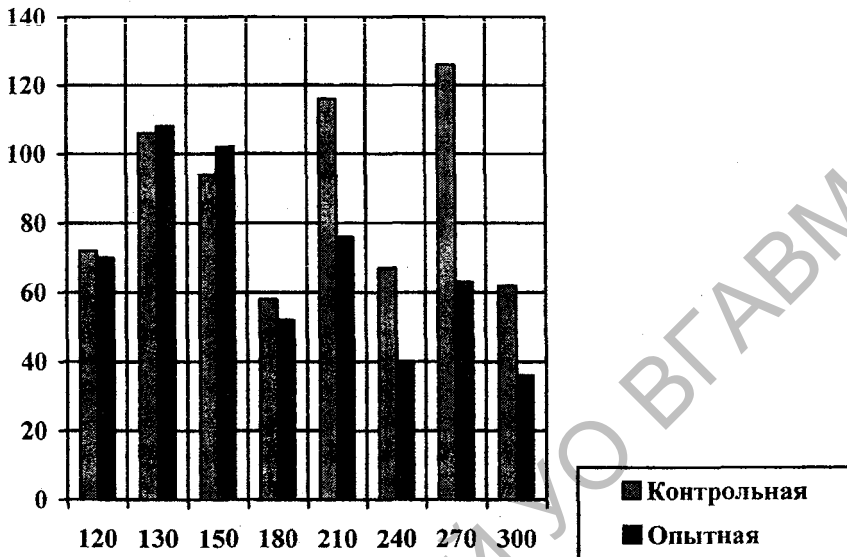


Рис. 2. Уровень прогестерона, нмоль/л.



УДК 619:578.826.1:616-078.33

**НЕПРЯМОЙ БЛОКИРУЮЩИЙ ВАРИАНТ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АДЕНОВИРУСОВ ПТИЦ 4 СЕРОТИПА**

ВОЛКОВА М.А., ЛОБАНОВ В.А., БАТЧЕНКО Г.В., МУДРАК Н.С., ФАЛИ-
НА Г.М., ДРЫГИН В.В., СУРНЕВ Д.С., БОРИСОВ В.В.

Всероссийский НИИ защиты животных, г. Владимир

Ряд авторов (Akhtar S., 1995, Mendelson C., 1995) сообщали, что аденовирусы птиц 1 группы (4 серотип) могли быть причиной возникновения у кур синдрома гепатита - гидроперикардита. В настоящее время для обнаружения аденовирусов используют иммунофлуоресцентный метод, реакцию нейтрализации, молекулярно-биологические методы (ПЦР и рестрикционный анализ его продуктов) (Hess M., 1998). Эти методы требуют использования дорогостоящих материалов и оборудования, либо продолжительны по времени постановки анализа. По данным литературы, для выявления аденовирусов используются различные варианты иммуноферментного анализа (Saifuddin Md., 1990), достоинствами которых являются экспрессность, возможность стандартизации условий постановки реакции.

Целью работы была разработка тест-системы для обнаружения и количественного определения аденовирусов птиц 4 серотипа в вирусосодержащих материалах на основе непрямого блокирующего варианта иммуноферментного анализа (Б-ИФА).

В качестве вирусного антигена использовали очищенный концентрированный препарат антигена аденовируса птиц 4 серотипа. В качестве блокирующих антител применяли поликлональную гипериммунную сыворотку кур против аденовируса 4 серотипа. Специфическая активность поликлональной сыворотки была в непрямом варианте ИФА 1:25600, активность с гетерологичными антигенами не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

Реакцию Б-ИФА проводили в два этапа: жидкофазный и твердофазный методом двукратных последовательных разведений проб. К разведениям исследуемых проб вирусных суспензий и отрицательных контрольных проб (10% суспензии нормальной печени кур или культуры клеток эмбриональной печени кур) добавляли равный объем поликлональных антител к аденовирусу 4 серотипа в рабочем разведении. Смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C, затем наносили по 100мкл смеси на полистироловый планшет с предварительно адсорбированным на нём аденовирусным антигеном 4 серотипа в рабочей концентрации и далее проводили реакцию непрямого ИФА. После инструментального учёта результатов реакции процент блокирования определяли по формуле:

$$Б(\%) = 100 - (100 - ОП_{\text{пробы}} / ОП_{\text{отриц. контроля}}).$$

При титровании 60 образцов нормальной печени кур и культуры клеток печени эмбрионов, отрицательных в ПЦР, установили позитивно-негативный порог. Учёт реакции проводили по конечной точке титрования. Титром вируса считали последнее его разведение, процент блокирования в котором был равен или больше 30.

При определении специфичности реакции с различными гетерологичными антигенами (вирусы синдрома снижения яйценоскости-76, инфекционной бурсальной болезни, ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита, инфекционной анемии цыплят, инфекционного энцефаломиеелита, реовируса) и референтными птичьими аденовирусами 1,2,4,6,7,8,10,11 серотипов было показано, что процент блокирования не превышал 16-20.

Разработанный Б-ИФА применяли для контроля вакцинного сырья. Титр аденовируса 4 серотипа в исходной суспензии печени кур, используемой для производства вакцины против гидроперикардита кур, составил в Б-ИФА 1:256. После концентрирования вирусосодержащей суспензии полиэтиленгликолем 6000 в 75 раз титр вируса в Б-ИФА был 1:1600. Разработанный метод позволял определять активность аденовируса также в вирусосодержащей культуральной жидкости. Титр аденовируса 4 серотипа, выращенного в культуре клеток печени эмбрионов и имеющего титр инфекционности 7,25 ТЦД₅₀/мл, составил в Б-ИФА 1:16.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что предложенная иммуноферментная система на основе блокирующего варианта ИФА может применяться для выявления аденовируса птиц 4 серотипа и контроля вакцинного сырья.

УДК 619:579.887.111:636.52/58:616-078.33

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К MYCOPLASMA GALLISEPTICUM ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ СЫВОРОТОК В ОДНОМ РАЗВЕДЕНИИ

**ВОЛКОВА И. А., МУДРАК Н.С., ДРЫГИН В.В., ГИРИН М.В., БОРИСОВ
А.В., ИРЗА В.Н.**

Всероссийский НИИ защиты животных, г. Владимир

Применяемые для диагностики микоплазмозов серологические тесты: РА, РПГА, реакция ингибирования роста (РИР), РДП, РТГА, не всегда обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, и возможностью стандартизации условий постановки реакции, что является важным при массовом серологическом мониторинге птицепоголовья. Многие зарубежные фирмы (KPL, IDEEX, Biocheck и др.) выпускают коммерческие наборы на основе непрямого ИФА для определения антител к *Mycoplasma gallisepticum* в сыворотках крови в одном разведении пробы, но их применение в ветеринарной практике ограничено высокой стоимостью.

Целью нашей работы была разработка отечественной тест-системы для обнаружения антител к возбудителю респираторного микоплазмоза кур на основе непрямого варианта ИФА при тестировании сывороток в одном разведении.

В качестве антигена использовали штамм S6 *Mycoplasma gallisepticum*, выращенный в среде Frey с 10-15% лошадиной сыворотки с последующей очисткой, концентрированием, центрифугированием и обработкой додецилсульфатом натрия. После проверки на активность и специфичность антиген наносили на планшеты (Nunc, Дания) в концентрации 0,01 мг/мл для постановки непрямого варианта ИФА.

В качестве положительного контроля использовали гипериммунную сыворотку крови кур, двукратно иммунизированных *Mycoplasma gallisepticum*, в качестве отрицательного – сыворотку крови кур, не имеющих антител к *Mycoplasma gallisepticum*.

Непрямой вариант иммуноферментного анализа проводили по стандартной методике. Для выбора оптимального рабочего разведения исследовали 90 сывороток с разным уровнем антител к *Mycoplasma gallisepticum* в разведениях 1:100, 1:200, 1:400 и вычисляли значения S/P (отношение оптической плотности испытуемой сыворотки к разнице между оптическими