

УДК 636.5/6.09:616.9/-07(477)

О.В. ЦИНОВИЙ, кандидат біологічних наук,
Г.В. БІЛЕЦЬКА, кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Державна дослідна станція птахівництва Національної академії аграрних наук України
tsynovalexvet@ukr.net

Універсальний метод очищення та концентрування вірусів на прикладі інноваційної розробки для парвовірусу гусей

Анотація. Розроблено новий спосіб очищення і концентрування вірусу ентериту гусей. З цієї метою було використано три варіанти подальшого продовження очищення вірусу та проведено їх порівняльний аналіз.

Вірус очищали без детергентів, а також з використанням детергентів – саркозила та нонідета Р-40. Найкращі результати були отримані нами при використанні м'якого неіонного детергента нонідет Р-40, який був використаний у подальшій нашій роботі.

Вірус було ідентифіковано за допомогою електрофоретичних досліджень в поліакриламідному гелі, а також електронної мікроскопі. Під час очищення та концентрування вірусу інфекційний титр вірусу складав $9,2-9,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ (титр цитопатичної дії вірусу, тобто величина, обернена розведенню вірусної суспензії, при якому клітинний моношар у 50% лунок виявився ураженим цитопатичною дією), що на $2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ вище, ніж у початковому матеріалі.

Вміст білка в досліджуваних пробах коливався від 200 до 500 мг/мл. Таким чином, аналізуючи отримані нами результати з очищення та концентрування вірусу ентериту гусей, можна зробити висновок, що отриманий таким методом антиген придатний для розробки тест-системи імуноферментного аналізу (ІФА). Отримано гіперімунні та негативні сироватки для ІФА-діагностикумів, відпрацьовані оптимальні співвідношення компонентів для конструювання тест-системи ІФА, виведена формула перерахунку титрів антитіл у сироватках крові гусей при тестуванні їх в одному розведенні.

Визначено позитивно-негативний поріг для даного діагностикума (які з досліджуваних сироваток мають позитивний, сумнівний або негативний титр антитіл до збудника вірусного ентериту гусей). У нових умовах розповсюдження особливо небезпечних вірусів дана розробка, при наявності відповідного обладнання, може бути в подальшому використана для очищення та концентрування цих вірусів, вивчення їх біологічних властивостей, культивування та використання при розробці нових вакцин.

Ключові слова: гуси, сироватки крові, вірусний ентерит гусей діагностика, ІФА, парвовірус

Вірусний ентерит гусей (ВЕГ, *Enteritis viralis anserculorum*) – гостра контагіозна хвороба молодяку гусей та мускусних качок, яка характеризується запаленням шлунково-кишкового тракту та високою летальністю – до 30-90%. Хворіє птиця віком від добового до 30-добового віку. Збудник захворювання – парвовірус з родини *Parvoviridae* (Білецька та ін., 2004; Галкина и др., 2020).

Діагностика цього захворювання має труднощі. Комерційний стандартний набір для експрес-діагностики відсутній як в Україні, так і в інших країнах світу.

Існують методи серодіагностики ВЕГ: реакція нейтралізації (РН), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА). РДП та РНГА за чутливістю та специфічністю значно поступаються реакції нейтралізації, яка у свою чергу трудомістка та займає багато часу при постановці (Білецька та ін., 2004).

Окремими вченими для діагностики вірусного ентериту гусей також використовують твердофазний імуноферментний аналіз (Дмитриев, 2020; Контримавичус и Велічко, 2019; Никитина и др., 2012; Трефилов и Никитина,

2014), також набуло поширення використання в діагностиці ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), але для цього потрібне відповідне обладнання (Кулибаба *и др.*, 2012).

Наразі існує нагальна потреба в розробці високочутливого експрес-методу діагностики, який прискорить проведення наукових досліджень.

Основним методом експрес-діагностики є реакція імуноферментного аналізу (ІФА), яка має високу чутливість та швидкість постановки, стандартизацію обліку й комп'ютерну обробку результатів. (Маслов, 2006, Іванська *та ін.*, 2003) Метод успішно використовується для виявлення як вірусних антигенів, так і специфічних антитіл у тварин-реконвалесцентів або імунізованих противірусними вакцинами (Михайлов, 2010; Трефілов *и др.*, 2006).

Реалізація ідеї отримання діагностичних наборів ІФА потребує рішення складних і різноманітних завдань. Це, насамперед, виділення антигенних фракцій, вивчення їх структури, фізико-хімічних та імунобіологічних властивостей, які визначають специфічність конкретного антигену.

Основою якості будь-якого діагностичного ІФА є очищення антигену, який в подальшому наноситься на планшети.

Низка авторів очищали парвовірус гусей за допомогою макропористої гель-хроматографії (Маслов, 2006), ультрафільтрацією через спеціальні фільтри (Ерофеев *и др.*, 2001), але досягти такого рівня очищення вірусу, як при використанні методу ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози-хлористого цезію, було неможливо. Малий розмір парвовірусу гусей (20-25 нм), а також його тісний зв'язок з клітинними мембранами, обумовлюють труднощі при очищенні. Але їх можна подолати різними шляхами, наприклад, збільшити оберти при ультрацентрифугуванні або час центрифугування, що, у свою чергу, економічно не вигідно. Тому нами був розроблений новий універсальний метод очищення та концентрування вірусу, який можна використовувати як безпосередньо для очистки вірусу ентериту гусей, так і великого спектра інших вірусів.

Мета роботи – удосконалення методу очищення парвовірусу гусей для розробки вітчизняної діагностичної тест-системи ІФА для визначення антитіл до збудника вірусу ентериту гусей (ВЕГ).

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили у Державній дослідній станції птахівництва НААН та Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків).

Для роботи використано культуральну розплідку штаму "BBS-99" на гусячих фібробластах, біологічна активність якого до очищення становила $7.5 \lg \text{TCID}_{50/\text{cm}^3}$.

Для очищення вірусу використовували:

- центрифугу PC-6 та ультрацентрифугу MSE;
- проточний спектрофотометр LKB 2238 "Uvicord S" з калібратором фракцій і самописцем – для сканування вірусних фракцій у градієнті щільності сахарози-хлористого цезію;
- диспергатор УЗДН-А – для проведення ультразвукової обробки вірусного матеріалу;
- апарати LKB 2117 Multifor System і LKB 2197 Constant

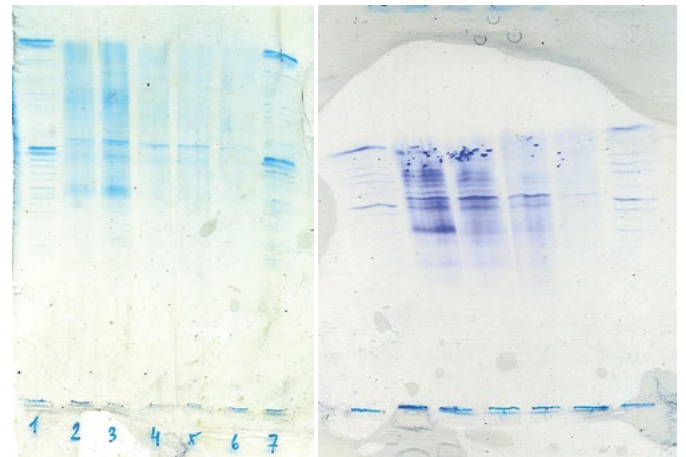


Рис.1. Електрофореграми (1,7 – стандарти; 2 – очищення без детергентів; 3 – очищення з саркозілом; 4,5 – очищення з нонідетом Р-40; 6 – до очищення на градієнті)

Power Supply та гель 120x250x0,5 мм на підложці Gel Bond (Serva, Німеччина) – для проведення електрофору у поліакриламідному гелі.

Перегляд зразків при електронній мікроскопії здійснювали за допомогою електронного мікроскопу ПЕМ-125К, який має у своєму складі систему зйомки та аналізу зображення CAI-01A (АО "SELMI", м. Суми) на основі CCD камери DX-2.

Якість очищення перевіряли за тестами:

- визначення біологічної активності вірусу шляхом титрування на культурі клітин гусячих фібробластів;
- визначення концентрації білка в отриманих фракціях за методом (Бредфорд, 1991);
- електронної мікроскопії методом негативного контрастування (Королев, 1980);
- електрофору у поліакриламідному гелі (ПААГ) за (Gorg A. *et al.*, 1985) у порівнянні зі стандартними білками фірми "Fermentas" (14 білків з відомими масами у кілодальтонах).

Для конструювання тест-системи використовують відповідні матеріали та методи.

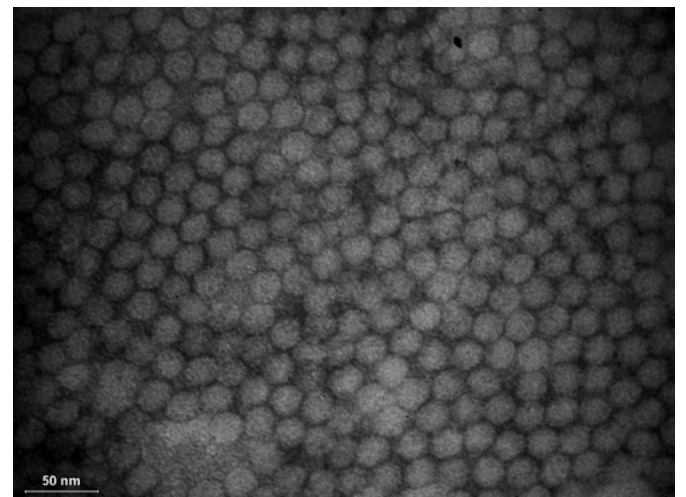


Рис.2. Вірус ентериту гусей. Збільшення у 127 000 разів

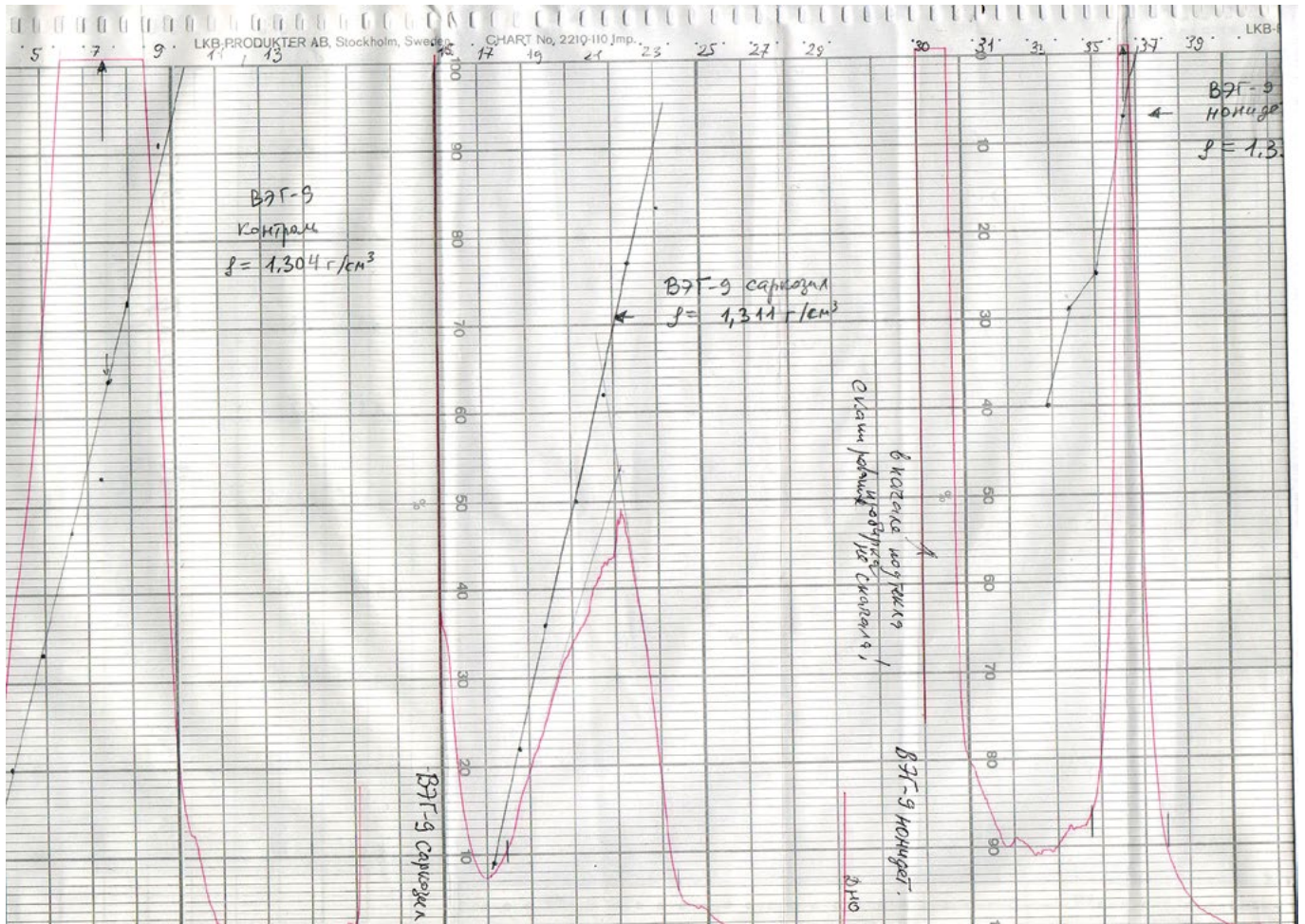


Рис.3. Результати сканування: 1 – очищення без детергентів; 2 – очищення з саркозилом; 3 – очищення з нонідетом Р-40

Імуноспецифічні компоненти: полістиролові планшети (фірми Nunc), сенсibilізовані культуральним антигеном штаму BBS- 99; нормальна сироватка (сироватка отримана від 30-добових гусенят, яких вирощували у камеральних умовах); позитивна сироватка (специфічна сироватка крові гусей, імунізованих очищеним антигеном зі штаму BBS-99); антивидовий імунопероксидазний кон'югант проти Ig G гусей.

Неспецифічні компоненти. В якості субстрату використовували АБТС (2,2'-азіно-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота) з перекисом водню, як "стоп-розчин" використовували 5%-й додецилсульфат натрію, як буфер для розведення та відмивочний буфер – трис-буфер з 0,1% ТВІН-20 (рН 7,4-7,6).

Досліджувані сироватки. Аналізували проби сироваток крові гусей, які були надіслані птахівничими господарствами для дослідження, що не містять мікроскопічних ознак бактеріальної та грибкової мікрофлори.

ІФА-тест. Непрямий варіант ІФА проводили за загальноприйнятною схемою. Вимірювання проводили на рідері Star Fax-2100 на диференційному фільтрі при довжині хвилі 405 нм. Використовували стандартний метод послідовних розведень сироватки. Титром досліджуваної сироватки вважалась величина її найбільшого розведення, оптична щільність якого дворазово перевищувала відповідний середній показник негативного контролю.

Результати досліджень. При розробці методу очищення вірусу, вірусвміщуючий матеріал обробляли 8% ПЕГ-6000 (поліетиленгліколь) і центрифугували. Потім вірусну суспензію обробляли ультразвуком при 22 кГц і центрифугували через розчин сахарози (30%).

У попередніх дослідженнях при очищенні вірусу ми не використовували детергенти. При електрофоретичних дослідженнях зразків, які були отримані на завершальному етапі у ПААГ, було виявлено декілька білків, які за молекулярною масою не відносяться до вірусних, і є баластними. Тому, виникла потреба у застосуванні, на даному етапі, детергентів для видалення цих білків.

З цією метою було використано три варіанти подальшого продовження очищення вірусу та проведено їх порівняльний аналіз.

Вірус очищали без детергентів, а також з використанням детергентів – саркозила та нонідета Р-40.

При проведенні порівняльного аналізу до проб з вірусною суспензією додавали у відповідній концентрації саркозил або нонідет Р-40 (контролем були проби без детергентів). Потім їх нашаровували на градієнт щільності сахарози-хлористого цезію (питома густина 1,038-1,439 г/см³) та центрифугували. Після центрифугування градієнти сканували на проточному спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм.

1. Схема імунізації

| Імунізація | Матеріал для імунізації | Титр матеріалу, lg ТЦД _{50/см³} | Інтервал між імунізаціями | Спосіб уведення, доза |
|------------|---|---|---------------------------|--|
| 1 | очищений вірус BBS-99 | 10,5 | 7 діб | підшкірно 0,56 10 ¹⁰ ТЦД _{50/0,5 см³} |
| 2 | очищений вірус BBS-99 | | | підшкірно 0,56 10 ¹⁰ ТЦД _{50/0,5 см³} |
| 3 | очищений вірус BBS-99 + Монтанід ISA-70 1:1 | | | внутрішньо-м'язово 1,12 10 ¹⁰ ТЦД _{50/1 см³} |

За результатами сканування на самописці, за піками гаусових кривих, відбирали основні фракції.

Отримані фракції повторно осаджували через розчин сахарози (30%) та ресуспензували у TSE-буфері (рН 7,6) в об'ємі 1/100 від вихідного. Від усіх трьох зразків були відібрані проби для проведення електронної мікроскопії та для електрофорезу у ПААГ (поліакриламідному гелі).

Найкращі результати були отримані нами при використанні м'якого неіонного детергенту нонідет Р-40, який був використаний у подальшій нашій роботі.

При електрофорезі у ПААГ проба, в якій при очищенні вірусу використовували нонідет Р-40, не мала баластних білкових компонентів, а мала тільки білки, які відносилися до вірусу (85 кДа) (рис.1).

Електронно-мікроскопічними дослідженнями у пробах з нонідетом Р-40 виявлені віріони розміром 20-22 нм, які за морфологічними характеристиками відносяться до вірусу ентериту гусей. Проби з нонідетом Р-40 не мали небажаних домішок та включень (рис.2).

При скануванні лінійних градієнтів дані, за кількістю вірусу та його чистоти у зразку з нонідетом Р-40, були оптимальними (рис.3).

Після очищення та концентрування біологічна активність вірусу ентериту дорівнювала 9,2-9,5 lg ТЦД_{50/см³}, що на 2 lg ТЦД_{50/см³} вище, ніж у вихідному матеріалі (7,5 lg ТЦД_{50/см³}).

Вміст білка в досліджуваних пробах коливався від 200 до 500 мг/мл.

Таким чином, аналізуючи результати, отримані щодо очищення та концентрування вірусу ентериту гусей,

можна зробити висновок, що удосконалений нами метод може бути використаний для розробки тест-системи імуноферментного аналізу.

Розробка діагностичної тест-системи на основі непрямого ІФА для виявлення антитіл до збудника ВЕГ. Розробка ІФА-діагностікума ВЕГ складається з декількох етапів:

1. Отримання специфічних гіперімунних і негативних сироваток крові гусей. Для отримання специфічних гіперімунних сироваток проводилася імунізація гусенят 30-добового віку за наступною схемою (табл. 1).

Через 14 діб після заключної імунізації титр в реакції нейтралізації (РН) становив 1:5120. Негативна сироватка крові гусей була отримана від клінічно здорових гусенят 30-добового віку, яких вирощували в камеральних умовах. Титри в РН негативних сироваток були нульові.

2. Вибір робочого розведення сироватки і визначення коефіцієнтів рівняння лінійної регресії. Для визначення оптимального розведення досліджували у 154 сироватках крові гусей з титрами антитіл до збудника ентериту від 1:100 до 1:12800, методом послідовних розведень. Для розведення 1:100, 1:200, 1:400 досліджених сироваток з певним титром обчислювали значення S/P і визначали коефіцієнт кореляції між логарифмованими значеннями величин титрів і відповідних їм S/P відносин (відношення оптичної густини досліджуваної сироватки до оптичної густини позитивного контролю, з відніманням оптичного показника негативного контролю). Були отримані коефіцієнти кореляції для розведення: 1:100 – 0,86; 1:200 – 0,93; 1:400 – 0,92. Найбільш прийнятним для постановки реак-

2. Стандартні відхилення розведень сироваток, які не мають антитіл до збудника ентериту гусей з урахуванням стандартної похибки

| Розведення | Кількість проб | Середнє значення | Мінімальне значення | Максимальне значення | Стандартне відхилення | Стандартна похибка |
|------------|----------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| 1:100 | 54 | 0,196278 | 0,115 | 0,310 | 0,044788 | 0,006151 |
| 1:200 | 54 | 0,128611 | 0,075 | 0,208 | 0,030063 | 0,004129 |
| 1:400 | 54 | 0,097796 | 0,058 | 0,156 | 0,021404 | 0,002940 |
| 1:800 | 54 | 0,079352 | 0,051 | 0,131 | 0,018116 | 0,002488 |
| 1:1600 | 54 | 0,066944 | 0,041 | 0,112 | 0,015719 | 0,002159 |
| 1:3200 | 54 | 0,059389 | 0,039 | 0,088 | 0,012099 | 0,001661 |
| 1:6400 | 54 | 0,054296 | 0,031 | 0,078 | 0,011796 | 0,001620 |
| 1:12800 | 54 | 0,051852 | 0,033 | 0,072 | 0,009944 | 0,001365 |

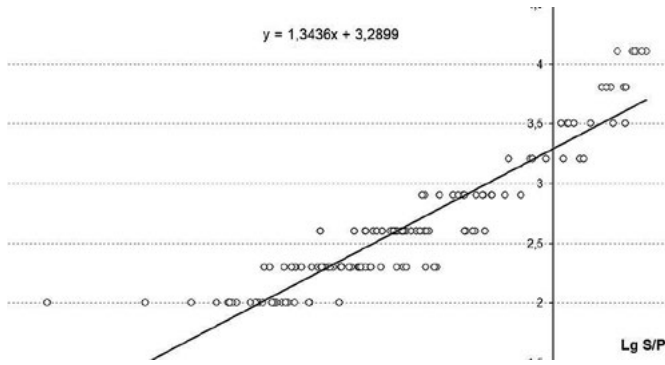


Рис.4. Калібрувальна крива для визначення титру

ції в одному розведенні сироватки є розведення 1:200, що дає можливість отримувати достовірні результати при дослідженні сироваток (коефіцієнт кореляції був найбільш високим). Ставлячи перед собою завдання дослідити в одному розведенні сироватки з високими титрами, нам слід знайти кореляційну залежність між $\lg T$ і $\lg S/P$ саме для таких сироваток. Визначити значення титру можна за калібрувальною кривою, представленою на *рисунок 4*.

Використовуючи математично виражену лінійну залежність для $\lg T$ і $\lg S/P$, що має вигляд $\lg T = A + B \cdot \lg S/P$, було виведено рівняння лінійної регресії для обраного нами розведення 1:200 – $\lg T = 3,2899 + 1,3436 \cdot \lg S/P$.

3. Визначення позитивно-негативного порога (ПНП). П'ятдесят чотири завідомо негативних сироватки крові, отриманих від гусенят, що вирощувалися в камеральних умовах, досліджували методом послідовних розведень. Позитивно-негативний поріг визначали шляхом розрахунку середніх значень оптичної щільності досліджуваних сироваток для кожного розведення, додаючи три

значення стандартного відхилення. Результати розрахунків представлені в *таблиці 2*.

На основі отриманих даних, за раніше виведеною формулою $\lg T = 3,2899 + 1,3436 \cdot \lg (S/P)$, визначено ПНП (позитивно-негативний поріг) – негативні сироватки з титром від 0-265, від 265 і більше – позитивні.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено новий метод очищення та концентрування вірусу ентериту гусей з використанням ультрацентрифугування через градієнт густини сахарози-хлористого цезію та м'якого неіонного детергенту нонидет Р-40. Після очищення та концентрування біологічна активність вірусу ентериту підвищилась на 2 \lg ТЦД_{50/см³} у порівнянні з вихідним матеріалом.
2. Розроблені основні технологічні параметри тест-системи ІФА для визначення антитіл до вірусного ентериту гусей в одному розведенні сироватки. Дана тест-система придатна для дослідження імунного статусу вакцинованої птиці.

Перспективи подальших досліджень полягають у тому, що дана розробка, при наявності відповідного обладнання, може бути в подальшому використана для очищення та концентрування великого спектру вірусів, вивчення їх біологічних властивостей, культивування та використання при розробці нових вакцин, що, у свою чергу гарантує здоров'я піддослідних тварин. Представлений метод очищення вірусу може використовуватися як у ветеринарії, так і в медицині, оскільки в ньому враховані показники, які диференціюють віруси між собою з врахуванням їх питомої густини, розміру, коефіцієнту седиментації та багатьох інших специфічних показників. ■

А.В. Циновий, Г.В. Белецкая

Универсальный метод очистки и концентрирования вирусов на примере инновационной разработки для парвовируса гусей

Аннотация. Разработан новый способ очистки и концентрирования вируса энтерита гусей. С этой целью были использованы три варианта дальнейшего продолжения очистки вируса и проведен их сравнительный анализ. Вирус очищали без детергентов, а также с использованием детергентов – саркозила и нонидета Р-40. Наилучшие результаты были получены нами при использовании мягкого неионного детергента нонидет Р-40, который был использован в нашей дальнейшей работе. Вирус был идентифицирован с помощью электрофоретических исследований в полиакриламидном геле, а также электронной микроскопией. Во время очистки и

концентрирования вируса инфекционный титр вируса составлял 9,2-9,5 \lg ТЦД_{50/см³} (титр цитопатического действия вируса, то есть величина, обратная разведению вирусной суспензии, при котором клеточный монослой в 50% лунок оказался пораженным цитопатическим действием), что на 2 \lg ТЦД_{50/см³} выше, чем в исходном материале. Содержание белка в исследуемых пробах колеблется от 200 до 500 мг/мл. Таким образом, анализируя полученные нами результаты по очистке и концентрированию вируса энтерита гусей, можно сделать вывод, что полученный таким методом антиген пригоден для разработки тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА). Получены гипериммунные и отрицательные сыворотки для ИФА-диагностикумов, отработаны оптимальные соотношения компонентов для конструирования тест-системы ИФА, выведена формула пересчета титров антител в сыворотках крови гусей при тестировании их в одном разведении. Определен позитивно-негативный порог для данного диагностикума (какие из исследуемых сывороток имеют положительный, сомнительный или отрицательный титр антител к возбудителю

вірусного ентерита гусей).
В новых условиях распространения особо опасных вирусов данная разработка может быть в дальнейшем использована для очистки и концентрирования этих вирусов, изучения их биологических свойств, культивирования и использования при разработке новых вакцин.

Ключевые слова: гуси, сыворотки крови, вирусный энтерит гусей, диагностика, ИФА, парвовирус

O.V. TSINOVIIY, Candidate of Biological Sciences,
G.V. BILETSKA, Candidate of Biological Sciences
State Poultry Research Station National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine
tsynovalexvet@ukr.net

Universal method of purification and concentration of viruses on the example of innovation for geese parvovirus

Abstract. A new method of purification and concentration of goose enteritis virus has been developed. For this purpose, three options for further purification of the virus were used and their comparative analysis was performed. The virus was purified without detergents, as well as with detergents – sarcosyl and nonide R-40. We obtained

the best results using the mild nonionic detergent nonidet R-40, which was used in our further work. The virus was identified by electrophoretic studies in polyacrylamide gel, as well as electron microscopy. During purification and concentration of the virus, the infectious titer of the virus was 9.2-9.5 lg TCD_{50/cm³} suspension, in which the cell monolayer in 50% of the wells was affected by cytopathic action, which is 2 lg TCD_{50/cm³} higher than in the original material. The protein content in the test samples ranged from 200 to 500 mg/ml. Thus, analyzing our results on the purification and concentration of goose enteritis virus, we can conclude that the antigen obtained by this method is suitable for the development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hyperimmune and negative sera for ELISA diagnostics were obtained, the optimal ratios of components for designing an ELISA test system were worked out, and the formula for recalculating antibody titers in geese blood sera when testing them in one dilution was derived. A positive-negative threshold was determined for this diagnosticum (which of the studied sera have a positive, doubtful or negative titer of antibodies to the causative agent of viral enteritis in geese). In the new conditions the spread of particularly dangerous viruses, this development, with the appropriate equipment, can be further used to purify and concentrate these viruses, study their biological properties, cultivate and use them in the development of new vaccines.

Key words: geese, blood sera, viral enteritis of geese diagnostics, ELISA, parvovirus

Література

- Білецька Г.В., Безрукава І.Ю., Пересада Н.М. Вивчення епізоотичного статусу щодо вірусного ентериту гусей методом серомоніторингу. *Птахівництво: міжвідомчий тематичний науковий збірник*. 2004. № 55. С. 235-238.
- Бредфорд М. Методика определения белка по Бредфорду: Москва, 1991. С. 466-467.
- Галкина А.А., Смоленский В.И., Джавадов Е.Д., Самодуров А.О. Энтерит гусей вирусной этиологии в условиях хозяйства Приволжского федерального округа. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2020. №2. С. 14-21.
- Дмитриев К.Ю. Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02. Санкт-Петербург, 2020. 106 с.
- Ерофеев С.Г., Борисов В.В., Байбиков Т.З. Концентрирование парвовируса свиней ультрафильтрацией. *Сборник материалов научно-практической конференции "Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы"*. Киров, 2001. С. 23-24.
- Іванська Н.В., Кислих О.М., Максименко О.В. Практичний посібник з імуноферментного аналізу / під ред. А. Л. Гураля та М. Я. Співака. Київ, 2003. 51 с.
- Контримавичус Л.М., Величко Г.Н. Профилактические мероприятия и методы диагностики вирусного энтерита гусей. *Ветеринария*. 2019. № 3. С. 27-30.
- Королев М.Б. Электронно-микроскопические методы выявления вирусов. *Итоги науки и техники*. Москва, 1980. Т. 9. С. 114-157. (Серия: Вирусология).
- Кулибаба Р.А., Юрко П.С., Белецкая А.В. Молекулярная диагностика энтеритов гусей разной вирусной этиологии. *Сучасне птахівництво*. 2012. № 9(118). С. 9-14.
- Маслов Д.В. Серологическая диагностика вирусного энтерита гусей методом иммуноферментного анализа: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксинологией и иммунология". Санкт-Петербург, 2006. 17 с.
- Михайлов А.О. Иммунобиологические свойства инактивированной вакцины против вирусного энтерита гусей: автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксинологией и иммунология". Санкт-Петербург, 2010. 22 с.
- Никитина Н.В., Трефилов Б.Б., Лисенкова А.С. Влияние физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. *Ветеринарная практика*. 2012. №2(57). С. 36-39.
- Трефилов Б.Б., Никитина Н.В. Иммуноферментная тест-система для выявления антител к парвовирусу гусей. *Фундаментальные исследования*. 2014. №12. С. 2590-2594.
- Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Маслов Д.В. Оценка поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей методом иммуноферментного анализа. *Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России*. 2006. С. 200-206.
- Gorg A., Postel W., Weser J. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. *Science Tools*. 1985. Vol. 32, № 1. С. 5-9.

References

- Biletska, G.V., Bezrukava, I.Y., & Peresada, N.M.** (2004). Vyvchennya epizootychnoho statusu shchodo virusnoho enterytu husey metodom seromonitorynh. [Study of epizootic status of goose viral enteritis by seromonitoring method. Interdepartmental thematic scientific collection]. Ptkhivnyystvo: *mizhvidomchyi tematychnyi naukovyi zbirnyk* [Poultry: Interdepartmental thematic scientific collection], 55, 235-238. [in Ukrainian].
- Bradford, M.** (1991). Metodika opredeleniya belka po Bredfordu [Method of determining the protein according to Bradford]. Moscow, 466-467. [in Russian].
- Galkina, A.A., Smolenskiy, V.I., Dzhabadov, E. D., & Samodurov, A.O.** (2020) Enterit gusey virusnoy etiologii v usloviyakh khozyaystva privolzhskogo federal'nogo okruga [Enteritis of geese of viral etiology in the conditions of the economy of the Volga Federal District]. *Veterinariya, zootehniya i biotekhnologiya* [Veterinary medicine, animal science and biotechnology], 2, 14-21. [in Russian].
- Gorg, A., Postel, W., & Weser, J.** (1985). Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. *Science Tools*, 32(1), 5-9. [in English].
- Dmitriev, K.Yu.** (2020). Test-sistema dlya serologicheskoy diagnostiki virusnogo gepatita utyat tipa 1 metodom nepryamogo immunofermentnogo analiza [Test system for serological diagnosis of viral hepatitis in ducklings type 1 by indirect enzyme immunoassay]. (Candidate's thesis). All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg, 106. [in Russian].
- Erofeev, S.G., Borisov, V.V., & Baibikov, T.Z.** (2001). Kontsentrirvaniye parvovirusa sviney ultrafiltratsiyey [Concentration of porcine parvovirus by ultrafiltration]. Sbornik materialov nauchno-prakticheskoy konferentsii "Biotekhnologiya na rubezhe vekov: problemy i perspektivy" [Collection of materials of the scientific-practical conference "Biotechnology at the turn of the century: problems and prospects"]. Kirov, 23-24. [in Russian].
- Ivanska, N.V., Kislikh, O.M., & Maksimenko, O.V.** (2003). Praktichnyy posibnyk z imunofermetnogo analizu [Practical handbook of immunoassay analysis]. Kiev, 51, [in Ukrainian].
- Kontrimavichus L.M., Velichko G.N.** (2019). Profilakticheskiye meropriyatiya i metody diagnostiki virusnogo enterita gusey [Preventive measures and methods for diagnosing viral enteritis in geese]. *Veterinariya* [Veterinary medicine], 3, 27-30. [in Russian].
- Korolev, M.B.** (1980). Elektronno-mikroskopicheskiye metody vyyavleniya virusov. [Electron microscopic methods for detecting viruses]. *Itogi nauki i tekhniki* [Results of Science and Technology]. Moscow, 9, 114-157. [in Russian].
- Kulibaba, R.A., Yurko, P.S., & Beletskaya, A.V.** (2012). Molekulyarnaya diagnostika enteritov gusey raznoy virusnoy yetiologii [Molecular diagnosis of goiter enteritis of different viral etiology]. *Suchasne ptakhivnytstvo* [Modern poultry], 9 (118), 9-14. [in Russian].
- Maslov, D.V.** (2006). Serologicheskaya diagnostika virusnogo enterita gusey metodom immunofermentnogo analiza [Serological diagnosis of viral enteritis in geese by enzyme immunoassay]. (Extended abstract of candidate's thesis). All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg, 17. [in Russian].
- Mikhailov, A.O.** (2010). Immunobiologicheskiye svoystva inaktivirovannoy vaksiny protiv virusnogo enterita gusey [Immunobiological properties of an inactivated vaccine against viral enteritis of geese]. (Extended abstract of candidate's thesis). All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg, 22. [in Russian].
- Nikitina, N.V., Trefilov B.B., & Lisenkova, A.S.** (2012). Vliyanie fiziko-himicheskikh faktorov na chuvstvitel'nost i spetsifichnost immunofermentnogo analiza [The influence of physicochemical factors on the sensitivity and specificity of the enzyme immunoassay]. *Veterinarnaya praktika* [Veterinary practice], 2(57), 36-39. [in Russian].
- Trefilov, B.B., & Nikitina, N.V.** (2014). Immunofermentnaya test-sistema dlya vyyavleniya antitel k parvovirusu gusey [Immunoassay test system for the detection of antibodies to goose parvovirus]. *Fundamentalnyye issledovaniya* [Basic research], 12, 2590-2594. [in Russian].
- Trefilov, B.B., Nikitina, N.V., & Maslov, D.V.** (2006). Otsenka postvaksinal'nogo immuniteta pri virusnom enterite gusey metodom immunofermentnogo analiza [Evaluation of post-vaccination immunity in viral enteritis of geese by enzyme-linked immunosorbent assay]. *Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 110-letiyu Kurskoy biofabriki i agrobiologicheskoy promyshlennosti Rossii* [Proceedings of the international scientific and practical conference dedicated to the 110th anniversary of the Kursk biofactory and agrobiological industry of Russia]. Kursk, 200-206. [in Russian].

