианта ТФ ИФА.

Получение вирусного антигена для сенсibilизации

планшетов. Получая вирусосодержащий материал при инфицировании культуры клеток SSO-2 герпесвирусом сибирского осетра, очистку и концентрирование вирусного антигена проводили по указанной ниже схеме (рис. 1). Контрольный антиген из неинфицированной культуры клеток готовили аналогично. В результате был получен специфический очищенный и концентрированный антиген герпесвируса сибирского осетра с титром инфекционной активности в РН  $10^{7,35}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Этот антиген использовали для сенсibilизации планшетов при ТФ ИФА.

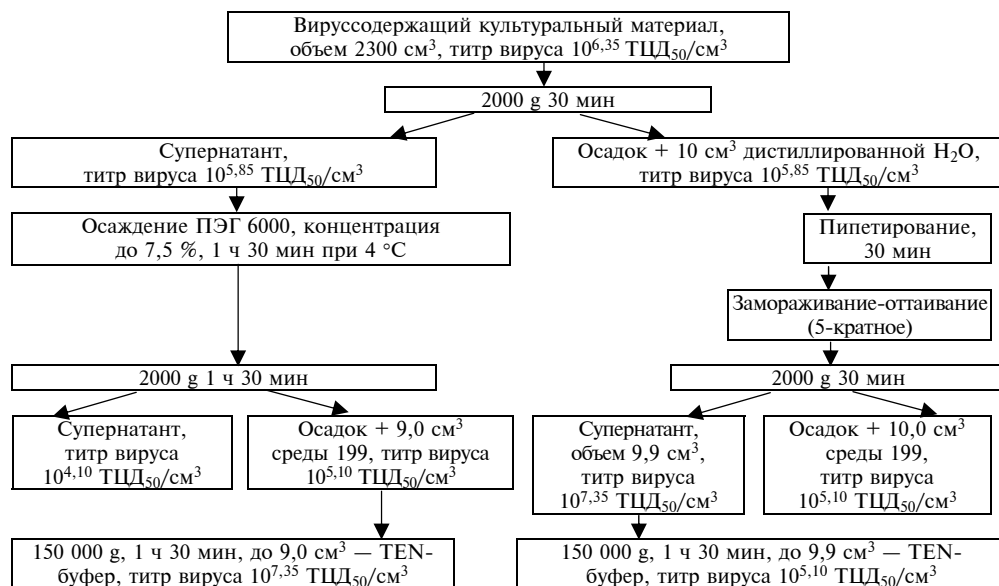


Рис. 1. Схема приготовления антигена герпесвируса сибирского осетра для сенсibilизации планшетов (твердофазный иммуноферментный анализ).

Получение IgM-подобного иммуноглобулина сибирского осетра и кроличьих антител к нему. Комплекс вышеизложенных методов и приемов позволил выделить иммунохимически чистый иммуноглобулин сибирского осетра (рис. 2) (препарат с концентрацией белка 0,638 мг/см<sup>3</sup>).

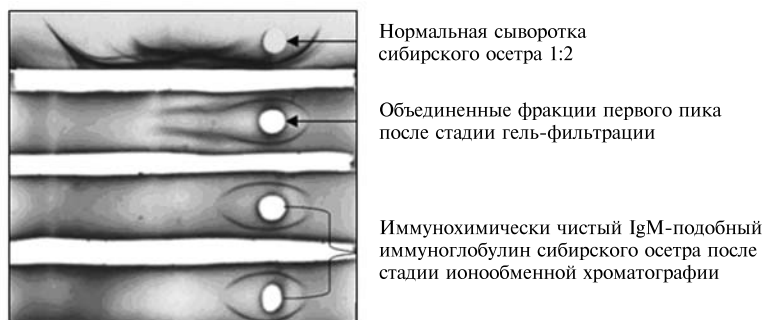


Рис. 2. Иммунофореграмма Ig сибирского осетра, выделенного из гипериммунной антисыворотки к герпесвирусу сибирского осетра. В канавках — антивидовая кроличья сыворотка к сыворотке крови сибирского осетра.

На следующем этапе в результате гипериммунизации кроликов против иммуноглобулинов сибирского осетра были получены антивидовые сыворотки с активностью в РДП 1:64-1:256. Для приготовления препарата антивидовых антител использовали антисыворотки с максимальной активностью. В результате выделили IgG кролика (препарат с концентра-

цией белка 17 мг/см<sup>3</sup>).

С целью определения пригодности разрабатываемого метода ТФ ИФА для выявления антител против SbSHV у других видов и гибридов осетровых рыб мы изучили антигенное родство иммуноглобулинов близкородственных видов осетровых. В реакции диффузионной преципитации (РДП) с антивидовым кроличьим IgG, полученным на Ig сибирского осетра, было установлено тесное антигенное родство иммуноглобулинов по крайней мере четырех видов и гибридов осетровых рыб — сибирского осетра, гибридов белуга × ленский осетр, белуга × стерлядь (бестер), стерлядь × белуга × стерлядь (СБС) и стерляди. Полученные данные показывают, что антивидовой кроличий IgG можно использовать для выявления антител к SbSHV у разных видов и гибридов осетровых рыб.

Из полученного кроличьего IgG против иммуноглобулина сибирского осетра были приготовлены пероксидазные конъюгаты.

Непрямой вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Оптимальные разведения реагентов для постановки непрямого варианта ТФ ИФА были определены шахматным титрованием. В результате установлено, что рабочее разведение специфического антигена для сенсibilизации планшетов составило 1:800, антивидового иммунопероксидазного конъюгата — 1:1000. При этом выявляемые титры антител в сыворотках крови осетровых рыб находились в пределах от 1:90 до 1:590490.

Для сравнения результатов РН и непрямого варианта ТФ ИФА гипериммунные осетровые сыворотки и сыворотки крови осетра, полученные из обследуемых рыбоводных хозяйств, были протитрованы обоими методами. Регрессионный анализ данных по титрам антител в РН и ТФ ИФА показал, что они тесно взаимосвязаны ( $R^2 = 0,8413$ ) и эта взаимосвязь представляет собой линейную зависимость, описываемую эмпирической формулой  $y = 1,2789x + 2,6992$  (рис. 3).

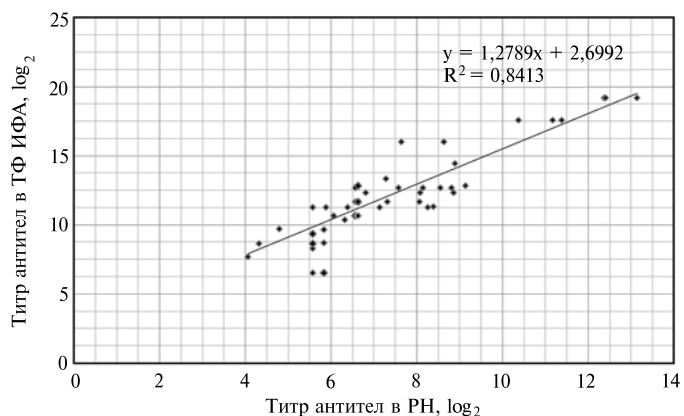


Рис. 3. Взаимосвязь титров антител против герпесвируса сибирского осетра в реакции нейтрализации (РН) и при твердофазном иммуноферментном анализе (ТФ ИФА) (описание см. в разделе «Методика»).

го осетра (SbSHV) у рыб, основанный на непрямом варианте твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА). Метод позволяет обнаруживать антитела как у сибирского осетра, так и у осетровых рыб других видов или их гибридов. Непрямой метод ТФ ИФА может быть использован для ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра в научных учреждениях и специализированных диагностических лабораториях.

Наличие такой взаимосвязи указывает на то, что ТФ ИФА может быть использован для получения достоверных данных о специфическом иммунном статусе осетровых рыб при ретроспективной диагностике и мониторинге герпесвирусной болезни сибирского осетра.

Итак, разработан быстрый и специфичный метод выявления антител к герпесвирусу сибирского

## ЛИТЕРАТУРА

1. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра. <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/illness/gerpes.html>.
2. Щелкунов И.С. Вирусные инфекции у осетровых рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая и реферативная информация. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. М., ВНИЭРХ, 2000, вып. 1: 3-16.
3. Hedrick R.P., McDowell T.S., Groff J.M., Yun S., Wingfield W.F. Characteristics of two viruses isolated from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Proc. of Second International Symposium on viruses of lower vertebrates /J.L. Fryer (ed.). Corvallis, OR, Oregon State University Press, 1991: 165-174.
4. Калабеков И.М., Калабекова Ф.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов И.С., Колбасов Д.В. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для выявления герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале. Мат. 3-й Межд. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Борок-М., 2011: 303-305.
5. Щелкунова Т.И., Купинская О.А., Машенко Н.А., Щелкунов И.С. Клеточные линии из тканей сибирского осетра. Тез. докл. Первого конгресса ихтиологов России. Астрахань, 1997: 302-303.
6. Hedrick R.P., McDowell T.S., Groff J.M., Yun S., Wingfield W.H. Isolation of epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Diseases of Aquatic Organisms, 1991, 11(1): 49-56.
7. Vouigne F.J. Ig A immunoglobulin from porcine serum. BBRC, 1969, 36: 138-142.
8. Gel-filtration. Principles and methods. Amersham Bioscience AB, Швеция, 2002.
9. Ion exchange chromatography. Principles and methods. Amersham Bioscience AB, Швеция, 2002.
10. Иммунологические методы /Под ред. Г. Фримеля. М., 1987.
11. Lowry O.H., Farr A.J., Raudal R.Y. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265-275.
12. Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб. В сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1. М., 1998: 60-113.
13. Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HPRO) to antibodies. In: Immunofluorescence and related staining techniques /W. Knapp et al. (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978: 215-244.

*1ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии  
и микробиологии Россельхозакадемии,  
601120 Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,  
e-mail: prokaeva-ul@yandex.ru;*

*2ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи  
Министерства здравоохранения и социального  
развития Российской Федерации,  
123098 г. Москва, ул. Гамалеи, 18,  
e-mail: bvnov@yandex.ru*

*Поступила в редакцию  
25 января 2013 года*

## INDIRECT ELISA FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES IN SERA OF STURGEON FISH SPECIES

*I.B. Prokaeva<sup>1</sup>, B.V. Novikov<sup>2</sup>*

### Summary

Herpesvirus disease of Siberian sturgeon, caused by SbSHV, is especially severe in the industrial populations. The commonly used method for its specific diagnostics has a sufficient disadvantage because of SbSHV active reproduction in vivo when the water temperature is in the range of 10-18 °C, and therefore, can be applied mainly in spring and sometimes in autumn. At other seasons the amount of the virus in the fish tissues reduces so that it becomes nearly unrevealable. We have developed a method for retrospective diagnosis of herpesvirus disease of Siberian sturgeon using indirect ELISA version. Experimental data on ELISA development for the detection of antibodies against Siberian sturgeon herpesvirus are presented. Procedures for preparing the ELISA specific reagents are described, including the virus reproduction in cell culture, isolation of IgM-like immunoglobulin from hyperimmune antisera of sturgeon, etc. The effectiveness of the proposed method and the reaction of neutralization was compared. It is shown, that by elaborated method the SbSHV antibodies can be detected both in the Siberian sturgeon, and among closely related species of sturgeon, or their hybrids.