

На правах рукописи



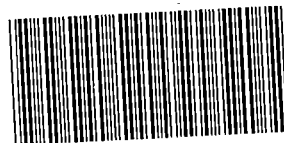
**Прокаева Инна Борисовна**

**Гуморальный иммунный ответ осетровых рыб на возбудитель  
герпесвирусной болезни**

03.02.02 Вирусология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



**005051876**

18 АПР 2013

Покров – 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии).

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
(ФГБУ НИИЭМ им. Гамалеи  
Минздрава РФ)

**Новиков Борис Валентинович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор  
(ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

**Балышева Вера Ивановна**

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Пыльников Владимир Александрович**

**Ведущая организация:**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии), г. Москва.

Защита диссертации состоится **«16» «мая» 2013 г. в «9<sup>30</sup>» часов** на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии по адресу: 601120, Владимирская область, г. Покров, Тел./факс: (09243) 6 21 25.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Автореферат разослан **«26» марта 2013 г.** и размещен на официальном сайте ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии [www.vniivvim.ru](http://www.vniivvim.ru) и сайте ВАК России [www.vak2.ed.gov.ru](http://www.vak2.ed.gov.ru)

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии,  
кандидат биологических наук



Е.А. Балашова

## 1 Общая характеристика работы

### 1.1 Актуальность работы

Развитию осетроводства в России традиционно уделялось повышенное внимание. В значительной мере это определялось тем, что до недавнего времени наша страна обладала примерно 80% мировых запасов осетровых рыб. В последние 20-30 лет объемы промышленного выращивания осетровых значительно возросли во всем мире. Это обусловлено активизацией мер по восстановлению подорванных природных запасов осетровых - с одной стороны и высокой экономической выгодой коммерческого осетроводства - с другой. Интенсификация осетроводства способствовала появлению и распространению болезней этих видов рыб, наибольший ущерб из которых наносят вирусные болезни.

От аборигенных видов осетровых рыб выделено около 10 вирусов разных семейств, из которых наиболее опасными являются четыре: аденовирус, иридовирус и герпесвирусы белого осетра (*Acipenser transmontanus*) двух типов (AcіHV-1 и AcіHV-2) [11]. В Европе в 1998 г. из хозяйств Бельгии у русского осетра (*A. güldenstadti*) электрономикроскопически выявлен иридовирус [8], а в 2003 г. герпесвирус 2-го типа (AcіHV-2) изолирован в Италии от завезенного из США белого осетра [11]. Другой информации о выявлении за рубежом вирусов осетровых рыб нами не обнаружено.

Весной 2006 г. при вспышке заболевания среди сеголетков сибирского осетра (*Acipenser baeri*), протекавшего с признаками некро-геморрагического синдрома и 100%-ной гибелью рыб на Конаковском заводе товарного осетроводства в Тверской области, от погибающих рыб был изолирован герпесвирус и доказана его этиологическая роль в заболевании [4, 6]. Данная болезнь является первой вирусной болезнью осетровых рыб, диагностированной в России. Изучены особенности патогенеза болезни и свойства вируса-возбудителя, вирулентный штамм SK1/04.06 депонирован в музее микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии [4, 6]. На сегодня герпесвирусная болезнь осетровых установлена еще в 9 хозяйствах РФ. Вероятно, она широко распространена в России, но в целом эпизоотическая ситуация остается невыясненной.

Лабораторией Здоровья гидробионтов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии разработаны Методические рекомендации по диагностике герпесвирусной болезни сибирского осетра, однако, предлагаемые в них методы традиционной диагностики

трудоемки и продолжительны, что снижает их практическую ценность и ограничивает срок диагностических исследований 1-2 месяцами в году, в течение которых вирус удастся выделить от рыб [3, 4].

Для обследования хозяйств и определения специфического иммунного статуса рыб при исследовании большого количества проб остро необходимы методы массовой диагностики на основе твердофазного иммуноферментного анализа. Их использование позволило бы: 1) более равномерно распределить диагностическую нагрузку, распространив ее на пока еще «мертвый» в этом отношении летний сезон; 2) рассчитывать на обнаружение инфекции в тех случаях, когда другие методы диагностики, включая полимеразную цепную реакцию, бессильны.

К сожалению, несмотря на широкое использование методов серодиагностики вирусных болезней рыб в экспериментальной работе, их использование в ветеринарной практике до сих пор не узаконено. Основным препятствием этому является недостаточная изученность вирусов-возбудителей заболеваний и иммунного ответа на них рыб.

Работы по изучению иммуноглобулинов и гуморального иммунного ответа осетровых рыб при вирусных инфекциях немногочисленны и выполнены за рубежом [9, 13, 15]. Таким образом, появление в последние годы работ в данной области свидетельствуют об актуальности и перспективности проведения аналогичных исследований на модели герпесвирусной болезни у сибирского осетра.

### **1.2 Степень разработанности проблемы**

Изучению герпесвирусной болезни осетровых посвящены работы И. С. Щелкунова [6, 7], в которых представлены результаты изучения некоторых морфобиологических свойств герпесвируса и частично раскрыты механизмы развития заболевания. В работе А.И. Щелкунова [4] показана принципиальная возможность воспроизведения инфекции *in vivo* в лабораторных условиях и предложены перевиваемые линии клеток для выделения и культивирования вируса. Однако остаются неизученными вопросы механизма развития гуморального иммунного ответа осетровых рыб на герпесвирусную инфекцию, кинетики синтеза антител у переболевших и иммунизированных рыб, не разработаны методы серодиагностики данной болезни, не изучены особенности течения герпесвирусной инфекции, вызываемой герпесвирусом у близкородственных видов осетровых рыб – стерляди и гибрида СБС.

### **1.3 Цель и задачи исследований**

Целью данной работы является изучение специфического гуморального иммунного ответа осетровых рыб при герпесвирусной болезни и оптимизация методов его выявления.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить особенности течения герпесвирусной болезни у осетровых, родственных сибирскому осетру;
- изучить динамику уровня вируснейтрализующих антител у осетровых рыб при герпесвирусной болезни;
- выделить, очистить и охарактеризовать иммуноглобулины сибирского осетра, получить на них кроличий антивидовой иммуноглобулин;
- на основе ТФ ИФА разработать способ выявления антител, специфичных к антигенам герпесвируса и апробировать его для выявления противогерпетических антител в сыворотках крови рыб.

### **1.4 Научная новизна результатов исследований**

Впервые изучены особенности протекания инфекции, вызванной герпесвирусом сибирского осетра, у родственных видов осетровых – стерляди и гибрида СБС и их гуморального иммунного ответа на герпесвирус сибирского осетра.

Установлено, что противогерпетические сывороточные антитела сибирского осетра представлены, по крайней мере, двумя изоформами, отличающимися молекулярной массой, но родственными иммунохимически.

Установлено, что иммуноглобулины сибирского осетра иммунохимически родственны к близкородственным видам – гибридам: белуга х ленский осетр, бестер, СБС и стерляди.

Установлено, что взаимосвязь результатов обнаружения противогерпетических антител методами непрямого ТФ ИФА и РН характеризуется линейной зависимостью с коэффициентом корреляции 0,92 ( $p < 0,0001$ ).

### **1.5 Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработан высокочувствительный метод ТФ ИФА для выявления антител к герпесвирусу сибирского осетра, основанный на взаимодействии антигена герпесвируса сибирского осетра (штамм SK1/0406), адсорбированного на поверхности полистиролового планшета, с антителами в сыворотках крови осетровых рыб с последу-

ющим выявлением образовавшегося на твердой фазе специфического комплекса с помощью кроличьих антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена, активность которой выявляется хромогенным субстратом.

Разработаны «Методические положения по выявлению антител к герпесвирусу сибирского осетра (SbSHV) в сыворотках крови осетровых рыб непрямым методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА)», которые утверждены секретарем Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым 12 декабря 2012 г.

### **1.6 Апробация работы**

Результаты исследований, выполненных по теме диссертационной работы, представлены, заслушаны и обсуждены на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (Покров 2009-2011 гг.), Международной научно-практической конференции (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, Покров, 2009 г.), Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок - Москва, 2011 г.), Международной научно-практической конференции (УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, 2012 г.; ГНУ ВНИТиБП Россельхозакадемии, Щелково, 2012 г.).

### **1.7 Соответствие содержания диссертации паспорту специальности, по которой она рекомендуется к защите**

В соответствии с формулой специальности 03.02.02 Вирусология, занимающейся исследованием вирусов, механизмов их размножения, а также проблемами противовирусного иммунитета, патогенности, инфекционности вирусов, разработкой мер и средств предупреждения и диагностики вызываемых вирусами заболеваний, включающей область исследований: изучение природы и происхождения вирусов как автономных генетических структур, способных функционировать и репродуцироваться в восприимчивых к ним клетках животных; проблемы патогенности вирусов, цитопатологии инфицированных вирусом клеток и тканей, изучение патогенеза вирусных инфекций, путей проникновения вируса в организм и распространения вирусов в организме; изучение противовирусного иммунитета, изучение гуморального иммунитета; проблемы экологии вирусов, их географического распространения, эпидемиологии и путей распространения вирусных инфекций, изучение путей передачи вирусов, их носительства; разработку мер диагностики вирусных заболеваний, совершенствование лабораторных диагностических систем, в диссертационной работе проведены исследования инфекционной активности герпесвируса

осетров, вирусологическими методами подтверждено специфическое развитие инфекционного процесса при воспроизведении инфекции в опытах *in vivo* и *in vitro*, серологическими методами выявлены вирусспецифические антитела в сыворотках крови рыб. Приведены данные по гуморальному иммунному ответу рыб на герпесвирусную инфекцию. При обобщении полученных данных был разработан и предложен метод ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют пунктам 1, 6, 7, 8, 10 паспорта специальности 03.02.02 Вирусология.

### **1.8 Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ.

### **1.9 Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 153 страницах, иллюстрирована 14 таблицами и 34 рисунками. Список литературы включает 307 источников, из которых 243 – иностранные.

### **1.10 Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту**

Гуморальный иммунный ответ осетровых рыб при герпесвирусной болезни характеризуется выработкой вируснейтрализующих антител, представленных в сыворотках крови двумя молекулярными изоформами.

Результаты выделения и иммунохимической характеристики иммуноглобулинов сибирского осетра.

Результаты разработки непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа для выявления противогерпетических антител в сыворотках крови осетровых рыб.

### **1.11 Личный вклад автора в выполнение работы**

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований выполнены при консультативной и практической помощи сотрудников лабораторий Здоровья гидробионтов, Иммунологии и Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Исследования проведены в лабораториях Здоровья гидробионтов и Иммунологии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

## 2 Собственные исследования

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Культуры клеток: перевиваемые клеточные линии рыб:

- пула печени, почки и селезенки сибирского осетра, *Acipenser baeri* (SSO-1, SSO-2, SSO-3) [1, 5];

- плавников сибирского осетра, *Acipenser baeri* (SSF-1, SSF-2) [1, 5];

- кожи белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSSK-1) [12];

- селезенки белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSS-2) [12].

SSO-1, SSO-2, SSO-3, SSF-1 и SSF-2 получены в лаборатории ихтиопатологии ФГУП ВНИИПРХ. Клеточные линии WSS-2 и WSSK-1 были любезно представлены нам профессором Рональдом Хедриком, Калифорнийский университет, США.

**2.1.2 Вирус:** герпесвирус сибирского осетра (SbSHV), шт. SK1/04.06 (7-30 пассажей в перевиваемой культуре клеток SSO-2), с инфекционной активностью  $6,1 \pm 0,05 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , выделенный в 2006 г. от сеголетков сибирского осетра в Тверской обл. [4, 6].

**2.1.3 Рыба:** сибирский осетр (*Acipenser baeri*) – сеголетки, двухлетки, двухгодовики; стерлядь (*Acipenser ruthenus*) – мальки; гибрид СБС (*Acipenser ruthenus* x *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*) – сеголетки.

**2.1.4 Животные:** кролики – породы "шиншилла" 3-4 месячного возраста живой массой 2,5 – 3 кг.

**2.1.5 Нормальные и гипериммунные сыворотки:** нормальная сыворотка сибирского осетра и кролика, гипериммунная сыворотка сибирского осетра к герпесвирусу сибирского осетра, антивидовая кроличья сыворотка на сыворотку сибирского осетра, антивидовая кроличья сыворотка на иммуноглобулин сибирского осетра (все сыворотки получены нами самостоятельно в лаборатории Здоровья гидробионтов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии).

#### 2.1.6 Реактивы

*Питательные среды, растворы и сыворотки:* среда Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (2MEM), среда 199, забуференный физиологический раствор pH 7,2-7,4, раствор трипсина (0,25%), раствор версена (0,02%). Для поддержания роста перевиваемых клеточных линий рыб использовали фетальную сыворотку KPC (Gibco, Invitrogen).

*Моющие средства:* 7X ("Serva").



*Антибиотики:* пенициллин, стрептомицин, нистатин, гентамицин.

## **2.2 Методы**

### **2.2.1 Культивирование перевиваемых клеточных линий осетровых рыб**

В работе использовали перевиваемые клеточные линии осетрового происхождения с учетом особенностей методов и условий культивирования для каждой из них [1, 4, 5].

### **2.2.2 Культивирование вируса в перевиваемых линиях клеток осетровых рыб и определение его инфекционной активности**

Культивирование герпесвируса сибирского осетра проводили в перевиваемых одно - или двухсуточных культурах клеток (п.п. 2.1.1) в статических условиях со средой 2MEM или 199 при температуре  $(15 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Культивирование вируса проводили с предварительной сменой ростовой среды на поддерживающую, с содержанием 2% фетальной сыворотки КРС до наступления 90-100% цитопатогенного действия в течение 7-14 суток. Вирус вносили в дозе 0,1-0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетка. Накопление вируса в клетках линии SSO-2 составляло  $10^{5,85 \pm 0,15} - 10^{6,35 \pm 0,20}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Вирусосодержащий материал хранили при температурах плюс  $(4 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  не более 30 суток или длительно при минус  $(70 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Инфекционную активность герпесвируса определяли по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

### **2.2.3 Экспериментальное заражение рыб вирусом**

Для экспериментального заражения использовали 2,5-месячную молодь осетровых рыб, свободных от вирусных инфекций. Заражение рыбы герпесвирусом сибирского осетра проводили методом ванн с конечной концентрацией вируса в воде  $10^{4,6 \pm 0,10} - 10^{5 \pm 0,10}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

### **2.2.4 Выделение вируса от зараженных рыб**

Отбор, обработку и исследование материалов проводили в соответствии с действующими отечественными и международными нормативными документами по вирусологическому исследованию рыб [3].

### **2.2.5 Постановка реакции нейтрализации**

Реакцию нейтрализации ставили по общепринятой методике с постоянной дозой герпесвируса сибирского осетра - 32 ТЦД<sub>50</sub> [18] и разными разведениями сывороток (от 1:10 до 1:12800) в культурах клеток SSO-1, SSO-2, SSO-3, SSF-1, SSF-2, WSS-2 и WSSK-1. С целью освобождения от термолабильных неспецифических ин-

гибиторов сыворотки перед титрованием прогревали при 45°C в течение 30 минут [16].

### **2.2.6 Хроматографические методы исследования**

Для выделения IgM сибирского осетра и IgG кролика из сывороток крови использовали следующие хроматографические методы: гель-фильтрационное разделение сывороточных белков, ионообменную, и аффинную хроматографию. Для сбора фракций и регистрации выхода белка с колонок использовали комплект хроматографического оборудования FPLC фирмы Pharmacia-LKB (Швеция). Подготовку оборудования проводили согласно рекомендациям фирмы изготовителя.

**2.2.7 Определение концентрации белка** проводили по Lowry O.H. et al. [14].

### **2.2.8 Получение антивидового кроличьего конъюгата**

Конъюгирование IgG кролика с пероксидазой хрена проводили модифицированным методом периодатного окисления по Wilson Nakane [17].

### **2.2.9 Приготовление специфических и нормальных культуральных антигенов**

Препараты очищенного герпесвируса сибирского осетра, пригодные для использования в ТФ ИФА, получали по способу Nakai et al. [10] в нашей модификации, заключающейся в концентрировании вируса ПЭГ-6000, с последующим ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы. Нормальный антиген готовили аналогично из неинфицированной культуры клеток SSO-2.

### **2.2.10 Непрямой метод твердофазного иммуноферментного анализа выявления противогерпетических антител у рыб**

Постановку непрямого варианта ТФ ИФА для выявления антител в сыворотках крови осетровых рыб проводили по традиционной схеме, основанной на взаимодействии антигена герпесвируса сибирского осетра, адсорбированного на поверхности полистиролового планшета, с антителами в сыворотках крови рыб с последующим выявлением образовавшегося на твердой фазе специфического комплекса с помощью кроличьих антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Образовавшийся иммунный комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляли с помощью субстратного раствора на основе АБТС. Результаты оценивали спектрофотометрическим методом при  $\lambda = 405$  нм с помощью ридера Sunrise Tecan (Austria). Пробу считали положительной, если оптическая плотность субстратного раствора в лунке с пробой в 2 или более раз превосходила оптическую плотность субстратного раствора в лунке с отрицательным контролем.

### 2.2.11 Статистические методы

Статистический анализ данных проводили общепринятыми методами [2].

## 3 Результаты исследований

### 3.1 Воспроизведение герпесвирусной болезни у экспериментально зараженных гибрида СБС, стерляди и сибирского осетра

Для изучения особенности течения герпесвирусной болезни использовали молодь гибрида СБС, стерляди и сеголетков сибирского осетра. У зараженных рыб наблюдали развитие заболевания со следующими клиническими признаками: кровоизлияния на вентральной стороне рострума, вокруг ротового отверстия (сифона), в межлучевой ткани грудных плавников, также отмечали экзфталмию и анемию жабр. В отличие от сибирского осетра у гибрида СБС и стерляди не наблюдали появления на коже бляшек гиперплазированного эпидермиса. За период исследования (срок эксперимента у СБС 3,5 месяца, у стерляди 10,5 месяца) гибель молоди гибрида СБС началась на 9 сутки после заражения и в итоге достигала 46,7%, а молоди стерляди на 22 и составляла – лишь 40%, в то время как гибель 2-месячной молоди сибирского осетра составляла 100% [4]. Гибель сеголетков сибирского осетра с характерными признаками некрогеморрагического синдрома составила 37,4% (рисунок 1).

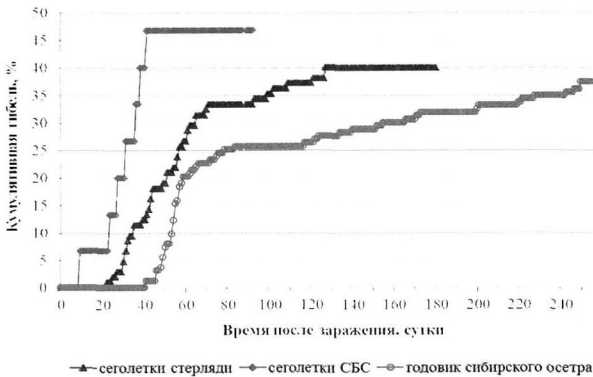


Рисунок 1. Динамика гибели зараженной герпесвирусом молоди осетровых рыб

От погибших рыб индивидуально отбирали патологический материал (грудные плавники, сифон, жабры, печень, почки, селезенка, а также слизь с поверхности тела рыб) с целью определения содержания вируса в материале.

У стерляди содержание герпесвируса в слизи с поверхности тела, плавниках, в тканях и во внутренних органах находилось в пределах 3,1-8,1 lgТЦД<sub>50</sub>/г ткани. Наиболее продолжительное время вирус выявляли в тканях сифона (титр вируса составил – 3,1-7,9 lgТЦД<sub>50</sub>/г ткани) - доля вирус-позитивных рыб через 65 суток после заражения составила 83,3%. Предпочтительного накопления вируса в печени, как это имело место у сибирского осетра [4], у стерляди не отмечали. В то же время содержание вируса в сердце (6,4-8,6 lgТЦД<sub>50</sub>/г ткани) стерляди было наиболее высоким.

У погибшей молоди гибрида СБС выделен вирус из пула внутренних органов (печень, почка, селезенка), а также из слизи и плавников в титрах 5,1 - 7,35 lgТЦД<sub>50</sub>/г ткани.

Представленные данные свидетельствуют о чувствительности 2,5-месячной молоди гибрида СБС и стерляди к герпесвирусу сибирского осетра. При общем подобии клинической картины инкубационный период болезни у СБС и стерляди более продолжительный (22 дня и 19 дней соответственно), чем у сибирского осетра примерно такого же возраста (6 дней) [4]. При этом главными отличиями заболевания являются отсутствие бляшек гиперплазированного эпидермиса, что свидетельствует о менее выраженном покровно-тканевом тропизме вируса в их организме.

### **3.2 Оптимизация параметров постановки реакции нейтрализации с целью выявления антител в сыворотках крови осетровых рыб**

Работа по оптимизации параметров реакции нейтрализации проводилась по следующим направлениям: подбор чувствительной культуры клеток, величина рабочей дозы вируса, температура и продолжительность инкубации смеси вирус-сыворотка и определение влияния компонента сывороток крови.

#### **3.2.1 Подбор культуры клеток**

Использовали 7 клеточных линий осетрового происхождения, чувствительных к герпесвирусу сибирского осетра: SSO-1, SSO-2, SSO-3, SSF-1, SSF-2, WSS-2, WSSK-1. Оценка пригодности клеточных культур проводили по следующим критериям: количественная характеристика ЦПД вируса, чувствительность клеток к токсическому действию сывороток осетровых рыб, воспроизводимость результатов титрования антител, четкость проявления ЦПД в присутствии иммунной сыворотки. Показатели количественной характеристики ЦПД вируса приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Количественная характеристика ЦПД вируса в 7 перевиваемых линиях клеток осетровых рыб

Показатели	Культура клеток						
	SSO-1	SSO-2	SSO-3	SSF-1	SSF-2	WSS-2	WSSK-1
Множественность заражения, ТЦД <sub>50</sub> /клетка	0,01	0,03	0,004	0,006	0,007	0,009	0,03
Полная деструкция монослоя, сутки после заражения	9-10	7-10	30-35	10-12	10-13	7-9	10-12
Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	5,6	5,85	4,35	5,1	5,39	5,88	5,27
Титр внеклеточного вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	4,85	5,2	н.и.*	3,85	4,47	5,49	4,83
Наименьшая доза внеклеточного вируса, вызывающая тотальный ЦПЭ, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	4,85	2,1	н.и.	2,85	3,85	2,2	2,85

\*Примечание: н.и. - не исследовали

В результате проведенных исследований для последующего использования в РН линия клеток SSO-2 была отобрана как наиболее оптимальная, поскольку наряду с высокой чувствительностью к герпесвирусу она при культивировании образует плотный монослой с ясно выраженной морфологией клеток и технологически проста в ее поддержании. Особенно важно, что при титровании вируснейтрализующих антител с использованием этой культуры клеток получены наиболее воспроизводимые результаты.

### 3.2.2 Величина рабочей дозы вируса

Для определения зависимости титра антител от величины используемой рабочей дозы вируса использовали четыре рабочие дозы вируса в диапазоне от 15 до 2500 ТЦД<sub>50</sub>/лунка, каждую из которых испытывали в РН с пятью гипериммунными сыворотками сибирского осетра. Полученные титры антител для каждой дозы анализировали методом регрессионного анализа с целью определения зависимости между выявляемым титром антител от количества нейтрализуемого вируса (рисунок 2). Титры антител и рабочую дозу вируса выражали в log<sub>2</sub>.

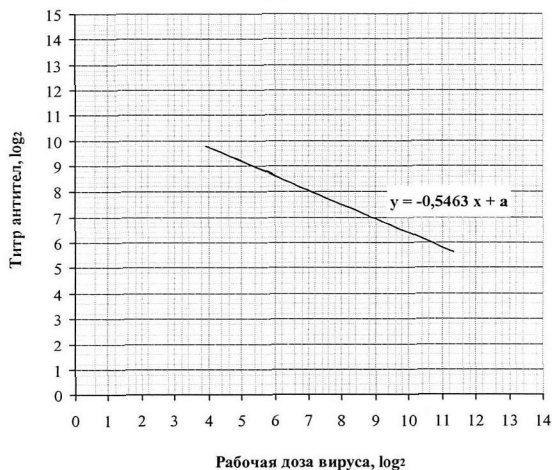


Рисунок 2. Зависимость титра вируснейтрализующих антител рыб от величины рабочей дозы вируса, установленная для линии клеток SSO-2

Установленная зависимость преобразована в формулу расчета фактически полученного титра вируснейтрализующих антител в титр антител для рабочей дозы в 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка.

*Формула расчета титра антител для рабочей дозы 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка*

$$\log_2 T_{32} = 0,5463 \times (\log_2 D_{\text{факт}} - 5) + \log_2 T_{\text{факт}}, \text{ где:}$$

5 – log<sub>2</sub> дозы вируса равной 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка (/25 мкл);

D<sub>факт</sub> – фактическая доза вируса (ТЦД<sub>50</sub>/лунка);

T<sub>факт</sub> – обратные значения титров антител, полученных с дозой вируса D<sub>факт</sub> ;

T<sub>32</sub> – обратные значения титров антител с дозой вируса 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка.

Использование данной формулы позволяет «приводить к единому знаменателю» титры антител, полученные с разными фактическими рабочими дозами.

### 3.2.3 Температура и продолжительность инкубации смеси вирус-сыворотка

Для оптимизации данных параметров РН испытывали следующие комбинации значений: 1 час при (15±0,5)°С; 1 час при (21,5±0,5)°С; 1 час при (21,5±0,5)°С, затем 24 часа при (4±0,5)°С; 6 часов при (15±0,5)°С; 6 часов при (21,5±0,5)°С. РН ставили с 5 гипериммунными сыворотками сибирского осетра в 96-луночных микропланшетах с использованием культуры клеток SSO-2 и рабочей дозы 32 ТЦД<sub>50</sub>/лунка.

В результате проведенных исследований отмечается тенденция увеличения титров антител с увеличением времени экспозиции реакционной смеси при  $(21,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

### **3.2.4 Влияние комплемента**

Определение влияния комплемента сывороток крови на титр вируснейтрализующих антител проводили методом РН в присутствии постоянной дозы нормальной сыворотки (5 и 10% в реакционной смеси) как источника комплемента. Увеличения титров вируснейтрализующих антител в сыворотках крови осетровых рыб при внесении в реакционную смесь сыворотки, содержащей комплемент, как это было выявлено у карпа при весенней виремии, на модели герпесвирусной болезни сибирского осетра не выявлено.

### **3.3 Динамика уровня вируснейтрализующих антител у переболевших осетровых рыб**

Гуморальный иммунный ответ осетровых рыб изучали после экспериментального или естественного заражения герпесвирусом сибирского осетра стерляди, гибрида СБС и сибирского осетра.

В эксперименте, проведенном на четырех годовиках сибирского осетра, зараженных методом ванн, было установлено, что в сыворотках крови, полученных на 7, 14, 21, 28 и 56 сутки после инфицирования активность нейтрализующих антител не была выявлена.

В сыворотках крови переболевших СБС на 92 сутки после заражения у всех рыб отбирали пробы крови. Вируснейтрализующие антитела были выявлены у 4-х из 8 выживших рыб. Титры антител находились в пределах от 1:17 до 1:113.

Наиболее высокая доля серопозитивных сывороток (66,7%) крови стерляди с титрами антител до 1:1076 были зарегистрированы на 121 сутки после заражения, что соответствует третьей неделе периода реконвалесценции рыб. В более поздние сроки (на 175, 247 и 310 сутки после заражения) доля позитивных сывороток снижалась до (40%, 23,3%, 19,4% соответственно) и титры вируснейтрализующих антител составляли от 1: 1076 до 1:31,3 (таблица 2).

Таблица 2 - Динамика специфического гуморального иммунного ответа 2,5-месячных сеголетков стерляди на экспериментальное заражение герпесвирусом сибирского осетра

n=3

Время после заражения, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля положительных сывороток, %	Реципрокные титры антител, $\log_2$	
			Диапазон	$x \pm s_x$
121	30	66,7*	3,81-10,07	6,63 $\pm$ 1,78**
175	30	40	3,81 - 8,82	4,91 $\pm$ 1,65
247	60	23,3	3,58 - 7,87	5,09 $\pm$ 1,44
310	62	19,4	3,58 - 5,83	4,64 $\pm$ 1,04

Примечание: порог детектирования  $\leq 1:8$ ; \* - достоверно выше доли положительных сывороток через 175, 247 и 310 суток после заражения ( $0,01 < P < 0,05$ ); \*\* - достоверно выше средних значений титров антител через 175, 247 и 310 суток после заражения ( $P < 0,001$ ).

В эксперименте у годовалой молоди сибирского осетра наиболее высокое количество серопозитивной рыбы составляло 92,73% и титры вируснейтрализующих антител – от 1:14 до 1:3200, были зарегистрированы на 202 сутки после инфицирования SbSHV (3 месяца после выздоровления). Исследование сывороток в более поздние сроки также показало снижение количества серопозитивных рыб и титров вируснейтрализующих антител (таблица 3).

Таблица 3 - Динамика специфического гуморального иммунного ответа годовалой молоди сибирского осетра на естественное заражение герпесвирусом сибирского осетра

n=3

Время от начала эксперимента, сутки	Количество исследованных сывороток	Доля серопозитивных рыб, %	Реципрокные титры антител, $\log_2$	
			Диапазон	$x \pm s_x$
202	55	92,73	3,58 - 11,65	6,29 $\pm$ 1,93
257	49	87,76	3,58 - 10,39	6,14 $\pm$ 1,64
312	48	77,08	3,58 - 8,64	5,89 $\pm$ 1,49
375	46	60,87	3,58 - 7,80	5,58 $\pm$ 1,29
454	45	60	3,58 - 6,82	5,33 $\pm$ 0,92
511	45	51,11	3,58 - 6,82	5,36 $\pm$ 0,99

Примечание: порог детектирования антител  $\leq 1:8$

Таким образом, при температуре 19-20°C, примерно через 1-3 месяца после перенесённого заболевания у осетровых рыб вырабатываются вируснейтрализующие антитела, которые выявляются на протяжении не менее 7 (стерлядь) – 13 (сибирский осетр) месяцев после выздоровления.



### 3.4 Динамика уровня вируснейтрализующих антител при гипериммунизации сибирского осетра

С целью изучения физико-химических и иммунохимических характеристик антител сибирского осетра проводили наработку гипериммунных сывороток. При первичном экспериментальном инфицировании титры вируснейтрализующих антител в крови переболевших сибирских осетров выявлялись в достаточно высоких значениях (1:600 – 1:3000). Последующая однократная внутрибрюшинная инъекция реконвалесцентам вирулентного вируса (доза  $10^{5,62 \pm 0,15}$  ТЦД<sub>50</sub>/рыба) через 5 месяцев с момента заражения приводила к 3 – 4 -кратному повышению уровня антител, который затем поддерживался на протяжении 5 месяцев и только потом происходило его снижение. Вторая и третья реиммунизация, проведенные аналогично первой, через год от начала эксперимента, привели к более быстрому (через 40 и 32 дня) увеличению титров антител в сыворотке крови одной из рыб до максимальных значений, полученных после первой реиммунизации, то есть более чем в 3 раза.

При гипериммунизации двухгодовиков сибирского осетра получены антисыворотки с высокими титрами вируснейтрализующих антител (1:600-1:8600). Динамика титров антител после трех этапов реиммунизации позволяет предположить наличие у рыб иммунологической памяти. Полученные антисыворотки использовали при оптимизации условий постановки реакции нейтрализации и для выделения и изучения иммуноглобулинов сибирского осетра.

### 3.5 Выделение и первичная характеристика иммуноглобулинов сибирского осетра

Известно, что основным иммуноглобулином костистых рыб является М-подобный иммуноглобулин (IgM), главным отличием которого от IgM теплокровных является тетрамерная структура молекулы и молекулярная масса 600-800 кД. Реже встречаются моно-, ди- и тримерные молекулы. Для выделения и очистки иммуноглобулинов рыб используют одно - четырехэтапные методы, основными элементами которых являются их высаливание и хроматографическое разделение.

Для выделения иммуноглобулинов использовали осетровые гипериммунные сыворотки к герпесвирусу сибирского осетра. Антитело-содержащие фракции выявляли в реакции нейтрализации после гель-фильтрационного разделения сывороточных белков.

Анализ методом гель-фильтрационной хроматографии среднего давления (FPLC) показал наличие двух молекулярных изоформ нейтрализующих антител, од-

на из которых, судя по молекулярной массе (174 кДа), представляет собой мономер, тогда как более тяжелые изоформы являются либо просто агрегатами, либо это действительно полимерные формы, содержащие от четырех и более мономеров (рисунок 3).

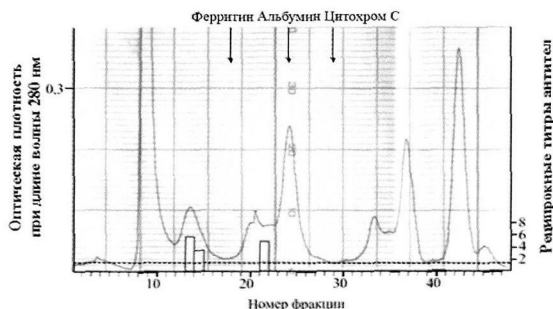


Рисунок 3. Результат гель-фильтрационного разделения гипериммунной сыворотки на колонке с Superose 6

Примечание: порог чувствительности выявления вируснейтрализующих антител 1:1,4 (пунктир); стрелками обозначены позиции выхода калибровочных белков: 1 – ферритин ( $M_r = 450$  кДа); 2 – альбумин ( $M_r = 67$  кДа); 3 – цитохром С ( $M_r = 12,3$  кДа)

На основе экспериментальных данных установлено, что оптимальной схемой выделения IgM-подобного иммуноглобулина осетровых рыб является последовательное проведение следующих этапов: 1) удаление липопротеинов; 2) осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония при 50% его насыщения; 3) разделение иммуноглобулинов гель-фильтрацией на Ultrogel AcA34; 4) окончательная очистка IgM-подобного иммуноглобулина осетра ионообменной хроматографией на DEAE – Sepharose CL – 6B.

Окончательную очистку иммуноглобулина проводили ионообменной хроматографией. Элюцию материала вели фосфатными буферными растворами с возрастающей молярностью (0,02M, 0,1M, 0,5M), для каждого из которых собирали выходящие из колонки белковые фракции. Белковую фракцию, полученную элюированием 0,1 M ФБР рехроматографировали с элюированием 0,08 M ФБР (рисунок 4, 5).

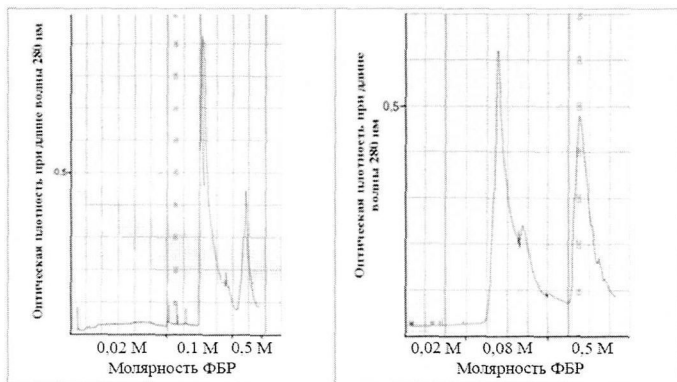


Рисунок 4. Результат ионообменного разделения фракции иммуноглобулинов гипериммунной сыворотки сибирского осетра на DEAE – Sepharose CL

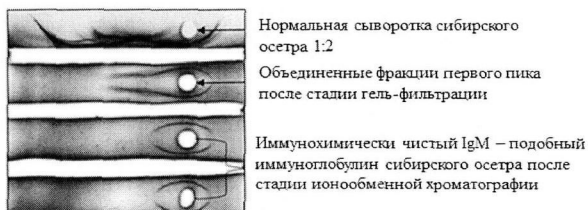


Рисунок 5. Иммунофореграмма Ig сибирского осетра

Примечание: в канавках - антивидовая сыворотка к сыворотке крови сибирского осетра

В результате проведенной работы получили иммунохимически чистый препарат иммуноглобулина, дающий одну дугу преципитации в иммуноэлектрофорезе и обладающий активностью антител, нейтрализующих герпесвирус. Всего было получено 10 мл препарата Ig сибирского осетра с концентрацией белка 0,638 мг/мл. Титр антител в данном препарате составил 1:45. Этот препарат использовали для иммунизации кроликов.

### 3.6 Разработка непрямого метода твердофазного иммуоферментного анализа для выявления антител в сыворотках крови осетровых рыб

Для постановки непрямого варианта ТФ ИФА были необходимы следующие реагенты:

- специфический и нормальный антигены для сенсibilизации твердой фазы;

- специфическая и нормальная сыворотки в качестве положительного и отрицательного контроля;
- антивидовой пероксидазный конъюгат для выявления комплекса антиген-антитело, сформированного на твердой фазе.

### 3.6.1 Приготовление вирусного антигена для твердофазного иммуноферментного анализа

Для получения культурального вирусосодержащего материала культуру клеток SSO-2 инфицировали герпесвирусом сибирского осетра. Очистку и концентрирование вирусного антигена проводили по указанной ниже схеме (рисунок 6).

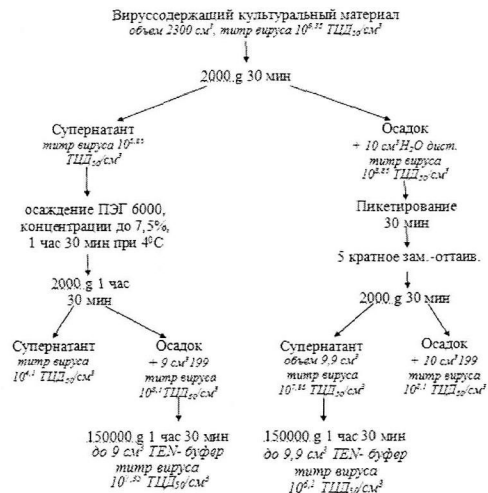


Рисунок 6. Схема приготовления антигена герпесвируса сибирского осетра для сенсibilизации планшет

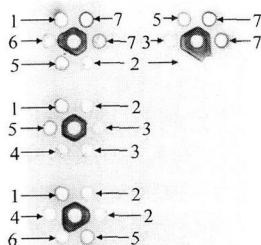
В результате проведенной работы был получен специфический антиген в виде очищенного и концентрированного герпесвируса сибирского осетра с титром инфекционной активности, определенной в реакции нейтрализации, 10<sup>7.35</sup> ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Полученный антиген использовали для сенсibilизации планшет.

### 3.6.2 Получение антивидового IgG кролика к иммуноглобулину сибирского осетра

В результате гипериммунизации кроликов получены антивидовые сыворотки с активностью в РДП 1:64 – 1:256. Для приготовления препарата антивидовых антител использовали антисыворотки с максимальной активностью.

Выделение IgG из сывороток крови кроликов, гипериммунизированных иммуноглобулином сибирского осетра, проводили 3 способами: 1) гель-фильтрационным разделением в *Ultrogel AcA34*; 2) ионообменной хроматографией с DEAE – Sepharose CL – 6B; 3) аффинной хроматографией на стафилококковом протеине А. При этом было установлено, что выделение иммуноглобулина из гипериммунных сывороток кролика методом аффинной хроматографии на протеине А более эффективно, нежели метод гель-фильтрационного разделения, поскольку позволяет получить больший выход по белку и активности.

С целью определения возможности применения разрабатываемого метода ТФ ИФА для выявления антиSbSHV-антител у других видов и гибридов осетровых рыб нами было изучено антигенное родство иммуноглобулинов близкородственных видов осетровых. В реакции диффузионной преципитации (РДП) с антивидовым кроличьим IgG, полученным на Ig сибирского осетра, установлено тесное антигенное родство иммуноглобулинов, по крайней мере, 4 видов и гибридов осетровых рыб: сибирского осетра, гибридов белуга х ленский осетр, бестер, СБС и стерляди (рисунок 7).



Примечание: сыворотка крови осетровых рыб: 1 - нормальная сыворотка сибирского осетра; 2 - стерлядь; 3 - гибрид стерлядь х белуга х стерлядь (СБС); 4 - белуга х стерлядь (бестер); 5 - гипериммунная сыворотка сибирского осетра; 6 - СБС; 7 - ленский осетр х белуга.

Рисунок 7. Результат реакции диффузионной преципитации (РДП) с антивидовым кроличьим IgG, полученным на Ig сибирского осетра

Полученные данные показывают, что антивидовой кроличий IgG можно использовать для выявления антител к SbSHV у разных видов и гибридов осетровых рыб. Из полученного кроличьего IgG против иммуноглобулина сибирского осетра были приготовлены пероксидазные конъюгаты.

### **3.7 Постановка непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа для выявления антител в сыворотках крови осетровых рыб**

С использованием полученных реагентов - очищенного и концентрированного антигена и Ig кролика против Ig сибирского осетра, а также пероксидазного конъюгата этих антител - был оптимизирован не прямой вариант ТФ ИФА для выявления антител против герпесвируса сибирского осетра. Оптимальные разведения реагентов для постановки непрямого варианта ТФ ИФА были определены шахматным титрованием. В результате установлено, что рабочее разведение специфического антигена для сенсibilизации планшет составило 1:800, антивидового иммунопероксидазного конъюгата - 1:1000. Исследование его эффективности показало, что метод пригоден для выявления противогерпетических антител в сыворотках крови как собственно сибирского осетра, так и близкородственных видов и гибридов осетровых рыб. При этом уровень антител в сыворотках крови гипериммунных сибирских осетров достигал 1:590490, а у экспериментально зараженных и переболевших сибирских осетров титры находились в диапазоне от 1:90 до 1: 65610, а у других видов осетров и их гибридов от 1:810 до 1:65610.

### **3.8 Взаимосвязь титров антител против SbSHV, выявленных в РН и непрямом варианте ТФ ИФА**

Для выявления взаимосвязи результатов РН и непрямого варианта ТФ ИФА обоими методами были протитрованы гипериммунные осетровые сыворотки и сыворотки крови осетра, полученные из обследуемых рыбоводных хозяйств.

Регрессионный анализ данных по титрам антител в РН и ТФ ИФА показал, что эти данные тесно взаимосвязаны ( $R^2 = 0,8413$ ) и эта взаимосвязь представляет собой линейную зависимость, описываемой эмпирической формулой « $y=1,2789x + 2,6992$ » (рисунок 8).

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

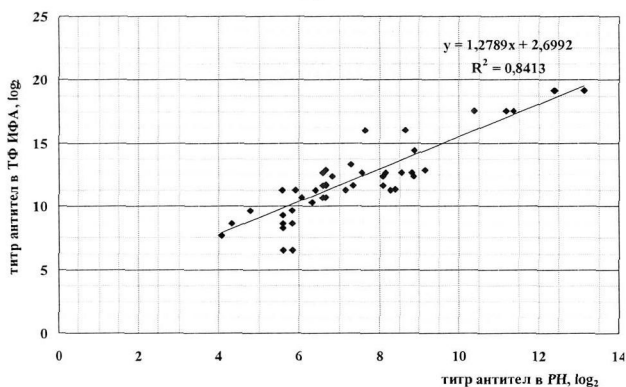


Рисунок 8. Взаимосвязь титров антител против герпесвируса сибирского осетра в РН и ТФ ИФА

### 3.9 Результаты вирусологического и серологического обследования осетровых хозяйств на наличие противогерпетических вируснейтрализующих антител

Проведено вирусологическое обследование 9 разных видов или гибридов четырех возрастных групп осетровых рыб из рыбоводных хозяйств семи регионов России и Казахстана. Материал отбирали в разное время года при температуре воды от 2°C до 23°C от рыб, как с типичными признаками герпесвирусной болезни, так и без признаков. Вирусологические исследования проводили с использованием таких диагностических методов, как выделение вируса от обследуемых рыб в перевиваемых культурах клеток с последующей идентификацией в РН референсной антисывороткой, так и выявление вируснейтрализующих антител к герпесвирусу сибирского осетра в сыворотках крови осетровых рыб. Всего протестировано 554 проб сывороток крови: из них выявлено 203 положительных проб.

Выявление антителопозитивных сывороток свидетельствует об имевшем место контакте рыбы с возбудителем заболевания и возможно широком распространении вируса-возбудителя болезни среди рыб предприятия.

#### 4 Выводы

1. Установлено, что гибрид стерлядь х белуга х стерлядь и стерлядь чувствительны к герпесвирусу сибирского осетра, но клиническая картина их переболевания протекает с менее выраженными симптомами заболевания по сравнению с сибирским осетром.

2. Гуморальный иммунный ответ сибирского осетра на герпесвирус характеризуется выработкой вируснейтрализующих антител, которые при экспериментальном инфицировании методом ванн достигают максимальных значений 1:3000 на 114 сутки после заражения; через 337 суток после инфицирования происходит снижение уровня вируснейтрализующих антител.

3. Гуморальный иммунный ответ осетровых, родственных сибирскому осетру, характеризуется меньшим (в 3 раза) уровнем выработки вируснейтрализующих антител и меньшей длительностью персистенции антител в крови, в сравнении с сибирским осетром.

4. Сывороточные противогерпетические антитела сибирского осетра представлены, по крайней мере, двумя молекулярными изоформами, различающимися хроматографически. Одна из них представляет собой мономер с молекулярной массой 174 кДа, а другая обладает молекулярной массой, выходящей за пределы возможности ее определения хроматографическими методами.

5. Разработанная схема фракционирования осетровых сывороток, включающая удаление липопротеинов, осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония, разделение иммуноглобулинов гель-фильтрацией с конечной доочисткой ионообменной хроматографией, обеспечивает получение иммунохимически чистых препаратов иммуноглобулина сибирского осетра, пригодных для иммунизации кроликов с целью получения моноспецифических сывороток против иммуноглобулинов сибирского осетра.

6. Установлено тесное антигенное родство иммуноглобулинов близкородственных видов осетровых рыб (сибирский осетр, гибриды белуга х ленский осетр, бестер, СБС и стерлядь), что позволяет использовать антитела кролика, полученные иммунизацией иммуноглобулином сибирского осетра, для выявления антител перечисленных видов осетровых.

7. Непрямой вариант ТФ ИФА, обеспечивает выявление антител, специфичных к герпесвирусу сибирского осетра в сыворотках крови экспериментально зараженных и естественно переболевших осетровых рыб. Результаты непрямого ТФ



ИФА и РН тесно коррелируют ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,0001$ ), их взаимосвязь характеризуется линейной зависимостью с эмпирической формулой « $y = 1,2789x + 2,6992$ », что позволяет использовать ТФ ИФА в качестве альтернативного метода выявления антител против герпесвируса для ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни и мониторинговых исследований.

### **5 Практические предложения**

Разработанный ТФ ИФА для выявления противогерпетических антител в сыворотках крови осетровых рыб предлагается для использования в научно-исследовательских учреждениях и ветеринарных лабораториях при ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра (SbSHV) у различных видов осетровых рыб.

Для практического использования разработаны и предложены «Методические положения по выявлению антител к герпесвирусу сибирского осетра (SbSHV) в сыворотках крови осетровых рыб непрямом методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА)», которые используются в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в научно-исследовательских работах.

### **6 Список использованной литературы**

1. Клеточные линии из тканей сибирского осетра / Т.И. Щелкунова, О.А. Купинская, Н.А. Машенко, И.С. Щелкунов // Первый конгресс ихтиологов России: тез. докл. – Астрахань, сентябрь 1997. – С. 302-303.
2. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб // В кн.: Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч.1.-М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, С. 60-113.
4. Щелкунов, А.И. Биологические, физико-химические и молекулярно-генетические свойства герпесвируса сибирского осетра: дисс. канд. биол. наук / Щелкунов Артем Игоревич. – Покров, 2010. – 137 с.
5. Щелкунова, Т.И. Температурно-ростовые характеристики постоянных клеточных линий, полученных из тканей сибирского осетра / Т.И. Щелкунова, Ю.П. Колбасова, И.С. Щелкунов // Цитология. – 2006. – Т. 48. – № 9. – С. 814.
6. Щелкунов, И.С. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России / И.С. Щелкунов [и др.] // Российский ветеринарный журнал (Сельскохозяйственные животные). – 2007. – № 1. – С. 10-12.

7. Щелкунов, И.С. Вирусные инфекции у осетровых рыб / И.С. Щелкунов // Рыбное хозяйство. Аналитическая и реферативная информация. Серия: Болезни гидробионтов в аквакультуре. – М.: ВНИЭРХ, 2000. – Вып. 1. – С. 3-16.

8 Adkison, M.A. Identification of an iridovirus in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) from northern Europe / M.A. Adkison, M. Cambre, R.P. Hedrick // Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. – 1998. – Vol.18. – P. 29-32.

9. Cheng, C.A. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain / C.A. Cheng, J.A. John, M.S. Wu. // Vet Immunol Immunopathol. – 2006 – Vol. 15. – P. 255-65.

10. Diagnosis of viral epidermal hyperplasia of Japanese flounder larvae by fluorescent antibody technique / T. Nakai, K. Mori, K. Muroga, T. Mecuchi // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1991. – Vol. 57. – P.1507-1510.

11. Hedrick, R.P. A workshop on sturgeon diseases/ R.P. Hedrick, S. LaPatra, T. McDowell // Conducted at the Forth International Symposium on Sturgeon. – Oshkosh, Wisconsin, 2001. – 23 p.

12. Hedrick, R.P. Two cell lines from white sturgeon / R.P. Hedrick [et al.] // Trans. Am. Fish Soc. – 1991. – Vol. 120. - P. 528-534.

13. Humoral response and memory formation in Carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin / C.H.J. Lamers, M.J.H. De Haas, W.B. Van Muiswinkel, T. Mecuchi // Immunol. – 1985. – Vol. 9. – P. 65-75.

14. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, A.J. Farr, R.Y. Paudall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

15. Pilström, L. Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (*Gadus morhua* L.) / L. Pilström, A. Petersson // Dev Comp Immunol. – 1991 – Vol. 15(3) – P. 143-52.

16. Watson, L.R. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and sub adult white sturgeon *Acipenser transmontanus* / L.R. Watson, S.C. Yun, J.M. Groff // Dis. Aquat. Org. – 1995. – Vol. 22. – P. 199-210.

17. Wilson, M.B. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HPRO) to antibodies / M.B. Wilson, P.K. Nakane // Immunofluorescence relation staining techniques – Usciver, North Holland, Bivmed Press, 1978. – P. 215-244.

18. Wizigmann, G. Serologische Untersuchungen uder das Vorkommenvon Antikörpern gegenüber Rhabdovirus Carpio bei Karpfen in bayerischen Teichwirtschaften

/ G. Witzmann, C. Pfeil-Putzien, C. Baath // *Fisch und Umwelt. Beiträge zur Fischpathologie und Toxikologie*. – Heft 8. Gustav Fischer Verlag. – Stuttgart. N.Y., 1980. – S. 31-36.

### **7 Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Прокаева, И.Б. Получение гипериммунных антисывороток к герпесвирусу сибирского осетра / И.Б. Прокаева, А.И. Щелкунов // «Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины» Материалы конференции молодых ученых, посвященных памяти Вишнякова И.Ф. 70-летию со дня рождения 3 декабря 2009г., – Покров 2009. С. 127-130.

2. Прокаева, И.Б. Особенности течения герпесвирусной болезни у стерляди и гуморального иммунного ответа рыб на инфекцию / И.Б. Прокаева // «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Расширенные материалы III Международной конференции, Борок, 18-22 июля 2011 / Под ред. проф. В.Р. Микрякова и др. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2011. – С. 188-192.

3. Прокаева, И.Б. Особенности гуморального иммунного ответа осетровых рыб на возбудитель герпесвирусной болезни / И.Б. Прокаева // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2012. – №07(81). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/07/pdf/63.pdf>

4. Прокаева, И.Б. Получение препаратов очищенного герпесвируса сибирского осетра / И.Б. Прокаева // «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» Материалы международной научно-практической конференции г.Щелково, ГНУ ВНИТиБП РАСХН, 5-7 декабря 2012г. С. 125-129.

5. Further virus characterization, diagnostics and prevention of Siberian sturgeon herpesvirus disease / Igor Shchelkunov, Andor Dospoly, 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 1-5, 2012.