



Cormorant family (June, 2013)



Cormorant nest, chicks (June, 2013)

D.K. Lvov considers that temporary "migratory" disease outbreaks are formed along the migration route areas both in the nesting areas and in the resting or wintering areas, etc. and the agent's circulation is maintained [2].

Synanthropic birds are a specific vector of the virus transmission between the virus reservoir in the wild avifauna and susceptible birds. However, due to the fact that in the Uvs-Nuur adjacent areas local community is occupied solely with pastoral farming and do not raise poultry, no outbreaks are being reported in poultry as there is no susceptible organism whose presence in the natural nidus would have resulted in unavoidable disease.

CONCLUSION

While summing up the monitoring research results one should emphasize that Uvs-Nuur Lake plays an important role not only as a resting, feeding and nesting area for wild birds but also as an "indicator" of the virus introduction into the Russian Federation during its seasonal migrations along the Central-Asian and East-Asian routes thus being of the utmost interest for examination of the avian influenza virus ecology.

Highly pathogenic avian influenza virus circulation was confirmed in the populations of wild avifauna in Uvs-Nuur migration nidus.

With due regard of the missions sent to Uvs-Nuur Lake, Republic of Tyva, Russian Federation and their results, late

Ice drift on the lake – dangerous period for monitoring (April, 2014)



May-early June should be considered the optimal time for the wild avifauna monitoring.

The missions were funded under the IAEA Project No. 17547/RO.

BIBLIOGRAPHY

1. Veterinary rules for avian influenza A laboratory diagnosis: MoA Order of 3.04.2006 No. 105 // Vet. Consultant. – 2006. – No. 12. – P. 8–9.
2. D.K. Lvov, V.D. Ilyichev Bird migrations and transmission of infectious agents. Ecological and geographic interrelations between birds and infectious agents. – M.: Nauka, 1979. – 270 p.
3. International cooperation for examination and preservation of birds in Yakutia: basic results, new approaches and methods / N.I. Germogenov, N.G. Solomonov, A.G. Degtarev [et al] // Birds of Siberia: structure and dynamic of fauna, bird habitat and population/ edited by L.G. Vartapetov. – M., 2011. – P. 289–310.
4. T.P. Ozerskaya Habitat structure and ecology of birds in Uvs-Nuur basin: Author's abstract of the dissertation ... Candidate of Science (Biology). – M., 2008. – 21 p.
5. Influenza A virus circulation and bird mortality in the south of Central Siberia/ A.P. Savchenko, V.I. Yemelyanov, P.A. Savchenko [et al] // VSNC CO RAMN Proceeding. – 2012. – No. 5 (87). – P. 310–315.
6. Russia's Anseriformes field indicator / N.D. Poyarkov, A.V. Kondratyev, K.Ye. Litvin [et al]. – M., 2011. – 223 p.
7. V.K. Ryabintsev Birds of the Urals, Transurals and West Siberia. - Yekaterinburg, 2008. – 634 p.
8. M.Yu. Schelkanov Evolution of highly virulent influenza A (H5N1) virus in Northern Eurasia ecosystems (2005–2009): Author's abstract of the dissertation ... Doctor of Science (Biology). – M., 2010. – 53 p.
9. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) / P. Stumpf, K. Failing, N. Papp [et al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54 (4). – P. 1183–1190.
10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian influenza / OIE. – Paris, France, 2014. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
11. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna* / B.W. Meixell, M.A. Borchardt, S.K. Spencer // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79 (23). – P. 7249–7255.

УДК 619:616.98:578.828.11:636.52/58:616-078

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА ПТИЦ

С.П. Лазарева¹, М.А. Волкова², Н.С. Мудрак³, И.А. Чвала⁴, Т.В. Жбанова⁵

¹ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lazareva@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁴ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ заведующий аспирантурой, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhbANOVA@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе иммуноферментного метода для выявления антител к вирусу лейкоза птиц (ALV) при тестировании сывороток в одном разведении. Титр антител определяли по S/P отношению, измеренному в одном рабочем разведении сыворотки (1:400). Разработанная тест-система показала высокую специфичность и чувствительность в сравнении с импортным коммерческим набором.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, иммуноферментный анализ, антиген, анти-тело.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы птиц широко распространены в промышленном птицеводстве. Возбудителями лейкозов птиц являются вирусы (ALV), принадлежащие к семейству *Retroviridae*, роду *Alpharetrovirus*. ALV подразделяются на 6 антигенных подгрупп: А, В, С, D, Е, J, которые, в свою очередь, имеют в своем составе множество штаммов. Имеются данные, доказывающие возможность перекрестной нейтрализации между ALV-A и ALV-J по капсидному антигену р27, общему для всех подгрупп [4]. Экономический ущерб от ALV связан, как правило, с гибелью от вторичных инфекций и неопластических заболеваний, а также со снижением ряда производственных показателей, включая продукцию яиц и их качество. ALV способны вызывать целый ряд неопластических заболеваний, таких как лимфоидный лейкоз, миелобластоз, миелоидный лейкоз, глиомы, остеопетроз, гемангиомы и т.д. Клинические признаки заболевания проявляются у кур в возрасте старше 100 сут. [3, 5, 7].

Диагностируют заболевание по результатам лабораторных и патоморфологических исследований. Антитела к ALV периодически выявляют в образцах сывороток крови кур, поступающих как из яичных, так и из бройлерных птицефабрик Российской Федерации

(РФ) [2]. Данный факт свидетельствует о циркуляции вируса среди коммерческого поголовья птицы. Запатентованных вакцин против ALV на сегодняшний день не существует. Исходя из этого, борьба с инфекцией осуществляется путем комплектования племенного стада из хозяйств, благополучных по лейкозу птиц. Одним из способов достижения данного результата является проведение регулярного серологического мониторинга поголовья птицы с последующей выбраковкой и уничтожением больных особей [7].

В серологической диагностике ALV различных подгрупп на территории РФ в настоящее время используются коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА), выпускаемые фирмами Zoetis, IDEXX (США). В РФ подобных тест-систем не разработано. Таким образом, разработка отечественных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ALV является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Штамм ALV-J/CLB-908U, выделенный в 2009 г. из патологического материала, поступившего из птицефабрики Челябинской области [1]. Штамм депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». В работе использовали культуральную вирусосодержащую жидкость 3 пассажа с титром инфекционной активности 5,5 Ig ЭД₅₀/см³. Культивирование вируса проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур.

Антиген. Препарат антигена ALV получили согласно разработанному ранее методу [1]. Для определения концентрации типоспецифического антигена ALV в вирусосодержащих материалах использовали коммерческий набор «Avian leukosis virus antigen test kit» (Synbiotics, США) по инструкции производителя.

Электрофорез. Очищенный концентрированный антиген исследовали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле [6].

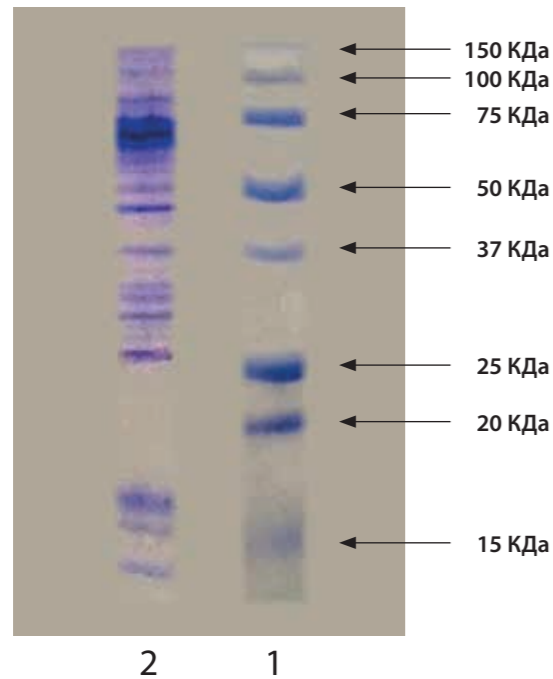


Рис. 1. Результаты электрофореза концентрированного препарата ALV-J/CLB-908U
 1 — белковый маркер;
 2 — препарат очищенного и концентрированного культурального ALV-J/CLB-908U.

образовавшихся комплексов использовали иммунопероксидазный конъюгат (Synbiotics, США) в рабочем разведении в буфере. Все компоненты в реакции добавляли в объеме 100 мкл, инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. В качестве субстрата использовали раствор АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоная кислота), содержащий перекись водорода. Спустя 10 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 1% додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили с использованием спектрофотометра-ридера TECAN-Sunrise (TECAN, Австрия) при длине волны 405 нм. Анализ результатов осуществляли с использованием компьютерных программ «СИНКО-ИФА» (свидетельство о регистрации №2000611338) и Statistica 10.0 (Correlation matrices) (Stat Soft. Inc., США).

Определение чувствительности и специфичности тест-системы. Данный этап работы включал в себя исследование двух видов панелей сывороток. Первая включала в себя сыворотки крови кур в возрасте 120–330 суток, поступивших с птицефабрик РФ. Вторая состояла из сывороток крови экспериментально зараженных кур. Для получения данной панели использовали 2 группы цыплят-бройлеров в возрасте 40 суток. Одну из них в количестве 5 голов оставляли незараженной, другую заражали штаммом ALV-J/CLB-908U 4 пассажа, полученном на КК ФЭК. Заражающая доза вируса составляла 4,0 Ig ЭД₅₀/см³. Повторное заражение осуществляли спустя 28 суток. Отбор образцов сывороток крови проводили через 14 и 28 суток после 1 заражения и через 14, 21 и 28 суток после 2 заражения. Сыворотки исследовали методом ИФА с помощью тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» и коммерческого набора для выявления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Полученные результаты использовали для оценки специфичности и чувствительности разработанной тест-системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения антигена ALV проводили инактивацию, очистку и концентрирование вирусного материала. Концентрация полученного антигена ALV в ИФА составила 16000 пкг/см³. По результатам электрофореза очищенного концентрированного антигена в препарате выявлены специфические белки с молекулярными массами 85, 63, 48, 37, 30, 27 кДа (рис. 1).

Для определения оптимальной рабочей концентрации антигена готовили варианты разведений, которые использовали для сенсibilизации планшетов и тестирования с помощью положительной и отрицательной контрольных сывороток. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1
Определение оптимальной рабочей концентрации антигена для выявления антител к ALV
 (n=3)

Образцы сывороток	Концентрация вирусного белка, пкг/см ³ / титр антител к ALV в ИФА*		
	80	32	16
Положительная контрольная сыворотка к ALV	3200±0	3200±0	800±0
Нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль)	<100	<100	<100

* титр антител — величина, обратная разведению сыворотки.

Исходя из того, что при концентрации антигена 32 пкг/см³ значение титра антител гипериммунной сыворотки оставалось наибольшим, для проведения дальнейшей работы была выбрана указанная рабочая концентрация антигена.

Для определения формулы расчета титра антител к ALV при тестировании сывороток в одном разведении было исследовано в непрямом варианте ИФА 180 сывороток с разными титрами антител к вирусу ALV в разведениях 1:100, 1:200, 1:400. Титры испытуемых сывороток были предварительно установлены методом последовательных разведений. По результатам измерений для каждого разведения сывороток были вычислены значения S/P. На основе полученных данных с использованием программы Statistica 10.0 были построены линии регрессии, отражающие зависимость Ig титров антител, определенных методом последовательных разведений, от Ig S/P для каждого разведения сывороток. По результатам регрессионного анализа, наибольший коэффициент корреляции из трех, равных 0,96507; 0,94705 и 0,97583 соответственно для разведений 1:100, 1:200 и 1:400, был получен для разведения сывороток 1:400, которое было выбрано в качестве рабочего. Для данного разведения была построена линия регрессии (рис. 2), которая отражала зависимость между IgT ИФА, определенным методом последовательных разведений, и Ig S/P для разведения 1:400. Уравнение линейной регрессии имело вид: Ig T=3,2947+1,6932×Ig S/P

Для объективной оценки иммунного ответа необходимо было установить позитивно-негативный порог (ПНП). 183 сыворотки крови от 10-суточных цыплят, не имевших антител к ALV, а также кур 100–400-суточного возраста, показавших отрицательный результат с применением набора IDEXX (США), исследовали в трех повторностях в разные дни. В качестве положительного и отрицательного контроля были взяты стандартные контрольные сыворотки. ПНП определяли путем расчета средних значений S/P отрицательных сывороток для разведения 1:400 и стандартного отклонения. Среднее значение S/P отрицательных сывороток составило 0,1084, стандартное отклонение — 0,0894. На основании проведенного статистического анализа результат считали отрицательным, если величина T≤1:238, сомнительным — если 1:238<T<1:476 и положительным в случае T≥1:476. В случае, когда качественную сторону результатов реакции определяли по значению величины S/P: для отрицательного результата S/P≤0,3; для положительного результата S/P≥0,45; для сомнительного результата 0,3<(S/P)<0,45.

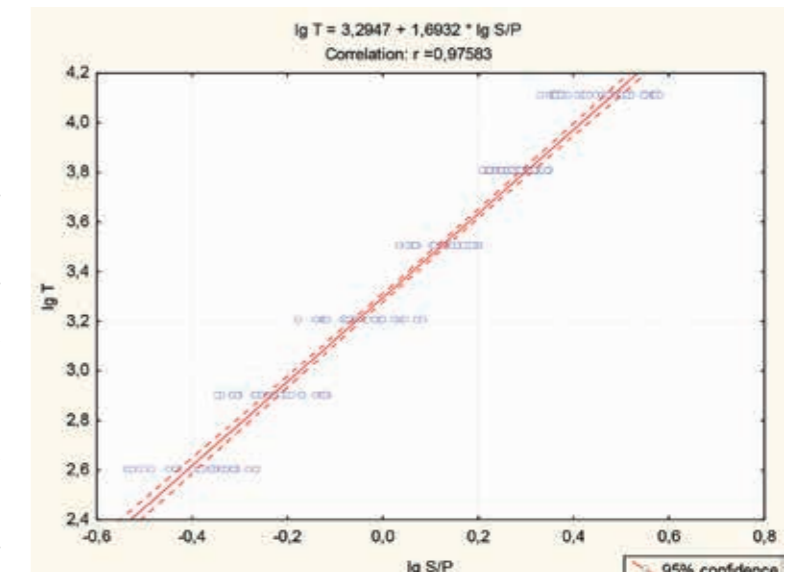


Рис. 2. График зависимости Ig титра, определенного методом последовательных разведений от Ig S/P, измеренного в одном разведении сыворотки 1:400

Уравнение регрессии будет верным при определенных значениях оптической плотности контрольных сывороток. Для расчета данного параметра были проанализированы по 59 значений оптической плотности положительной и отрицательной контрольных сывороток и разница между ними, исследованные в разведении 1:400. Были определены следующие показатели: среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, минимальное и максимальное значение оптических плотностей контрольных сывороток (табл. 2).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток должны быть следующие: для отрицательного контроля не выше 0,2; для положительного контроля не ниже 0,4; оптимальные значения оптической плотности положительного контроля — в диапазоне 0,5–0,6; минимальная разница оптической плотности положительного и отрицательного контролей не меньше 0,3.

Для определения воспроизводимости метода проводили тестирование 4 групп сывороток крови кур в трех повторностях на трех различных планшетах (табл. 3). В норме значение стандартного отклонения не должно превышать 1 log₂, а величина коэффициен-

Таблица 2
Результаты измерения оптической плотности отрицательного (NC_x) и положительного (PC_x) контроля

Показатели	NC _x	PC _x	PC _x - NC _x
Среднее	0,115	0,575	0,467
Станд. откл.	0,017	0,077	0,073
95% доверит. интервал	0,110–0,119	0,555–0,595	0,448–0,486
Минимум	0,09	0,399	0,285
Максимум	0,180	0,710	0,611

Таблица 3
Результаты теста на воспроизводимость

Группа сывороток	Показатель	Среднее значение по одному планшету			Среднее значение по трем планшетам
		1 планшет	2 планшет	3 планшет	
1	Титр антител в ИФА, log ₂	7,742	7,875	7,558	7,725
	Стандартное отклонение, log ₂	0,335	0,147	0,436	0,159
	CV, %	4,328	1,871	5,774	2,060
2	Титр антител в ИФА, log ₂	9,266	9,428	8,999	9,231
	Стандартное отклонение, log ₂	0,525	0,441	0,470	0,216
	CV, %	5,664	4,676	5,228	2,346
3	Титр антител в ИФА, log ₂	10,716	10,608	10,343	10,555
	Стандартное отклонение, log ₂	0,375	0,390	0,347	0,192
	CV, %	3,501	3,681	3,356	1,820
4	Титр антител в ИФА, log ₂	11,493	11,306	11,213	11,337
	Стандартное отклонение, log ₂	0,168	0,172	0,119	0,142
	CV, %	1,463	1,521	1,066	1,257

та вариации должна быть не более 10%. Полученные результаты показали, что среднее значение коэффициента вариации титра антител, определенное для каждой группы, не превышало 6%, а среднее значение стандартного отклонения было не выше 1 log₂.

Для оценки специфичности и чувствительности разработанной тест-системы применяли коммерческий набор для выявления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Специфичность метода определяли при тестировании сывороток от группы SPF-цыплят 3-недельного возраста. Все тест-системы показали при этом 100% специфичность. Результаты данного исследования приведены в табл. 4.

Для подтверждения специфичности разработанной методики были использованы также гетерологичные сыворотки к вирусам инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ), гриппа птиц (ГП), ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного энцефаломиелиита птиц (ИЭП), синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76), реовирусу (РЕО), микоплазмам птиц (Mg и Ms), метапневмовирусу птиц (МПВП), которые показали отрицательный результат при исследовании в ИФА с антигеном ALV.

Разработанная тест-система была протестирована в сравнении с коммерческим набором для выяв-

Таблица 4
Результаты исследования специфичности разработанной тест-системы с помощью коммерческого набора IDEXX

СПФ-цыплята 3-недельного возраста	ВНИИЗЖ	IDEXX
Положительные/исследованные	0/24	0/24
Среднее значение титра антител*	319	319
Минимум–максимум	22–382	0–669

* для тест-системы IDEXX образец считается положительным при значении титра, большем или равном 844.

Таблица 5
Результаты определения чувствительности и специфичности разработанного метода при исследовании сывороток крови кур с птицефабрик

ВНИИЗЖ	IDEXX		Всего
	положительные	отрицательные	
положительные	75	0	75
отрицательные	3	110	113
Всего	78	110	188

Таблица 6
Сравнение результатов исследования сывороток крови кур в ИФА с использованием коммерческого набора IDEXX и тест-системы «ВНИИЗЖ»

Иммунный статус	IDEXX			ВНИИЗЖ		
	полож.	отриц.	всего	полож.	отриц.	всего
Сыворотки от незараженных кур (возраст 40 суток)	2	14	16	2	14	16
Сыворотки крови кур через 14 суток после 1 заражения	4	10	14	4	10	14
Сыворотки крови кур через 28 суток после 1 заражения	9	1	10	9	1	10
Сыворотки крови кур через 14 суток после 2 заражения	9	1	10	10	0	10
Сыворотки крови кур через 21 сутки после 2 заражения	9	1	10	9	1	10
Сыворотки крови кур через 28 суток после 2 заражения	8	0	8	8	0	8
Сыворотки от незараженных кур (возраст 40 суток)	41	27	68	42	26	68

Таблица 7
Результаты определения чувствительности и специфичности разработанного метода при исследовании экспериментальных сывороток крови кур

ВНИИЗЖ	IDEXX		Всего
	положительные	отрицательные	
положительные	41	1	42
отрицательные	0	26	26
Всего	41	27	68

ления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Было параллельно протестировано 188 сывороток крови кур в возрасте 120–330 сут., поступивших с птицефабрик РФ. Результаты представлены в табл. 5. Относительная специфичность тест-системы по отношению к набору IDEXX составила 99,9%, чувствительность — 96%.

Был проведен эксперимент по заражению 40-суточных цыплят-бройлеров штаммом ALV-J/CLB-908U 4 пассажа (титр 4,0 lg ЭД₅₀/см³). Заражение проводили двукратно. Результаты исследования представлены в табл. 6 и 7.

Полученные результаты показали, что в 41 сыворотке крови были обнаружены антитела к ALV при исследовании коммерческим набором IDEXX и разработанной тест-системой. Из 27 негативных при исследовании набором IDEXX сывороток крови одна показала положительный результат в разработанной тест-системе. Исходя из результатов эксперимента, чувствительность тест-системы составила 99,9% а специфичность — 97%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система позволила получить воспроизводимые результаты, показала высокую чувствительность и специфичность в сравнении с коммерческим набором при тестировании проб сывороток крови кур из птицефабрик РФ и после экспериментального заражения штаммом ALV-J/CLB-908U.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лазарева С.П., Мудрак Н.С., Чвала И.А. Получение иммуноспецифических компонентов для диагностики лейкоза птиц подгруппы J // Инновационные процессы в АПК: сб. статей 6-й Междунар. научно-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов. — Москва, 2014. — С. 156–159.
- Плотников В.А. Молекулярно-генетический анализ и биологическая характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации: дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 2014. — 146 с.
- Распространение вируса лейкоза птиц среди птицеводческих хозяйств Российской Федерации / Т.А. Тимофеева [и др.] // Матер. Междунар. юбилейной науч.-практ. конф. «Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве». — С.-Петербург, 2004. — С. 68–69.
- A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens / L.N. Payne [et al.] // J. Gen. Virol. — 1991. — Vol. 72. — P. 801–807.
- Fadly A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review // Avian Pathol. — 2000. — Vol. 29, № 6. — P. 529–535.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
- Payne L.N., Nair V. The long view: 40 years of avian leukosis research // Avian Pathol. — 2012. — Vol. 41, № 1. — P. 1–9.

DEVELOPMENT OF THE IMMUNOENZYME TEST SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST AVIAN LEUKOSIS VIRUS

S.P. Lazareva¹, M.A. Volkova², N.S. Mudrak³, I.A. Chvala⁴, T.V. Zhanova⁵

¹ Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: lazareva@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁴ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ Head of the Graduate School, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: zhanova@arriah.ru

SUMMARY

Test system based on the immunoenzyme method was developed for detection of antibodies to the avian leukosis virus (ALV) when testing sera in a single dilution. The antibody titer was determined basing on S/P ratio calculated for one working serum dilution (1:400). The developed test system demonstrated high specificity and sensitivity in comparison with the foreign commercial kit.

Key words: avian leukosis virus, ELISA, antigen, antibody.

INTRODUCTION

Avian leukosis is widely spread in commercial poultry production. Avian leukosis is caused by avian leukosis viruses belonging to *Retroviridae* family, *Alpharetrovirus* genus. ALV are divided in six antigenic groups: A, B, C, D, E, and J, which in their turn contain many strains. There are data proving possible cross neutralization of ALV-A and ALV-J capsid antigen p27, common for all groups [4]. Economic losses caused by ALV are usually associated with death from secondary infections and neoplastic diseases, as well as production decline including egg production and quality. ALV can cause different neoplastic diseases such as lymphadenosis myeloblastosis, myeloblastosis, glioma, osteopetrosis, haemangioma, etc. Chicken of more than 100 days of age demonstrate clinical signs of the disease [3, 5, 7].

The disease is diagnosed basing on the results of laboratory and pathomorphological tests. Antibodies to ALV are periodically detected in chicken serum samples from eggs and broiler farms of the Russian Federation [2]. The fact is indicative of the virus circulation in commercial poultry population. In the present time no registered vaccine against ALV exists. Due to this fact infection control is performed by means of establishing of the breeding stock with poultry originating from avian leukosis free farms. One of the ways to achieve this result is regular serological

monitoring of the poultry population followed by culling and destruction of diseased birds [7].

Commercial ELISA kits, Zoetis, IDEXX (USA), are used for serological diagnosis of ALV subgroups in the RF. No analogous test systems have been developed. So, development of domestic immunoenzyme test systems is a very important task.

MATERIALS AND METHODS

Virus. Strain ALV-J/CLB-908U, recovered in 2009 from pathological material obtained from poultry farm in Chelyabinsk Oblast [1]. The strain was deposited in the FGBI "ARRIAH" microorganism collection. 3rd passage virus-containing culture fluid, infectivity titre 5,5 Ig EID₅₀/cm³, was used. The virus was cultivated using initially trypsinized chicken embryo fibroblast cell culture.

Antigen. ALV antigen was prepared according to the previously developed method [1]. Commercial kit «Avian leukosis virus antigen test kit» (Synbiotics, USA) was used to determine the type-specific ALV antigen concentration in virus-containing materials according to the manufacturer's instruction.

Electrophoresis. Purified concentrated antigen was studied by means of electrophoresis using 12% polyacrylamide gel [6].

Positive and negative control sera. Hyperimmune serum were prepared according to the previously developed method [1]. Serum from ALV-free broilers was used as negative control.

Indirect ELISA. The antibody titre against ALV was determined by indirect ELISA. The plates (Nunc, MaxiSorp, Denmark) were coated with ALV antigen in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) for 18 hours at 4°C. Then 1% BSA was used for blocking for 1 hour at room temperature using TBR-T buffer containing water N-tris (hydroxymethyl) aminomethane (AppliChem, Germany), sodium chloride, twin20 (ICN Biomedicals, USA). Dilution buffer was used for

dilution of tested and control samples (Synbiotics, USA). TBR-T buffer solution was used for inter-stage washing. Tested and control sera were tested at 1:400 dilution. Immunoperoxidase conjugate (Synbiotics, USA) was used at working dilution for detection of complexes in the dilution buffer. All components were added at the amount of 100 µl and incubated for 30 minutes at 37°C. 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] solution containing hydrogen peroxide was used as a substrate. In 10 minutes the reaction was stopped by adding 1% sodium dodecyl sulphate solution into each cell. The reaction was recorded using spectrophotometer TECAN-Sunrise (TECAN, Austria) at 405 nm wave length. The result analysis was performed using "SINKO-IFA" software (accreditation certificate 2000611338) and Statistica 10.0 (Correlation matrices) (Stat Soft. Inc., USA).

Determination of the test system sensitivity and specificity. At this stage two types of serum panels were tested. The first contained blood serum from chicken at 120-330 days of age from the RF poultry farms. The second one contained sera from experimentally infected chicken. Two groups of 40-day-old chickens were used for this panel preparation. One group of 5 birds was not infected and the other one was inoculated with 4th passage ALV-J/CLB-908U strain cultured in chicken embryo fibroblast cell culture. The virus infecting dose was 4.0 Ig EID₅₀/cm³. In 28 days the chickens were reinfected. Blood serum samples were collected in 14 and 28 days after the first infection and in 14, 21 and 28 days after the second infection. Sera were tested with ELISA using the FGBI "ARRIAH" test system and the commercial kit for detection of antibodies against ALV, IDEXX (USA). The obtained results were used to assess specificity and sensitivity of the developed test system.

RESULTS AND DISCUSSION

Inactivation, purification and concentration of the virus material were performed for ALV preparation. Concentra-

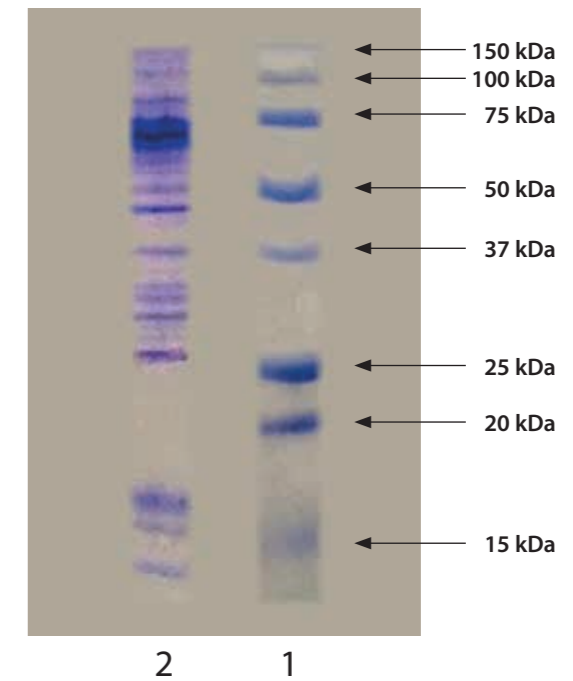


Figure 1. Results of concentrated ALV-J/CLB-908U electrophoresis
1 – protein marker;
2 – purified and concentrated culture ALV-J/CLB-908U.

tion of the prepared ALV antigen was 16000 pg/cm³. Specific antibodies with molecular weight of 85, 63, 48, 37, 30, 27 kDa were detected by electrophoresis of the purified concentrated antigen (fig. 1).

Different dilutions were prepared for detection of optimal working antigen concentration. They were used for coating plates and tests using positive and negative control sera. The data are shown in the table 1.

Basing on the fact that at antibody titre of the hyperimmune serum remained highest the antigen concentration

Table 1
Determination of the optimal working antigen concentration for detection of antibodies against ALV (n=3)

Serum samples	Virus protein concentration, pg/cm ³ / titre of antibodies against ALV using ELISA*		
	80	32	16
Positive control serum to ALV	3200±0	3200±0	800±0
Normal chicken blood serum (negative control)	<100	<100	<100

* antibody titre – reciprocal value of the serum dilution

Table 2
Measuring Optical Density in Negative (NC_x) and Positive Controls (PC_x)

Values	NC _x	PC _x	PC _x - NC _x
Mean	0.115	0.575	0.467
Standard deviation	0.017	0.077	0.073
95% confidence range	0.110–0.119	0.555–0.595	0.448–0.486
Minimum	0.09	0.399	0.285
Maximum	0.180	0.710	0.611

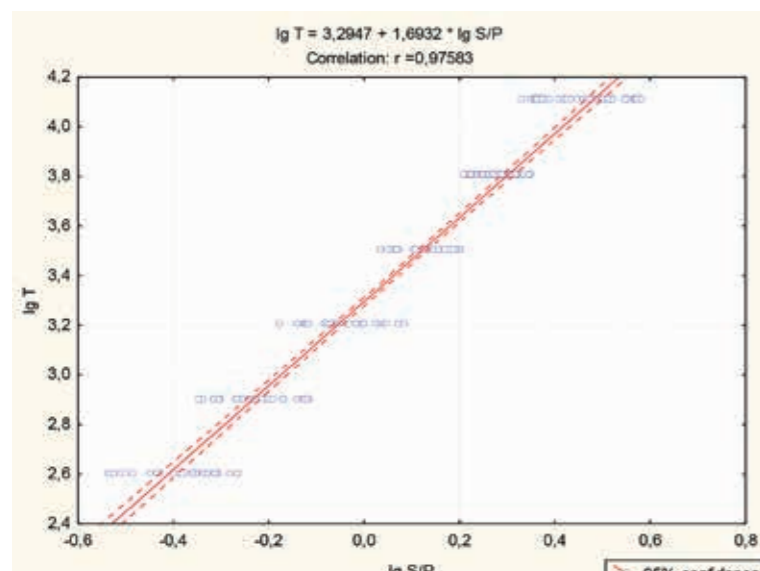


Fig. 2. Dependence between Ig titre determined by serial dilution assay and Ig S/P measured in one serum dilution 1:400

Based on the regression analysis the highest correlation coefficient out of the three 0.96507, 0.94705 and 0.97583 (corresponding to 1:100, 1:200 and 1:400 dilutions) was obtained for sera dilution 1:400 and this dilution was chosen as the working one. A regression line was plotted for this dilution (Fig. 2) to depict the dependence between ELISA IgT, determined by serial dilution assay, and S/P Ig for 1:400 dilution.

Here is the equation of linear regression:

$$\lg T = 3.2947 + 1.6932 \times \lg S/P$$

In order to objectively assess immune response it is required to set a positive-negative threshold (PNT). 183 sera samples from 10-day-old chicks having no antibodies to ALV and from 100-400-day-old chicks demonstrating negative results in IDEXX (USA) kit were tested in triplicate on different days. Reference control sera were taken as positive and negative control. PNT was identified by calculating mean values of S/P negative sera for dilution 1:400 and standard deviation. Mean value of S/P negative sera was 0.1084, standard deviation – 0.0894. Based on statistical analysis the result was considered negative, if $T \leq 1:238$, dubious if $1:238 < T < 1:476$ and positive if $T \geq 1:476$. When quality of the test results was determined by S/P value: negative $S/P \geq 0.3$; positive $S/P \geq 0.45$; dubious results $0.3 < (S/P) < 0.45$.

The regression equation will be correct at the set values of optical density in the control sera. In order to calculate this parameter we analyzed 59 values of optical density in positive and negative control sera and difference between them, tested in dilution 1:400. The following parameters were calculated: mean value, standard deviation, confidence interval, minimum and maximum optical density of control sera (Table 2).

Based on Table 2, the admissible values of optical density in control sera shall be: for negative control not higher than 0.2; for positive control not less than 0.4; optimal value of optical density in positive control shall range between 0.5-0.6; minimum difference between optical density of positive and negative controls - not less than 0.3.

of 32 pg/cm³ the specified working antigen concentration was chosen for further operations.

To determine the formula for calculating the titer of antibodies against ALV during serum tests at a single dilution 180 sera with different titres of antibodies against ALV in 1:100, 1:200, 1:400 dilutions were tested using indirect ELISA. Tested serum titres were previously determined using serial dilution method. S/P values were calculated for each serum dilution basing on the measurement results. Regression lines were plotted on the basis of obtained data using Statistica 10.0 software. They reflect the dependence of antibody Ig titres determined by the serial dilution method on Ig S/P for each serum dilution.

Table 3
Reproducibility Test Results

Sera group	Criterion	Mean value for one plate			Mean value for three plates
		1 plate	2 plate	3 plate	
1	ELISA antibody titre, log ₂	7.742	7.875	7.558	7.725
	Standard deviation, log ₂	0.335	0.147	0.436	0.159
	CV, %	4.328	1.871	5.774	2.060
2	ELISA antibody titre, log ₂	9.266	9.428	8.999	9.231
	Standard deviation, log ₂	0.525	0.441	0.470	0.216
	CV, %	5.664	4.676	5.228	2.346
3	ELISA antibody titre, log ₂	10.716	10.608	10.343	10.555
	Standard deviation, log ₂	0.375	0.390	0.347	0.192
	CV, %	3.501	3.681	3.356	1.820
4	ELISA antibody titre, log ₂	11.493	11.306	11.213	11.337
	Standard deviation, log ₂	0.168	0.172	0.119	0.142
	CV, %	1.463	1.521	1.066	1.257

Table 4
Results of Specificity Test for the Developed Test System Using Commercial IDEXX Kit

SPF 3-week-old chicks	ARRIAH	IDEXX
Positive/tested	0/24	0/24
Mean antibody titre *	319	319
Minimum-maximum	22-382	0-669

*for IDEXX test-system sample is considered positive, if titre is ≥ 844 .

In order to determine test reproducibility we tested 4 groups of sera from chickens in triplicate on three different plates (Table 3). Normal standard deviation shall not exceed 1 log₂ and variation coefficient shall not be more than 10%. The obtained results demonstrated that mean variation coefficient of antibody titre determined for each group did not exceed 6% and the mean standard deviation did not exceed 1 log₂.

In order to assess specificity and sensitivity of the developed test system we used IDEXX commercial kit (USA) for detection of antibodies to avian leucosis. Specificity was determined when we tested sera from SPF 3-week-old chickens. All the tests systems demonstrated 100% specificity. Corresponding test results are given in Table 4.

In order to confirm specificity of the developed method we used heterologous sera to the viruses of the following diseases: infectious bronchitis (IBV), infectious bursal disease (IBD), infectious laryngotracheitis (IL), avian influenza (AI), Newcastle disease (ND), infectious avian encephalomyelitis (IAE), egg drop syndrome (EDS-76),

reovirus, avian mycoplasma (Mg and Ms), avian metapneumovirus (aMPV) and they gave negative results in ELISA with ALV antigen.

The developed test-system was tested in comparison with IDEXX (USA) commercial kit for detection of antibodies to avian leucosis virus. We simultaneously tested 188 sera from 120-330-day-old chicks from Russian poultry establishments. Corresponding results are given in Table 5. Relative specificity of the test-system in comparison with IDEXX kit was 99.9% and sensitivity -96%.

We experimentally infected 40-day-old broilers with ALV-J/CLB-908U strain of the 4th passage (titre 4.0 Ig EID₅₀/cm³). The broiler chicks were inoculated twice. Research results are given in Table 6 and 7.

The obtained results revealed antibodies to ALV in 41 sera samples when tested in IDEXX commercial kit and the developed test system. One serum out of 27 negative sera samples tested in IDEXX turned out to be positive in the developed test system. Based on the experiment results sensitivity of the test system was 99.9%, and specificity – 97%.

Table 5
Results of Sensitivity and Specificity Tests for the Developed Method Used for Chicken Sera from Poultry Establishments

ARRIAH	IDEXX		Total
	Positive	Negative	
Positive	75	0	75
Negative	3	110	113
Total	78	110	188

Table 6
Comparison of test results obtained for chicken sera in indirect ELISA using IDEXX commercial kits and ARRIAH test system

Immune status	«IDEXX»			ARRIAH		
	positive	neg	total	positive	neg	total
Sera from non-infected chickens (40-day-old chicks)	2	14	16	2	14	16
Sera samples from chickens on day 14 post 1 st infection	4	10	14	4	10	14
Sera samples from chickens on day 28 post 1 st infection	9	1	10	9	1	10
Sera samples from chickens on day 14 post 2 nd infection	9	1	10	10	0	10
Sera samples from chickens on day 21 post 2 nd infection	9	1	10	9	1	10
Sera samples from chickens on day 28 post 2 nd infection	8	0	8	8	0	8
Sera samples from non-infected chickens (40-day-old chicks)	41	27	68	42	26	68

Table 7
Results of Sensitivity and Specificity Tests for the Developed Method Used for Experimental Chicken Sera

ARRIAH	IDEXX		Total
	Positive	Negative	
Positive	41	1	42
Negative	0	26	26
Total	41	27	68

CONCLUSION

The developed test system made it possible to get reproducible results, demonstrated high sensitivity and specificity in comparison with the commercial kit both when testing chicken sera from the RF poultry establishments and after experimental infection with ALV-J/CLB-908U strain.

REFERENCES

- Lazareva S.P., Mudrak N.S., Chvala I.A. Development of immunospecific components for diagnosis of subgroup J avian leucosis // Innovations in Agro-industrial complex: Collection of Papers of the 6th International Research Conference of Teachers, Young Scientists, Post-Graduate Students and Students. – Moscow, 2014. – P. 156–159.
- Plotnikov V.A. Molecular and genetic analysis and biological characteristics of avian leucosis virus field isolates circulating in the Russian Federation: PhD thesis, Candidate of Science (Biology). – Moscow, 2014, -146 p.

- Spread of ALV on poultry farms of the Russian Federation/ T.A. Timofeyeva [et al.] // Proceedings of the International Jubilee Scientific Conference "New Trends in Epizootology, Diagnosis and Prevention of Infectious and Non-Infectious Avian Diseases in Poultry Industry" – St. Petersburg, 2004, P. 68–69.
- A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens / L.N. Payne [et al.] // J. Gen. Virol. – 1991. – Vol. 72. – P. 801–807.
- Fadly A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29, № 6. – P. 529–535.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Payne L.N., Nair V. The long view: 40 years of avian leukosis research // Avian Pathol. – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 1–9.



ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ

Вакцину для профилактики болезни Марека «Маривак 1+3»

В результате проведенных научно-исследовательских работ было оптимально подобрано и обосновано соотношение штаммов в препарате. Изучены и доказаны иммунологические и протективные свойства вакцины, обусловленные синергическим действием вирусов, безопасность для окружающей среды и человека.

Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является отечественным аналогом зарубежных вакцин против болезни Марека из 1 и 3 серотипов вируса, содержащим новую комбинацию известных штаммов.

На сегодняшний день проведен полный комплекс доклинических исследований и клинических испытаний вакцины «Маривак 1+3». На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является безвредным препаратом, обладает высокой иммуногенной активностью против высоковирулентных (vv) и высоковирулентных плюс (vv+) штаммов вируса БМ и может успешно использоваться в ветеринарной практике для специфической профилактики БМ.

пользоваться в ветеринарной практике для специфической профилактики БМ. Однократная вакцинация способствует формированию напряженного иммунитета, который сохраняется на протяжении всей жизни привитой птицы и предохраняет от болезни Марека. Вакцина стабильна на протяжении 24 месяцев при соблюдении требований к хранению. Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» зарегистрирована и разрешена к применению в Российской Федерации.

Справка

Болезнь Марека (БМ) — высококонтагиозное, лимфопролиферативное, злокачественное вирусное заболевание птиц. БМ характеризуется образованием единичных и множественных опухолей во внутренних органах, коже, мышцах, а также изменениями центральной и периферической нервной системы. Вирус болезни Марека (ВБМ) повреждает иммунокомпетентные органы (селезенку, тимус, клоакальную сумку) и обладает, таким образом, иммунодепрессивной активностью, что приводит к снижению общей резистентности птиц и повышению их чувствительности к другим болезням. Важным средством предупреждения БМ и снижения потерь от заболевания является вакцинопрофилактика. Для специфической профилактики используют вакцины трех типов: из аттенуированных штаммов ВБМ (серотип 1), из природноослабленного непатогенного ВБМ (серотип 2) и штаммов вируса герпеса индеек (серотип 3).

УДК 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА И ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ИЗОЛЯТОМ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПА В

М.А. Волкова¹, П.С. Ярославцева², В.Ю. Сосипаторова³, Т.И. Ерошина⁴, И.А. Чвала⁵

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

² младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

⁴ ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Экспериментальное заражение 7-суточных цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа В вызывало развитие слабо выраженных признаков поражения респираторной системы и опухание инфраорбитальных синусов через 5–15 суток после инфицирования. Наблюдалось изменение в тканях трахеи, носовых ходов и первичных лимфоидных органов. Наличие генома метапневмовируса птиц установлено методом ОТ-ПЦР-РВ в органах верхнего отдела респираторного тракта, инфраорбитальных синусах и гардировой железе в период 2–12 суток после заражения.

Иммунный ответ характеризовался образованием гуморальных и локальных антител через 7–21 сутки после инфицирования. Через 3 суток после заражения регистрировали увеличение процента CD8a+ T-клеточной субпопуляции в крови и селезенке инфицированных цыплят.

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, клеточный и гуморальный иммунитет, патогенез.

UDC 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

STUDIES OF PATHOGENESIS AND IMMUNE RESPONSE AT EXPERIMENTAL INFECTION OF BROILER CHICKS WITH AVIAN METAPNEUMOVIRUS SUBTYPE B

M.A. Volkova¹, P.S. Yaroslavtseva², V.Yu. Sosipatorova³, T.I. Eroshina⁴, I.A. Chvala⁵

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

² Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

⁴ Leading Technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁵ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

Experimental infection of 7-day-old chicks with the isolate of avian metapneumovirus Subtype B induced mild signs of respiratory infection and swelled infraorbital sinuses in 5–15 days post infection. Lesions in tissues of trachea, nasal passages and primary lymphoid organs were reported. Using real-time RT-PCR avian metapneumovirus genome was detected in the upper part of the respiratory tract, infraorbital sinuses and Harderian gland within 2–12 days post infection.

The immune response was characterized by formation of humoral and local antibodies in 7–21 days post infection. In 3 days post infection increased percentage of CD8a+ T-cell subpopulation was reported in blood and spleen of the infected chicks.

Key words: avian metapneumovirus, cell-mediated and antibody-mediated immunity, pathogenesis.