



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/56983 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017108607, 15.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.03.2017

Дата регистрации:
13.08.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.03.2017

(45) Опубликовано: 13.08.2018 Бюл. № 23

Адрес для переписки:
109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
ФГБНУ ВИЭВ

(72) Автор(ы):

Завьялова Елена Александровна (RU),
Дрошнев Алексей Евгеньевич (RU),
Гулюкин Михаил Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.
Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015/051456 A1, 16.04.2015. EP
2 489 735 A9, 22.08.2012. COLLET B., Innate
immune responses of salmonid fish to viral
infections.Dev Comp Immunol. 2014
Apr;43(2):160-73. doi: 10.1016/j.dci.2013.08.017.
Epub 2013 Aug 24. FALK K., et al.,
Characterization and applications of a
monoclonal antibody against infectious salmon
anaemia virus.Dis Aquat (см. прод.)

(54) Способ серологической диагностики вирусных болезней лососевых рыб методом иммуноферментного анализа и диагностический набор для осуществления способа

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к ветеринарии и касается способа серологической диагностики вирусных болезней лососевых рыб, включающего взаимодействие специфических иммуноглобулинов с гомологичными антигенами и антителами, меченными ферментом, добавление субстратной смеси, инкубацию 25-30 минут и учет результатов реакции по интенсивности окраски образовавшегося комплекса. В реакции используют планшет с предварительно сенсibilизированными иммуноглобулинами к вирусам инфекционного некроза поджелудочной

железы (IPN), инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHN), вирусной геморрагической септицемии (VHS). Группа изобретений также касается диагностического набора для осуществления указанного способа диагностики вирусных болезней лососевых рыб. Группа изобретений обеспечивает определение в образцах биологического материала наличия возбудителей вирусных болезней лососевых рыб в течение трех часов с достоверностью 98%. 2 н.п. ф-лы, 2 пр.

(56) (продолжение):

Organ. 1998 Oct 8;34(2):77-85.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/56983 (2006.01)

(21)(22) Application: **2017108607, 15.03.2017**

(24) Effective date for property rights:
15.03.2017

Registration date:
13.08.2018

Priority:

(22) Date of filing: **15.03.2017**

(45) Date of publication: **13.08.2018** Bull. № 23

Mail address:

**109428, Moskva, Ryazanskij pr-kt, 24, korp. 1,
FGBNU VIEV**

(72) Inventor(s):

**Zavalova Elena Aleksandrovna (RU),
Droshnev Aleksej Evgenevich (RU),
Gulyukin Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij
nauchno-issledovatel'skij institut
eksperimentalnoj veterinarii imeni YA.R.
Kovalenko (FGBNU VIEV) (RU)**

(54) **METHOD FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES OF SALMONIDS BY ENZYME IMMUNOASSAY AND DIAGNOSTIC SET FOR IMPLEMENTING METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: group of inventions relates to veterinary science and concerns a method for serological diagnosis of viral diseases of salmonids, including the interaction of specific immunoglobulins with homologous antigens and antibodies labeled with enzyme, the addition of a substrate mixture, incubation for 25–30 minutes and taking into account the results of the reaction according to the color intensity of the formed complex. Plate with pre-sensitized immunoglobulins to infectious pancreatic necrosis (IPN)

viruses, infectious hematopoietic tissue necrosis (IHN) viruses, viral hemorrhagic septicemia (VHS) viruses is used in the reaction. Group of inventions also concerns a diagnostic kit for implementing said method for serological diagnosis of viral diseases of salmonids.

EFFECT: group of inventions provides the detection of the presence of pathogens of virus diseases of salmonids in the samples of biological material for three hours with a certainty of 98 %.

2 cl, 2 ex

Предлагаемое изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии, вирусологии и может быть использовано для выявления антигенов возбудителей вирусных болезней рыб в биологическом материале, как для диагностики, так и для научных исследований методом иммуноферментного анализа.

5 Аквакультура в России носит комплексный многоотраслевой характер, за счет использования крупнейшего в мире фонда внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей. При этом одна из существенных проблем, сдерживающих развитие отечественной акваиндустрии - вирусные болезни выращиваемых гидробионтов, такие как: инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых {Infectious pancreatic necrosis, IPN), инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых {Infectious hematopoietic necrosis, IHN), вирусная геморрагическая септицемия {Viral haemorrhagic septicemia, VHS).

15 Сейчас диагностика вирусных болезней рыб в лаборатории требует культивирования вируса на клетках рыб, что занимает достаточно длительное время и выполняется только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории. [Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб; Инструкция о мероприятиях по профилактике и борьбе с инфекционным некрозом гемопоэтической ткани лососевых рыб; Инструкция о мероприятиях по борьбе с вирусной 20 геморрагической септицемией рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, с. 87-113]. Эти методы долгие, а результат анализа напрямую зависит от таких факторов, как опыт и компетенция специалиста, проводящего работу, физиологического состояния и биологических особенностей используемой линии клеток, поэтому, применение современных методов 25 будет, несомненно, востребовано при диагностике.

Известен способ серологической диагностики вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа, преимущественно рота-, коронавирусного энтеритов, вирусной диареи крупного рогатого скота, включающий взаимодействие антигенов с антителами, с антивидовыми 30 антителами, мечеными пероксидазой хрена, добавление субстратной смеси и учет результатов по интенсивности окраски образовавшегося комплекса, характеризующийся тем, что в реакции используют планшеты с предварительно сорбированными на них антигенами. [Патент №2472162]

Единственным известным набором для проведения серологической диагностики вирусных болезней рыб является ТФ ИФА, который содержит специфический 35 герпесвирусный антиген для сенсibilизации планшет, специфическую герпесвирусную и нормальную сыворотки в качестве положительного и отрицательного контроля, антивидовой пероксидазный конъюгат к иммуноглобулину сибирского осетра для выявления комплекса антиген-антитело, используемые для выявления 40 противогерпетических антител в сыворотке осетровых рыб, разработанный во ВНИИВВиМ в 2012 году, который предлагается использовать в научно-исследовательских и ветеринарных лабораториях для ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра (SbSHV). Однако, поиск антител - это ретроспективная диагностика, которая актуальна только при подозрении на 45 герпесвирусную инфекцию осетровых рыб в межэпизоотический период, и непригодна для выявления антигенов возбудителей за счет длительного времени образования антител в живом организме. [Shchelkunov I. et. al. 2012]

При диагностике вирусных инфекций лососевых рыб важна оперативная информация,

на ранних этапах развития заболевания и для быстрого подтверждения диагноза во время эпизоотии, поэтому необходимо анализировать наличие в организме рыб антигена возбудителя для своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий. Сведения по использованию комбинированного иммуноферментного анализа и существованию диагностических наборов для выявления вирусных болезней рыб в аналогичном формате в современной литературе отсутствуют.

В задачу исследований входило - разработать чувствительный и эффективный способ серодиагностики наиболее распространенных вирусных болезней лососевых рыб: инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN), инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHN), вирусной геморрагической септицемии (VHS) и сократить время на постановку диагноза за счет одновременного исследования образцов биоматериала на три заболевания.

Сущность предполагаемого изобретения состоит в использовании диагностического набора, включающего все необходимые компоненты для проведения иммуноферментного анализа, позволяющего выявлять антигены IPN, IHN и VHS одновременно в образцах биологического материала от рыб на ранней стадии развития болезни с высокой специфичностью и чувствительностью. Принцип способа заключается в следующем: специфические иммуноглобулины к вирусам-возбудителям IPN, IHN и VHS, иммобилизованные на поверхности лунок одного полистиролового микропланшета, связываются с гомологичными антигенами, если они присутствуют в исследуемом материале, образуя комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется путем взаимодействия с иммуноферментным конъюгатом, фермент которого, после добавления субстрата, вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование окрашенного продукта. Интенсивность окраски в лунке микропланшета пропорциональна содержанию специфического антигена в испытуемом образце, результаты учитывают по общепринятой формуле.

Диагностический набор для выявления вирусов-возбудителей IPN, IHN и VHS содержит: планшет полистироловый 96-луночный, сенсibilизированный иммуноглобулинами к IPN, IHN и VHS; положительный контрольный образец IPN, инактивированный (IPN K⁺); положительный контрольный образец IHN, инактивированный (IHN K⁺); положительный контрольный образец VHS, инактивированный (VHS K⁺); отрицательный контрольный образец, инактивированный (K⁻); конъюгат 1, представляющий собой анти-IPN антитела, меченные пероксидазой хрена; конъюгат 2, представляющий собой анти-IHN антитела, меченные пероксидазой хрена; конъюгат 3, представляющий собой анти-VHS антитела, меченные пероксидазой хрена; раствор для разведения конъюгата (РК); промыватель - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином-80 (ФСБ-Тх25); субстрат - раствор тетраметилбензидина (ТМБ); стоп-реагент; ванночка для реагентов. Компоненты набора расфасованы в пластиковые флаконы разного объема с завинчивающимися крышками и упакованы в коробки.

ПРИМЕР 1.

1. Подготовка исследуемого материала

Для обнаружения антигенов IPN, IHN и VHS в качестве испытуемого используют биопсийный материал внутренних органов (почка, печень, селезенка), экссудат и/или вируссодержащую надосадочную жидкость культур клеток. Для получения 10%-ной суспензии биоматериал гомогенизируют до получения однородной массы на ФСБ (рН7,2-7,4). Полученную суспензию сливают в стерильную посуду и используют для

исследования.

2. Подготовка компонентов для постановки реакции

Для промывания планшетов, при постановке реакции, готовят содержащий твин-80 фосфатно-солевой буфер: размешивают содержимое флакона с ФСБ-Т*25, при выпадении в концентрате осадка прогревают его до полного растворения солей, и разводят дистиллированной водой до 700 мл. Хранят при 4°C до 5 суток.

Растворы конъюгатов 1, 2, 3 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием, к 0,05 мл концентрированного раствора добавляют 15 мл раствора для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешивают.

Раствор ТМБ готов к применению, непосредственно перед использованием отбирают в пластиковую ванночку 12 мл. Остатки раствора ТМБ из ванночки нельзя сливать во флакон с исходным раствором ТМБ. Хранят при 4°C в течение всего срока годности набора.

3. Постановка реакции

Перед началом анализа лунки планшета промывают один раз промывочным раствором. В каждую лунку вносят по 300 мкл раствора, через пять минут после заполнения лунок раствор аккуратно удаляют. Остатки влаги из лунок тщательно удаляют, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В первые лунки рядов планшета сенсibilизированных иммуноглобулинами к IPN, ИHN и VHS вносят по 100 мкл специфических положительных антигенов (IPN K⁺, ИHN K⁺, VHS K⁺). Во вторые лунки каждого ряда вносят 100 мкл отрицательного антигена. Во все остальные лунки по 100 мкл исследуемых образцов (желательно делать 2-3 повторности). Лунки на планшете сенсibilизированы следующим образом: иммуноглобулинами к IPN (1, 4, 7, 10 ряды), ИHN (2, 5, 8, 11 ряды), VHS (3, 6, 9, 12 ряды). Внесение материала в плашку сопровождают тщательным перемешиванием пипетированием в течение 5-7 секунд. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут.

Растворы конъюгатов №1,2,3 в рабочем разведении готовят за пять-десять минут до окончания инкубации.

По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т от несвязавшихся антигенов, после чего удаляют влагу постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В лунки рядов 1, 4, 7, 10 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 1 (IPN) в рабочем разведении. В лунки рядов 2, 5, 8, 11 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 2 (ИHN) в рабочем разведении. В лунки рядов 3,6,9,12 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 3 (VHS) в рабочем разведении. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут. По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т после чего удаляют влагу постукиванием.

Во все использованные лунки планшета вносят по 100 мкл раствора ТМБ. Для внесения раствора ТМБ используют пластиковую ванночку, входящую в состав набора. Планшет инкубируют при комнатной температуре, в защищенном от света месте, 25-30 минут.

Реакцию заканчивают добавлением во все лунки 100 мкл стоп-реагента.

4. Учет результатов

Результаты реакции учитывают через 2-3 минуты после добавления стоп-реагента, проводя измерение оптической плотности (ОП) в каждой лунке на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм или визуально. Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

- значение ОП в лунке с отрицательным контролем не более 0,30 о.е.
 - значение ОП в лунке с положительным контролем не менее 0,62 о.е. Реакцию оценивают по формуле и выражают в виде процента реактивности:

$$\text{процент реактивности (\%)} = (\text{ОП} - \text{ОПК}^-) / (\text{ОПК}^+ - \text{ОПК}^-) \times 100\%,$$

где ОП - оптическая плотность образца, ОПК⁺ - оптическая плотность положительного контроля, ОПК⁻ - оптическая плотность отрицательного контроля.

Границы пороговых значений: при величине % >22% реакция считается положительной, значение % <10% - реакция отрицательная, а диапазон % от 10% до 22% - сомнительные результаты реакции.

ПРИМЕР 2.

Подготовку исследуемого материала, подготовку компонентов для постановки реакции, постановку реакции осуществляют аналогично описанному в примере 1, но инкубацию планшета после внесения положительных, отрицательных и исследуемых образцов проводят в течение 4-6 часов при температуре 4°C (в холодильнике), после чего работу и учет результатов продолжают по стандартной схеме. Получают результаты аналогичные таковым в примере 1.

Предложенный способ и набор позволяют в течение трех часов с достоверностью 98% определять в образцах биологического материала наличие возбудителей вирусных болезней лососевых рыб. Использование «холодной инкубации» (в течение 4-6 часов при температуре 4°C, в холодильнике) позволяет получать достоверные, аналогичные результаты в течение одного дня, с перерывом для оператора в ходе работы, что по разным причинам также может быть удобно. Лунки на планшете сенсублизованы следующим образом: иммуноглобулинами к IPN (1, 4, 7, 10 ряды), IHN (2, 5, 8, 11 ряды), VHS (3, 6, 9, 12 ряды). В один планшет можно разместить от 2-х образцов биоматериала в трех повторностях до 24 образцов без повторений. Планшет может быть использован весь одновременно или в 4 приема, для чего использованные ранее ряды высушивают промывателем и заклеивают пленкой, или просто помечают маркером.

Диагностический набор разработан и апробирован с положительным результатом в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко в период октябрь 2015 - декабрь 2016 года.

Предложенный способ найдет применение в системе мониторинга, проводимого органами ветеринарной службы страны, что позволит контролировать распространение вирусных болезней рыб и сохранять здоровье культивируемых рыб, а также в научных исследованиях для тестирования существующих и новых клеточных линий, в селекционно-племенной работе, для получения информации о закономерностях циркуляции вирусов-возбудителей IPN, IHN и VHS в аквакультуре России и диких популяциях рыб.

Источники информации

1. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб// Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, с. 96-104.

2. Инструкция о мероприятиях по профилактике и борьбе с инфекционным некрозом гемопоэтической ткани лососевых рыб// Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, с. 87-95.

3. Инструкция о мероприятиях по борьбе с вирусной геморрагической септициемией рыб// Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, с. 105-113.

4. Патент №2472162 Способ серологической диагностики вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа.

5. Shchelkunov I. Further virus characterization, diagnostics and prevention of Siberian sturgeon herpesvirus disease / Igor Shchelkunov, Andor Doszpoly, Tatiana Shchelkunova, Inna Prokaeva, Fatima Kalabekova, Ismail Kalabekov, Dmitry Kurenkov // USA-Russia Bilateral Workshop On Aquaculture and FishHealth USGS Western Fisheries Research Center, Seattle, WA, USA October, 2012, pp. 1-5.

(57) Формула изобретения

10 1. Способ серологической диагностики вирусных болезней лососевых рыб, включающий взаимодействие специфических иммуноглобулинов с гомологичными антигенами и антителами, мечеными ферментом, добавление субстратной смеси, инкубацию 25-30 мин и учет результатов реакции по интенсивности окраски образовавшегося комплекса, отличающийся тем, что в реакции используют планшет с предварительно сенсibilизированными иммуноглобулинами к вирусам инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN), инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHN), вирусной геморрагической септицемии (VHS), который после внесения исследуемых проб по 0,10-0,11 мл инкубируют 60-65 мин при 21-25°C, отмывают, далее вносят конъюгаты 1 (IPN), 2 (IHN) и 3 (VHS), представляющие собой противовирусные антитела, меченные пероксидазой хрена, для одновременного выявления возбудителей трех заболеваний, далее инкубируют 60 мин при 21-25°C и отмывают перед добавлением субстратной смеси и последней инкубацией 25-30 мин.

25 2. Диагностический набор для осуществления способа диагностики вирусных болезней лососевых рыб, включающий: раствор для разведения конъюгатов; концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином-80 (ФСБ-Т×25) для промывания планшетов; субстрат - раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); стоп-реагент; ванночку для реагентов; отличающийся тем, что содержит следующие компоненты: планшет, сенсibilизированный иммуноглобулинами к IPN (1, 4, 7, 10 ряды), IHN (2, 5, 8, 11 ряды), VHS (3, 6, 9, 12 ряды); положительный контрольный образец IPN, инактивированный (IPN K+); положительный контрольный образец IHN, инактивированный (IHN K+); положительный контрольный образец VHS, инактивированный (VHS K+); отрицательный контрольный образец, инактивированный (K-); конъюгаты 1 (IPN), 2 (IHN) и 3 (VHS), представляющие собой противовирусные антитела, меченные пероксидазой хрена.

35

40

45