На правах рукописи

МАСЛОВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА ГУСЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург-2006

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва), на Катайском гусекомплексе Курганской области и фермерских хозяйствах Ленинградской области.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор ветеринарных наук
Трефилов Борис Борисович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор ветеринарных наук, доцент
Соколова Лидия Николаевна

доктор ветеринарных наук, профессор
Борисов Александр Владимирович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета

Защита диссертации состоится «23» июня 2006 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины».

Автореферат разослан «20» мая 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доцент Узюмова О.В.

1. Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Серьезным препятствием на пути развития промышленного гусеводства наряду с факторами нарушения технологического режима выращивания являются различные инфекционные болезни молодняка, среди которых особое место занимает вирусный энтерит (парвовирусная инфекция) гусей. Это заболевание до настоящего времени имеет широкое распространение среди гусят 1-30-суточного возраста, протекает остро и характеризуется высокой смертностью, достигая до 90-100% (В.В. Малушко, 1982; Л.М. Контримавичус, 1983; Б.Б.Трефилов, 2000; А. Белецкая, 2003; Varga J., 2000).

Данные эпизоотологических и клинических наблюдений, патологоанатомической картины и лабораторных исследований свидетельствуют о том, что вирусный энтерит гусей (ВЭГ) протекает как моноинфекция и как смешанная инфекция с бактериальными, грибковыми и паразитарными болезнями (сальмонеллезы, колибактериоз, аспергиллез и кокцидиозы) (Б.Б.Трефилов, 2000; Kisary J., 1986).

Диагностика смешанных инфекций связана со значительными трудностями и требует комбинированного использования современных вирусологических и микробиологических методов исследования.

Следует отметить, что существующие методы лабораторной диагностики ВЭГ (реакция диффузионной преципитации, метод флуоресцирующих антител, реакция нейтрализации) являются либо недостаточно чувствительными, либо весьма трудоемкими, дорогостоящими, требуют специального оборудования и связаны с сезонностью репродуктивного периода гусей.

Поэтому разработка и совершенствование методов лабораторной диагностики этой болезни являются актуальными и имеют большое научное и практическое значение.

В зарубежной и отечественной литературе имеются сообщения о все возрастающей роли в диагностике инфекционных болезней, микотоксикозов и эймериозов животных иммуноферментного метода, обладающего высокой специфичностью, чувствительностью и лишенного недостатков, отмеченных при других вышеуказанных методах.

Цель и задачи работы. Учитывая опасность ВЭГ для гусеводства и отсутствие экспресс-метода диагностики заболевания, целью настоящих исследований явилась разработка иммуноферментной тест-системы для диагностики ВЭГ, основанной на выявлении специфических антител к вирусу энтерита гусей.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- получить высокоочищенный антиген вируса энтерита и вирусспецифическую гипериммунную сыворотку гусей;
- получить антивидовой иммунопероксидазный конъюгат специфичный к Ig G гусей;
- разработать иммуноферментную тест-систему для количественного определения антител к вирусу энтерита в сыворотке крови гусей методом последовательных разведений и методом одного разведения;
- изучить диагностическую ценность ИФА в сравнении с реакцией нейтрализации при диагностике ВЭГ;
- испытать иммуноферментную тест-систему при изучении иммуногенеза у вакцинированных против ВЭГ гусей;
- *разработать Методические указания для лабораторной диагностики вирусного энтерита* (парвовирусной инфекции) гусей методом иммуноферментного анализа.

Научная новизна. Впервые в РФ для серологической диагностики ВЭГ разработан непрямой вариант ИФА с использованием отечественных препаратов и реактивов. Выделен IgG из сыворотки крови интактных гусей, получен конъюгат иммунопероксидазный антивидовой гусиный. Дана сравнительная оценка непрямого метода ИФА с реакцией нейтрализации при ВЭГ. Изучена кинетика формирования поствакцинального иммунитета у гусят и гусей родительского стада против вирусного энтерита с применением ИФА в экспериментальных и производственных условиях. Установлена высокая чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы для выявления антител в сыворотках крови гусей к вирусу энтерита.

Практическая значимость. На основании проведенных исследований разработаны иммуноферментная тест-система для диагностики ВЭГ и методические указания по ее применению в птицеводческих хозяйствах и научно-производственных лабораториях. Показана перспективность применения ИФА при проведении серологического мониторинга и определении уровня поствакцинального иммунитета гусепоголовья.

Основные положения, выносимые на защиту:

- иммуноферментная тест-система для выявления и количественного определения антител к вирусу энтерита гусей при тестировании сывороток в одном разведении;
- результаты получения высокоочищенного антигена вируса энтерита и вирусспецифической гипериммунной сыворотки крови гусей;

- результаты получения антивидового иммунопероксидазного конъюгата специфичного к Ig G гусей;
- результаты сравнения разработанной тест-системы и реакции нейтрализации;
- результаты изучения трансовариального иммунитета при контрольном заражении вирулентным штаммом вируса энтерита гусят, полученных от вакцинированных и невакцинированных родителей;
- результаты изучения динамики иммуногенеза у гусят и гусей родительского стада против ВЭГ в экспериментальных и производственных условиях.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Методических советах отдела вирусологии и ОБП ВНИВИП (2003-2005гг.), на Международной Юбилейной научно-практической конференции «Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике в промышленном птицеводстве» (г. Санкт-Петербург – Ломоносов, 14-16 сентября 2004) и на 18-й Международной межвузовской научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии».

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 3 печатных работах.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах, иллюстрирована 8 таблицами и 10 рисунками. Список использованной литературы включает 254 источника, из них 143 зарубежных.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в 2002-2005 гг. в соответствии с утвержденным планом научно-исследовательской работы ВНИВИП по заданию 07.01 (№ госрегистрации 01.2.00 109631).

Соисполнителями отдельных фрагментов работы были старший научный сотрудник Никитина Н.В. и научные сотрудники НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва).

Вирус. В работе использовали контрольный штамм П-75 вируса энтерита гусей, адаптированный к гусиным эмбрионам, и вакцинный «клон 6» с титрами соответственно 4,3 lg $ЭЛД_{50}$/0,3см³ и 7,5 lg $ТЦД_{50}$/см³. Вирус хранили при температуре -20°С и поддерживали на развивающихся гусиных эмбрионах и в культуре клеток.

Лабораторные животные. В опытах использовали клинически здоровых гусят 1-30 – суточного возраста, доставленных из фермерских хозяйств Ленинградской области,

благополучных по вирусным заболеваниям птиц, и в том числе по вирусному энтериту гусей.

Получение антигена. Очистку вируса энтерита гусей проводили методом гельхроматографии на макропористом стекле (МПС), обработанном поливинилпирролидоном. Степень очистки вируса оценивали по белку.

Получение конъюгата. Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат специфичный к IgG гусей, получали модифицированным методом периодатного окисления (Nacane, 1981). Очистку конъюгата от несвязавшихся белков и пероксидазы проводили методом гельфильтрации на колонках с сефадексом G-200. Активность конъюгата проверяли в прямом сэндвич-методе со специфическим иммуноглобулином.

Иммуноферментный анализ. В работе использовали непрямой твердофазный метод ИФА, оптимальные условия постановки которого определяли экспериментально. Субстратом служила 5-аминосалициловая кислота (5-АСК), высокоочищенная (99%) производства США.

ИФА проводили на плоскодонных 96-луночных полистироловых планшетах производства Biohit, Финляндия. Результаты реакции учитывали на иммуноферментном анализаторе «Униплан» при длине волны 450 нм.

Постановка биопробы. Экспериментальное заражение гусят проводили введением контрольного штамма П-75 вируса энтерита в дозе 1000 ЭЛД$_{50}$ в 0,5 см^3 внутримышечно. Наблюдение за гусятами вели в течение 14 суток, результаты контрольного заражения оценивали положительно в случае гибели гусят с характерными клиническими признаками.

Статистический анализ данных. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Получение специфических компонентов для иммуноферментного анализа.

2.2.1.1. **Очистка вируса энтерита гусей.** Важнейшим условием непрямого метода ИФА является наличие высокоочищенных препаратов вируса. Активный и специфичный антиген ВЭГ получали из вируссодержащей экстраэмбриональной жидкости инфицированных 9-суточных гусиных эмбрионов с титром не менее 4,30 lg ЭЛД$_{50}$ /0,3см^3. Вируссодержащую жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, с целью освобождения от балластных белков. Затем проводили очистку надосадочной жидкости, содержащей вирус, методом молекулярно-ситовой хроматографии на МПС,

обработанном 4% раствором поливинилпирролидона, путем подбора размера диаметра пор стекла, концентрации и pH элюирующего буфера и количества наносимого вирусного материала. Показано, что очистка экстраэмбриональной вируссодержащей жидкости, используя МПС с диаметром пор 700Å, 0,01М натрий-фосфатный буфер с содержанием 0,15М хлорида натрия, pH 7,2-7,4 и количество наносимого вируса, равное 1/10 части от объема препаративной колонки, позволяла получать очищенный вирус с концентрацией белка 30-40 мкг в 0,1 см³. Очистка вируса составляла 98%. Активность антигена вируса энтерита, сорбированного в лунках планшет для ИФА, сохранялась более 12 месяцев при хранении при 4-8°С.

2.2.1.2. Получение специфической положительной и отрицательной сывороток крови гусей. Для получения специфической гипериммунной сыворотки крови к вирусу энтерита использовали клинически здоровых гусят 30-суточного возраста, свободных от антител к возбудителям вирусных болезней: ньюкаслская болезнь, гепатит, аденовирусная, рео- и парвовирусная инфекции гусей. Схема иммунизации была основана на введении нарастающих доз очищенного вируса энтерита. Экспериментально было показано, что оптимальным методом получения гипериммунной сыворотки крови гусей является трехкратное введение птице очищенного вируса энтерита по схеме: двукратное введение антигена вируса подкожно в объеме 0,5 см³ с интервалом в 7 дней. Третья иммунизация через 7 дней внутрибрюшинно в объеме 1,0 см³. Через 14 дней после последней иммунизации гусей тотально обескровливали путем взятия крови из сердца. Активность полученной гипериммунной сыворотки определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток гусиных эмбрионов в β-варианте. Гипериммунная специфическая сыворотка крови гусей была высокоактивной и имела титр 9,0 $\log_2$. Титр в ИФА составил 1:4000. Полученная сыворотка крови в лиофильно высушенном состоянии при хранении при 4-8С° не теряла своей активности в ИФА в течение 12 месяцев. Отрицательную сыворотку крови гусей получали от клинически здоровых гусят 30-суточного возраста, выращенных в камеральных условиях, свободных от антител к возбудителям вирусных болезней птиц, в том числе к вирусу энтерита гусей, во-первых, для отрицательного контроля в ИФА, во-вторых, для получения антивидового иммунопероксидазного конъюгата.

2.2.1.3. Получение конъюгата. Качество конъюгатов, полученных периодатным методом, оценивали по активности пероксидазы и специфических иммуноглобулинов и по соотношению пероксидазы и иммуноглобулина в конъюгате. Обнаружено, что предварительная очистка производственного препарата пероксидазы на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой повышала активность фермента. RZ различных серий препарата после

очистки колебалась от 3,0 до 3,8, в то время как различные серии производственного препарата давали разброс от 2,7 до 3,0. Очищенная пероксидаза была электрофоретически гомогенна. При электрофорезе в ПААГ исходный препарат пероксидазы содержал 4 фракции, тогда как очищенный в лабораторных условиях фермент давал одну доминантную полосу и две слабовыраженные минорные полосы. На стадии очистки конъюгата от несвязавшихся белков и пероксидазы использовали пиковые фракции с коэффициентом связывания от 0,4 до 0,6, так как именно при этом коэффициенте достигается оптимальное соотношение фермента с иммуноглобулином в конъюгате, когда каждая молекула иммуноглобулина связана с одной или более молекулами пероксидазы. Активность конъюгата в прямом методе ИФА была 1:6000. Для выявления специфических антител к ВЭГ подбирали оптимальное рабочее разведение конъюгата, которое составило 1:300 – 1:400. Конъюгат в лиофилизированном состоянии при хранении при 4-8°С сохранял свою активность в течение 24 месяцев.

2.2.2. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических антител к парвовирусу гусей

2.2.2.1. Оптимизация условий постановки ИФА. Оптимизацию параметров постановки реакции при выявлении специфических антител к ВЭГ вели по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам диагностической тест-системы. Установлено, что для получения активного твердофазного иммуносорбента лучше использовать планшеты фирмы Biohit (Финляндия). Оптимальным режимом сенсибилизации полистироловых планшет антигеном ВЭГ является инкубация при 4°С в условиях бытового холодильника в течение 18 часов в 0,01М натрий-фосфатном буфере с содержанием 0,15М хлорида натрия, pH 7,2-7,4, с концентрацией вирусного белка 5-8 мкг/0,1см³. В процессе постановки реакции исследуемые, контрольные сыворотки и конъюгат инкубировали в термостате при 37°С в течение 30 минут. В качестве промывочной буферной системы, обеспечивающей специфичность ИФА, использовали 0,01М калий-фосфатный буфер, pH 7,2-7,4, содержащий 0,5М NaCl с 0,1% конечной концентрацией детергента твин-20.

2.2.2.2. Определение диагностического титра сыворотки в ИФА. Диагностический титр в ИФА устанавливали методом «шахматного титрования» различных положительных сывороток, начиная с разведения 1:10, при стандартной концентрации (8 мкг на лунку) сорбированного антигена. Показано, что разведение сывороток 1:100 дает возможность не пропустить слабоположительные сыворотки. При этом 20 сывороток крови из благополучных по вирусному энтериту хозяйств были отрицательными в ИФА, что

подтверждает специфичность разработанной диагностической тест-системы. Установлено, что при обследовании гусеводческих хозяйств на ВЭГ целесообразно начинать постановку ИФА с разведения сыворотки 1:50 и считать разведение сыворотки 1:100 диагностическим титром на вирусный энтерит.

2.2.2.3. Количественная оценка титра антител к вирусу энтерита гусей методом одного разведения. Для определения конечного титра тестируемых сывороток по одному разведению использовали метод регрессионного анализа в компьютерной программе Microsoft Excel. Математические расчеты проводили для разведений сывороток 1:50, 1:100 и 1:200 (табл.1). Были найдены коэффициенты линейной регрессии для величин lg S/P и lg T (рис.1). Установлено, что наиболее высокое значение коэффициента корреляции определено для разведения сыворотки 1:100, которое и было принято за рабочее. Уравнение линейной регрессии (lg T = 2,02401 lg(S/P) + 3,50738) для разведения сыворотки 1:100 было использовано для расчета числового значения титра. Полученное уравнение линейной регрессии будет достоверно для определенных значений оптической плотности отрицательной и положительной контрольных сывороток. Статистическая обработка 40 таких значений показала, что ОП контрольных сывороток с 95% уровнем достоверности должна находиться в интервале от 0,420 до 0,930 для положительной и в интервале 0,065 до 0,150 для отрицательной контрольных сывороток.

Таблица 1

Коэффициенты линейной регрессии и корреляции для исследуемых разведений

Разведение	A	B	R
1:50	2,11234	3,46748	0,89385
1:100	2,02401	3,50738	0,95832
1:200	1,93311	3,55175	0,95152

A, B – коэффициенты линейной регрессии;
R – коэффициент корреляции.

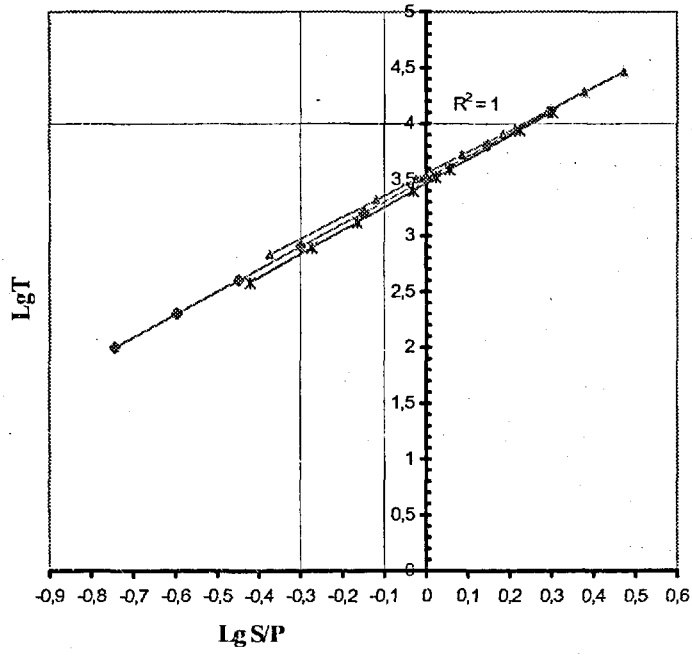

Рис.1. График зависимости величин lgT от lg S/P для рабочего разведения сыворотки

2.2.4. Вычисление позитивно-негативного порога. Для разграничения неспецифической, сомнительной и специфической реакций определяли пороговые значения S/P-отношения. В качестве пороговой величины для отрицательной реакции приняли S/P-показатель, который соответствовал верхней границе 95% доверительного интервала исследованной выборки значений ОП, S/P-показатель для отрицательной реакции составил 0,14. Пороговой величиной, соответствующей минимальной ожидаемой положительной реакции, считали значение S/P, установленное для верхней границы 95% доверительного интервала. Величина S/P для положительной реакции составила 0,18. Промежуточные величины соответствовали зоне «сомнительных» результатов.

2.2.2.5. Оценка чувствительности и специфичности разработанной тест-системы. Оценку чувствительности и специфичности разработанной тест-системы проводили путем

сравнительного анализа результатов тестирования сывороток в ИФА и в реакции нейтрализации (РН), которая является классическим тестом диагностики вирусных заболеваний. Результаты исследования представлены в табл.2. Параллельное тестирование 30 сывороток крови гусей различной активности показало, что корреляция между результатами исследования в ИФА и РН составила 96%, 90% и 85%, соответственно. С отрицательными и гетерологичными сыворотками крови гусей результаты иммуноферментной реакции были отрицательными (P<0,05). Полученные результаты исследований подтверждают высокую чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы.

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения серологических реакций

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови гусей	Активность сывороток		коэффициент корреляции, r
		РН, log_2	ИФА	
1.	гипериммунная сыворотка (положительный контроль)	9,0	3388	0,96
2.	отрицательная сыворотка (отрицательный контроль)	0,75	—	—
3.	сыворотка крови от невакцинированных гусей	0,75	—	—
4.	сыворотка крови от вакцинированных гусей	8,5	2884	0,90
5.	сыворотка крови суточных гусят, полученных от вакцинированных родителей	5,8	305	0,85
6.	гетерологичные сыворотки к вирусам: - гепатита - реовируса	 — —	 — —	 — —

2.2.3. Практическое использование разработанной тест-системы на основе непрямого метода ИФА.

2.2.3.1. Изучение защитных свойств трансовариального иммунитета против вирусного энтерита при контрольном заражении гусят. Изучение напряженности трансовариального иммунитета проводили на суточных гусятах из «Катайского гусеводческого комплекса», от гусей родительского стада вакцинированных против вирусного энтерита. Гусят заражали контрольным штаммом П-75 вируса энтерита в дозе 1000 $ЭЛД_{50}$ внутримышечно. Антитела в сыворотках крови гусят выявляли в ИФА с применением разработанной тест-системы. Результаты представлены на рис.2.

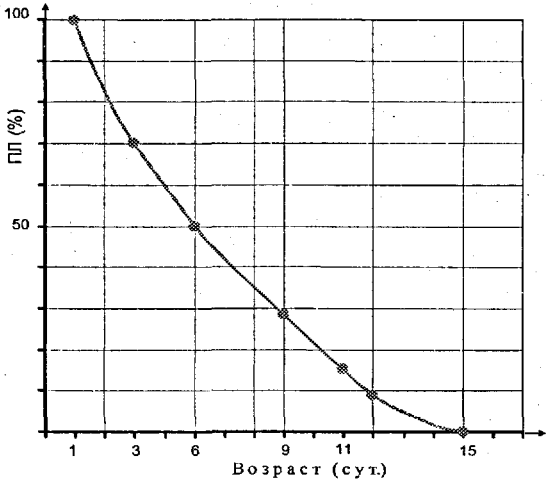

Рис. 2. Процент положительных (ПЛ) в ИФА проб сыворотки крови гусят, полученных от вакцинированных родителей

Установлено, что у суточных гусят, полученных от вакцинированных родителей материнский иммунитет составил 100%. На 3-й, 6-й и 9-й день исследований количество положительно реагирующих проб составило 70, 50 и 25%, соответственно. На 15-й день исследуемые пробы сыворотки крови гусят были отрицательными. У гусят, полученных от невакцинированных родителей, во все сроки исследований пробы сыворотки крови были серонегативными. Результаты контрольного заражения представлены в табл. 3.

Таблица 3

Поствакцинальный иммунитет у гусей и напряженность материнского иммунитета у гусят

Группа	Средний титр антител*		Заражено	Результаты контрольного заражения гусят		Е,%
	родители	гусята		Заболело	Пало	
А	2852±230 P<0.05	499±66	20	2	—	90
В	215±23 P<0.05	—	20	10	8	—

* – титр антител в обратных величинах
А – вакцинированные против энтерита родители;
В – невакцинированные против энтерита родители;
Е – иммунологическая эффективность.

Показано, что материнский иммунитет был напряженным. Средний титр антител составил 499±66. Иммунологическая эффективность составила 90%, что согласуется с результатами серонейтрализации при проведении испытаний вирусвакцины сухой культуральной ВНИВИП против вирусного энтерита гусей (Б.Б. Трефилов, 1993).

2.2.3.2. Изучение формирования иммунитета у гусят в лабораторных условиях методом ИФА. В опытах использовали гусят 10-суточного возраста, полученных из фермерского хозяйства Ленинградской области, благополучного по вирусному энтериту. Птицу вакцинировали вирусвакциной ВНИВИП. Ревакцинацию проводили через 20 дней. Сыворотки тестировали в ИФА с применением разработанной тест-системы с интервалом в 5 дней. Результаты исследований представлены на рис. 3.

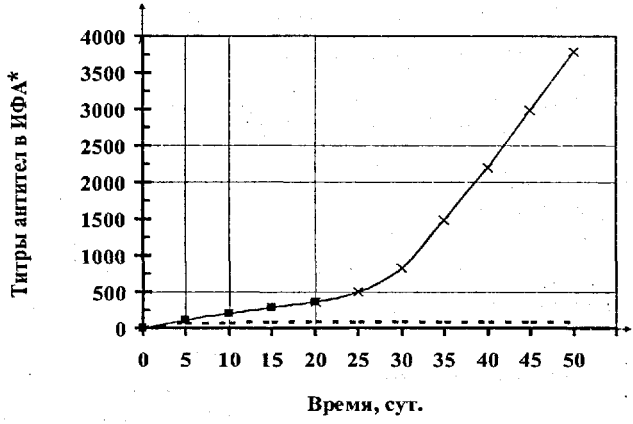

Рис. 3. Динамика формирования антител у гусят, вакцинированных против ВЭГ
– ■ – первая вакцинация на 10 сут.;
– x – ревакцинация через 20 сут.;
------ контроль.

Изучение динамики иммуногенеза у гусят, вакцинированных вирусвакциной ВНИВИП в экспериментальных условиях, показало, что разработанная иммуноферментная тест-система выявляет специфические антитела в сыворотке крови гусят уже на 5-е сутки после вакцинации, ревакцинация через 20 дней индуцировала в организме птицы значительное увеличение уровня антител в сыворотке крови.

2.2.3.3. **Изучение поствакцинального иммуногенеза у гусей в производственных условиях.** Результаты серологических исследований проб сывороток крови гусей, полученных из ООО «Катайский гусеводческий комплекс», показали, что в результате двукратной вакцинации гусей родительского стада вирусвакциной ВНИВИП в организме птицы формируется напряженный иммунитет (табл. 4.).

Таблица 4

Результаты серологических исследований проб сывороток крови гусей в ИФА (n=25), P<0,05

№ п/п	Наименования групп	Обратная величина среднего титра	Число положительных реагирующих проб (ПР), %
1.	Сыворотки крови суточных гусят от вакцинированных родителей	305±26	100%
2.	Сыворотки крови гусей пред вакцинацией	830±54	100%
3.	Сыворотки крови гусей после 1-й вакцинации гусей	572±107	100%
4.	Сыворотки от ревакцинированных гусей	1579±151	100%
5.	Сыворотки от вакцинированных гусей на пике яйцекладки	2808±216	100%

Средний титр антител на пике яйцекладки составил 2808 (P<0,05), а у гусят, полученных от вакцинированных родителей, средний титр антител в ИФА составил 305 (P<0,05). Этот титр обеспечивал защиту гусят от полевого заражения, что подтверждается ранее полученными результатами (Б.Б. Трефилов, 2000).

Апробация разработанной иммуноферментной тест-системы во всех вариантах ее практического применения показала высокую чувствительность и специфичность при обнаружении антител к парвовирусу гусей.

Таким образом, комплекс проведенных исследовательских работ позволил разработать иммуноферментную тест-систему для количественного определения антител к вирусу энтерита в сыворотках крови гусей методом последовательных разведений и методом одного разведения. Результаты применения иммуноферментной тест-системы свидетельствуют о том, что данный экспресс-метод является высокочувствительным и специфичным для обнаружения специфических антител при проведении ретроспективной диагностики и определения уровня поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей (парвовирусной инфекции).

3. Выводы

1. Разработана высокочувствительная иммуноферментная тест-система для выявления специфических антител при ретроспективной диагностике парвовирусной инфекции гусей и определении уровня поствакцинального иммунитета при этой болезни.

2. Очищенный антиген ВЭГ, полученный методом молекулярно-ситовой хроматографии на МПС, высокоактивен, специфичен и стабилен при сорбции на полистироловые планшеты для ИФА.

3. Гипериммунная сыворотка крови гусей, полученная путем иммунизации гусят очищенным вирусом энтерита, является высокоактивной и специфичной. Сыворотка стабильна при хранении в лиофилизированном состоянии.

4. Конъюгат к IgG гусей, полученный периодатным методом, активный, специфичный и стабильный при хранении в лиофилизированном состоянии.

5. Установлено, что оптимальными параметрами постановки ИФА тест-системы при ВЭГ являются: сенсибилизирующая доза антигена 5-8 мкг/лунку; адсорбция антигена в 0,01М натрий-фосфатном буфере с содержанием 0,15М NaCI, pH 7,2-7,4; продолжительность инкубации в течение 18 часов при температуре 4°С, а проведение реакции: инкубация исследуемых и контрольных сывороток, а также конъюгата в разведении 1:400 при 37°С в течение 30 минут, соответственно; промывочная буферная система 0,01М калий-фосфантный буфер, pH 7,2-7,4, содержащая 0,5М NaCI с 0,1% конечной концентрацией детергента твин-20.

6. Разработанная твердофазная иммуноферментная тест-система для ретроспективной диагностики вирусного энтерита (парвовирусной инфекции) гусей является высокочувствительным методом по сравнению с серонейтрализацией и позволяет обнаружить антитела в исследуемых пробах сывороток крови в течение 3-5 часов. Установлена высокая корреляция в результатах ИФА и РН.

7. Изучена динамика иммуногенеза у гусят и гусей родительского стада против ВЭГ с применением ИФА и РН в экспериментальных и производственных условиях.

4. Практические предложения

На основании проведенных исследований разработаны «Методические указания для лабораторной диагностики вирусного энтерита (парвовирусной инфекции) гусей методом иммуноферментного анализа», предназначенные для ветврачей-вирусологов региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

5. Список научных работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Трефилов Б.Б. Изучение культуральных свойств вируса энтерита гусей / Трефилов Б.Б., Маслов Д.В., Кривенцев К.А. // Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: Материалы международной юбилейной научно-практической конференции (14-16 сентября, 2004, г. Санкт-Петербург-Ломоносов) / ВНИВИП.-СПб.,2004.-С.106-107.

2. Трефилов Б.Б. Методические указания для лабораторной диагностики вирусного энтерита (парвовирусной инфекции) гусей методом иммуноферментного анализа /Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Маслов Д.В. – СПб., 2005.-С.12.

3. Маслов Д.В. Диагностика вирусного энтерита гусей методом иммуноферментного анализа / Д.В. Маслов, Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов// Новые фармакологические средства в ветеринарии: Материалы XVIII Международной межвузовской научно-практической конференции / СПбГАВМ.-СПб.,2006.-С.57.

Подписано в печать 12.05. 006. Формат бумаги 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ 3774.
Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр.26